

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249079

研究課題名（和文） 口腔癌幹細胞と癌の微小環境の細胞生物学的特異性を標的にした治療法の開発

研究課題名（英文） Exploitation of gene-targeting therapy based on the cellular and biological features of oral-carcinoma stem cell and tumor microenvironment.

研究代表者

戸塚 靖則（TOTSUKA YASUNORI）

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00109456

研究成果の概要（和文）：我々は、癌の「間質」に存在する腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞とは異なった遺伝子背景をもつことを明らかにしてきた。近年、上皮間葉移行が癌細胞の浸潤・転移に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。上皮性の口腔扁平上皮癌細胞と間葉系細胞の相互作用を検索することは、癌細胞のみならず腫瘍に栄養・酸素を供給することで腫瘍の生存や増殖に関わっている間質細胞をターゲットにした効率的な治療法の確立にも寄与することが期待される。HuR は通常、核に存在しているタンパクで AU-rich element (ARE) mRNA の安定性に関与している。我々は、ウイルス発癌系で ARE mRNA が HuR を介して安定化され細胞の形質転換（癌化）に関与していることを明らかにした。口腔環境は唾液腺など全身の臓器の中で特異な器官を有している。我々は破骨細胞の誘導因子である RANKL が口腔環境で発現が高いことをみいだした。さらにヌードマウスに口腔癌細胞を移植すると口腔に移植した癌細胞が有意に増大することを発見し、このような所見は RANKL が口腔癌の stem cell の上皮間葉移行を生じさせることで誘導されることを明らかにした。腫瘍の微小環境は癌細胞の増殖や浸潤転移と深く関わっている。我々は、腫瘍間質に存在する血管（腫瘍血管）を分離培養し、その生物学的特徴について検索してきた。その結果、炎症を惹起することでも知られている Cox-2 を阻害することで腫瘍血管新生が抑制されること、腫瘍血管は VEGF シグナルを介した MDR1 の転写亢進により抗癌剤に対する抵抗性を獲得することなどが明らかになり、このような検索結果は腫瘍血管をターゲットにした分子標的治療へ応用する可能性が高まった。

研究成果の概要（英文）：We have shown that the tumor endothelial cells which exist in cancer stroma have a different gene background from normal endothelial cells. It has been becoming clear that epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in tumor invasion and metastasis. It is expected that the investigation on the interaction of the oral squamous cell carcinoma cell in epithelium nature and a mesenchymal cell will contribute to the establishment of effective therapeutic method because stromal cells have the ability to supply nutrition and oxygen to a tumor. HuR protein usually exists in the nucleus, and HuR is participating to stabilize AU-rich element (ARE) mRNA. We showed that ARE mRNA is stabilized through HuR by a viral carcinogenesis system that concerns cell transformation. Oral environment has a unique features including distinct organs such as salivary glands. We identified that RANKL, an osteoclast inducer, expression was higher in oral environment. Furthermore, when oral cancer cells were implanted in oral region of nude mice, cancer cells proliferated intentionally, and EMT was observed. Tumor microenvironment is deeply correlated with cancer cell proliferation and invasion/metastasis. We have isolated endothelial cells in tumor stroma, and investigated the biological feature of tumor endothelial cells. As a result, tumor angiogenesis was suppressed by inhibiting Cox-2 known also for the factor inducing inflammation, and the resistance for chemotherapy was acquired by MDR1 upregulation caused by VEGF signaling

pathway. These results will contribute to the new therapeutic method which targeted the tumor endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
年度			
総計	37,100,000	11,130,000	48,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、癌の微小環境、癌幹細胞、上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は遺伝子の疾患であり、癌の発症にはいわゆる癌遺伝子（原癌遺伝子）の活性化・癌抑制遺伝子の不活化など、複数の遺伝子異常が蓄積された結果生じることが明らかになった。口腔領域の腫瘍についても、腫瘍細胞の遺伝子異常の検索が行われ、とくに口腔領域の悪性腫瘍の大部分を占めている扁平上皮癌について、生物学的な基礎研究が行われてきた。その結果、口腔癌の発生にも細胞周期抑制因子である p16 の発現異常や癌抑制遺伝子 p53 の不活性化などの遺伝子異常が蓄積されていることが明らかになってきた。

