

## 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25年 6月 11日現在

機関番号：83903  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2013  
 課題番号：22592030  
 研究課題名（和文）口腔癌幹細胞と癌の微小環境（ニッチ）におけるMMPおよびADAMの役割検討  
 研究課題名（英文）The role of extracellular matrix degradation enzymes, MMP and ADAM in tumor micro environment (stem cell niche)  
 研究代表者  
 中村 博幸（HIROYUKI NAKAMURA）  
 国立長寿医療研究センター・再生歯科医療研究部・副部長  
 研究者番号：30542253

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔癌幹細胞ニッチで幹細胞性維持に関わるプロテアーゼについて、癌増殖・浸潤・転移に重要でかつ細胞外マトリックスに高い分解活性を持つ MMP と ADAM にターゲットを絞って解析