幹細胞 (stem cell) は、現在、様々な領域で脚光を浴びている。幹細胞は、胚性幹細胞 (Embryonal stem cell; ES 細胞) と成体幹細胞 (Adult stem cell) に大別され、ES 細胞は、受精卵の初期段階の胚から取り出されるもので、多能性幹細胞ともよばれる。培養下で無限増殖性をもちどのような細胞にも成長できる性質をもつため再生医学への応用が期待されるが、倫理的側面から臨床へただちに応用することは、現時点では困難である。成体幹細胞は、成体の体内に既に形作られた組織の中に存在し、自己複製と多分化能をもち組織再生性を有する細胞群で、骨髄造血組織の中には造血幹細胞、間葉系幹細胞など様々な幹細胞集団があることが考えられており、この幹細胞が組織に、分化した細胞を供給していることが知られて来た。造血幹細胞の概念は、その後、血球の分化・発生についての知見を飛躍的に向上させ、造血器悪性腫瘍の治療法に繋がってきた。造血幹細胞を同定し、骨髄移植という治療法を確立させた幹細胞生物学は、骨髄以外の細胞の分化や発生にも大きな意義をもつことが明らかになりつつあり、角膜・肝・皮膚などで成体幹細胞

の存在が明らかにされた。癌組織中においても、造血幹細胞などの体性幹細胞と同様の幹細胞、すなわち 癌幹細胞 (cancer stem cell) の存在が明らかになってきた。癌幹細胞は癌の再発、転移あるいは放射線療法や化学療法に対する感受性の有無に深く関わっていると考えられ、臓器・組織ごとの cancer stem cell の性質を明らかにすることは癌の治療に密接に関連しているものと思われる。慢性骨髄性白血病、乳癌、脳腫瘍などでは、既に cancer stem cell の形質について報告されているが、口腔癌での検索はない。

癌は遺伝子異常を背景とした癌細胞の異常増殖よりなる癌実質と癌細胞に酸素や栄養を供給する間質よりなり、これまで、間質に存在する血管や結合組織は正常細胞であると考えられてきた。しかし、近年、癌をとりまく微小環境は正常組織でみられるものとは異なった形質をもつことが報告され始めている。

2. 研究の目的

癌は遺伝子異常を背景とした癌細胞の異常増殖よりなる癌実質と癌細胞に酸素や栄養を供給する間質よりなり、これまで、間質に存在する血管や結合組織は正常細胞であると考えられてきた。

今回の検索は、これまで報告のない口腔癌に cancer stem cell は存在するの？ Cancer stem cell が存在するとすれば、その形質はどのようなものなのかについて明らかにすることを研究の第一目標としている。癌幹細胞の維持に必要なシグナル伝達系や、癌幹細胞と通常の癌細胞の遺伝子発現の違いが明らかになると、癌幹細胞にターゲットを絞った治療法の開発につながり、癌の再発・転移

の抑制や術前治療法の選択に極めて重要な役割を果たすものと思われる。

我々は、癌の「間質」に存在する腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞とは異なった遺伝子背景をもつことを明らかにした。近年、発生における器官形成、癌細胞の浸潤や線維症などの発症に、上皮細胞が間葉系細胞様細胞へ形態変化する上皮間葉移行の重要性が報告されている。癌細胞の浸潤・転移にも間葉系組織とのクロストークがある可能性や染色体の不安定性との関わりが示されている。上皮性の口腔扁平上皮癌細胞と間葉系細胞の相互作用を検索することで、癌細胞のみならず腫瘍に栄養・酸素を供給することで腫瘍の生存や増殖に関わっている、いわゆる間質細胞をターゲットにした効率的な治療法の確立にも寄与することが期待される。

3. 研究の方法

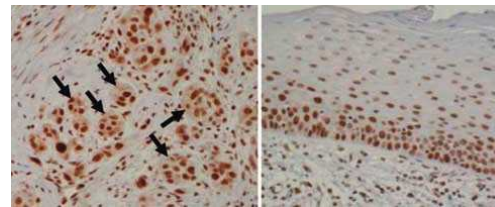
以下の方法を用いて検索を行った。

- 1) 細胞培養
- 2) 免疫染色
- 3) Western blot
- 4) RNA の抽出と定量 RT-PCR
- 5) siRNA によるノックダウン
- 6) in situ hybridization
- 7) soft agar colony formation assay
- 8) RIP アッセイ
- 9) Cell migration assay
- 10) In vitro invasion assay
- 11) 腫瘍間質細胞の分離培養
- 12) FISH
- 13) Flow cytometry
- 14) Cell proliferation assay
- 15) Tube formation assay
- 16) in vivo tumor formation
- 17) mRNA stability assay
- 18) Kinase inhibitor assay

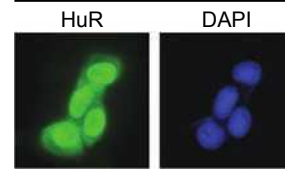
4. 研究成果

1) 口腔癌細胞における HuR タンパクの局在変化と癌化の関連

HuR は mRNA の非翻訳領域に存在する AU-rich element (ARE) に結合し安定化させるタンパクで、正常細胞では熱刺激などの細胞にストレスが加わった状態で HuR は CRM-1 依存的に細胞質に輸送される。しかし、口腔癌細胞株および口腔癌組織では HuR が恒常的に細胞質に輸送され、c-myc などのいわゆる癌遺伝子の安定化が生じていた。さらに、CRM-1 依存的な核-細胞質輸送を LMB で阻害しても細胞質に HuR および ARE mRNA が輸送されることから、口腔癌では CRM-1 非依存的な ARE mRNA の細胞質輸送が起こることで細胞癌化が誘導されることが示された。

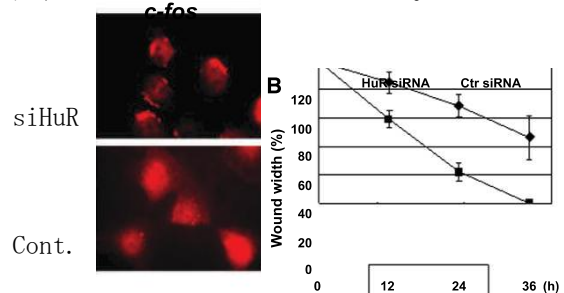


HSC-3 LMB(+)



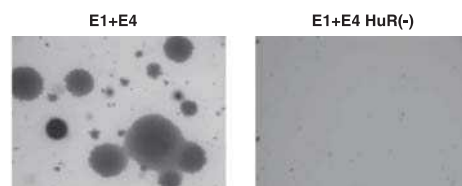
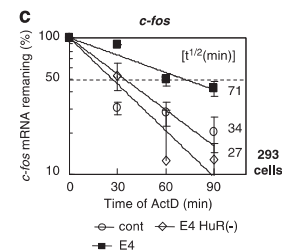
2) HuR ノックダウンによる口腔癌細胞の形質変化

口腔癌の発症・進展に関与していることが示唆された HuR を siRNA によりノックダウンし、どのような形質変化が生じるか検討した。その結果、HuR ノックダウン口腔癌細胞では c-myc, c-fos などの ARE mRNA の細胞質発現が阻害され、運動能・浸潤活性の低下、細胞増殖に関与する cyclin/CDK mRNA の安定化が阻害されることが明らかになった。

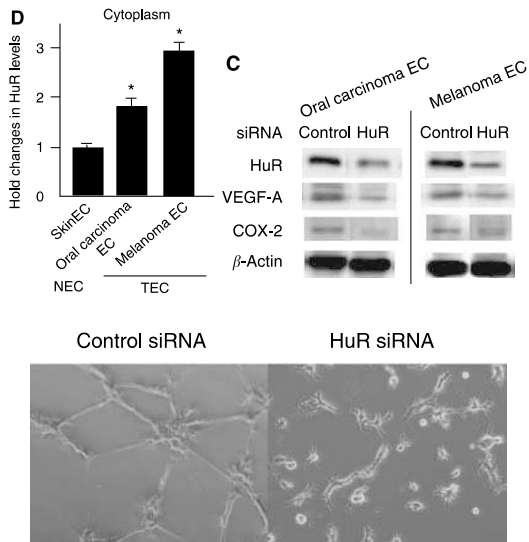


3) ウイルス癌遺伝子を介した ARE mRNA の安定化により細胞癌化が誘導される

E4orf6 はアデノウイルスのウイルス癌遺伝子であるとともに、細胞およびウイルス mRNA を安定化し、CRM-1 非依存的な ARE mRNA の核外輸送に関与している。HuR をノックダウンすると E4orf6 を発現していても ARE mRNA の安定化はされず細胞の形質転換も起こらなくなり、HuR の発癌過程における重要性を示している。

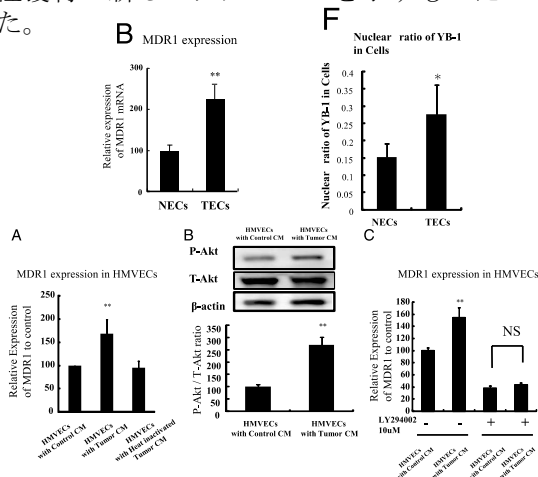


4) 腫瘍血管内皮細胞は VEGF と COX-2 mRNA が HuR により安定化され血管新生に向かう腫瘍間質から分離した腫瘍血管内皮細胞では HuR タンパクの細胞質発現亢進がみられ、ARE mRNA である VEGF と COX-2 mRNA が HuR に結合し安定化していた。さらに siRNA による HuR ノックダウンの結果、VEGF, COX-2 タンパクは減少し、腫瘍血管内皮の増殖活性、血管形成能は減弱した。



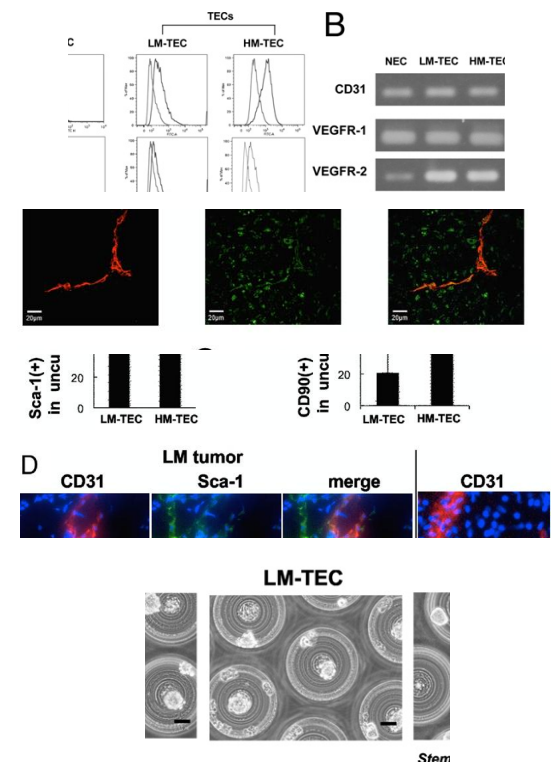
5) 腫瘍血管内皮細胞は腫瘍微小環境で VEGF シグナル伝達系を介した MDR-1 遺伝子の発現亢進により抗癌剤抵抗性を獲得する

これまで腫瘍間質の血管は正常であると考えられてきたが、腫瘍血管 (TEC) は遺伝学的に異常であることが示され、薬物抵抗性を獲得する可能性が示されている。本研究では、マウスに移植した腫瘍間質から分離した TEC は正常血管内皮細胞 (NEC) に比べて MDR-1 mRNA の発現亢進がみられ抗癌剤パクリタセルに抵抗性を示した。NEC を腫瘍培養上清 (CM) で処理すると、MDR1 mRNA の発現が亢進し抗癌剤に対して抵抗性をもつようになり、この際には MDR-1 の転写因子である Y box binding タンパクの核移行がみられた。腫瘍 CM には VEGF が高濃度で含まれ、VEGF 受容体である VEGFR2 および Akt が腫瘍 CM によって活性化された。このような所見は腫瘍細胞が分泌する VEGF が血管内皮細胞の VEGFR および Akt を活性化することによって MDR1 を発現亢進し腫瘍微小環境における TEC の薬物耐性獲得の新しいメカニズムを示すものだった。



6) 高転移性腫瘍と低転移性腫瘍から分離した腫瘍血管内皮細胞の比較

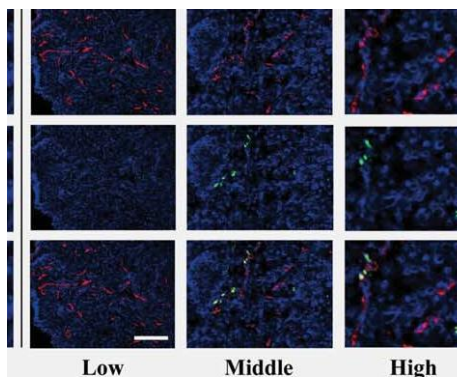
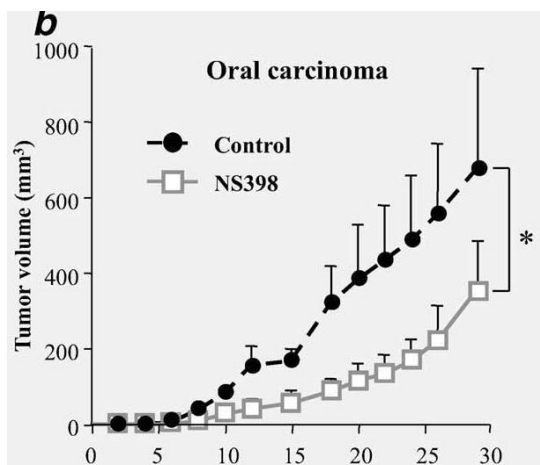
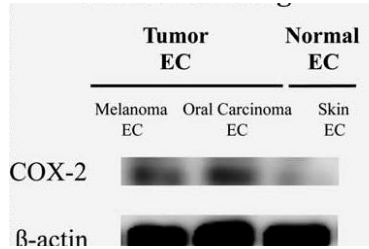
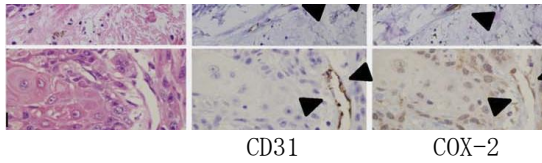
高転移性 (HM)・低転移性 (LM) 腫瘍からそれぞれ TEC を分離し、それらの特性を比較した。HM TEC は LM-TEC に比べてより高い増殖活性および浸潤活性を示し、VEGF, VEGFR や HIF-1 α などの血管新生に関する遺伝子発現が亢進していた。HM-TEC は幹細胞関連遺伝子である Sca 1 や CD90 の発現レベルもより高く、骨芽細胞誘導培地で培養すると骨形成原細胞に分化した。



7) COX-2 の阻害は腫瘍血管内皮細胞と血管前駆細胞による血管新生の抑制にはたらく

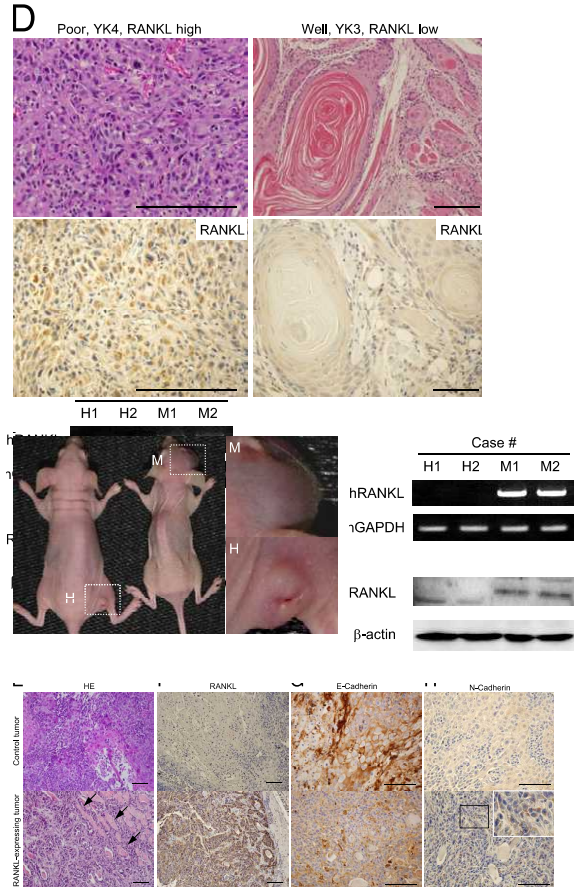
COX-2 は多くの癌細胞で発現し、細胞増殖と浸潤に重要な役割を果たすとともに、細胞増殖、遊走、アポトーシスおよび血管形成をコントロールするシグナル経路を活性化することが知られている。COX-2 阻害薬 (COX-2is) による癌治療の試みがなされているが、腫瘍血管内皮に対する COX-2 抑制の影響についての報告はない。我々は TEC で COX-2 が高発現していることを見だし、COX-2is が in vivo で腫瘍の成長を抑制することを見いだした。さらに、COX-2i 処理したヌードマウスでは、血管前駆細胞の数が減少することも判り、

COX-2is が正常血管内皮細胞には影響せず、TEC および血管内皮前駆細胞を特異的にターゲットとすることが明らかになった。



8) RANKL 発現は EMT と腫瘍の進展をもたらす近年、腫瘍の進展にあたって腫瘍の微小環境の重要性に注目が集まっている。我々は頭頸部扁平上皮癌の in vivo における発生と進展に RANKL が重要な役割を演じているのを見いだした。ヒト頭頸部扁平上皮癌では RANKL の発現がみられ、組織学的悪性度と深く関連していた。一方、頭頸部扁平上皮癌細胞株での RANKL 発現はほとんどみられなかった。この培養細胞をヌードマウスの口腔領域へ移植した腫瘍では RANKL の発現亢進が認められたが、後足部に移植した腫瘍では発現亢進はみとめられなかった。RANKL を強制発現した

口腔癌細胞株は、後足環境でも腫瘍成長がみられ、組織学的に EMT の促進がみられた。このような所見は、in vivo における頭頸部癌の成長と進行に RANKL が密接に関連していることを示すもので、腫瘍微小環境における RANKL 発現が生物学的悪性度の新しい機能マーカーとなり、治療のための標的となりうる可能性を示唆するものだった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. *Br J Cancer*, 100:1943-1948, 2009
2. Akino T, Hida K, Hida Y, Tsuchiya K, Freedman D, Muraki C, Ohga N, Matsuda K, Harabayashi T, Shinohara N, Nonomura K, Klagsbrun M, Shindoh M: Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am J Pathol*, 175:2657-2667,

- 2009
3. Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol Cancer Res*, 8:520-528, 2010.
 4. Kurosu T, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Akiyama K, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kondo M, Akino T, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F, Hida K: HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing mRNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium. *Br J Cancer*, 104:819-829, 2011.
 5. Yamada T, Tsuda M, Takahashi T, Kawaguchi H, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba Y: RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. *Am J Pathol*, 178:2846-2857, 2011
 6. Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, Jehung JP, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. *Oncogene*, 30:2912-2920, 2011.
 7. Yamamoto K, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Kawamoto T, Kitayama K, Akiyama K, Osawa T, Kondoh M, Matsuda K, Onodera Y, Fujie M, Kaga K, Hirano S, Shinohara N, Shindoh M, Hida K: Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumor endothelial cells. *Br J Cancer*, 106:1214-1223, 2012.

[学会発表] (計 68 件)

1. 山田珠樹、津田真寿美、大場雄介、川口秀明、戸塚靖則、進藤正信：口腔癌細胞の接着に関する分子の機能解析。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008/12/9-12
2. 田中宗一、北村哲也、東野史裕、樋田京子、戸塚靖則、進藤正信：Pim-1 は TRAF2, ASK-1 と相互作用し JNK を一過性に活性化する。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008/12/9-12
3. 格口 渉、東野史裕、北村哲也、戸塚靖則、進藤正信：RNA 結合タンパク HuR と口腔がんの浸潤活性との関連。第 69 回日本癌学会総会 2010/9/22-24
4. 山田珠希、津田真寿美、戸塚靖則、進藤正信、大場雄介：RANKL 発現は腫瘍形成と EMT を亢進する。第 69 回日本癌学会

- 総会 2010/9/22-24
5. 樋田京子、大賀則孝、樋田泰浩、進藤正信：がん微小環境内の血管内皮の異常性。(日本病理学会学術研究賞 A 演説) 第 56 回日本病理学会秋期特別総会 2010/11/25-26
 6. Ohba Y, Yamada T, Fujioka Y, Kaibara T, Totsuka Y, Shindoh M, Tsuda M: RANKL upregulators integrin $\alpha 2$ expression and cell adhesion in oral cancer cells. 第 63 回日本細胞生物学会。 2011/6/27-29

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00109456

(2) 研究分担者

進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20162802

東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50301891

樋田 京子 (HIDA KYOKO)
北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号：40399952

北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00451451

大場 雄介 (OHBA YUSUKE)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30333503

松本 健一 (MATSUMOTO KENICHI)
島根大学・総合科学研究支援センター・教授
研究者番号：30202328

大廣 洋一 (OHIRO YOICHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40301915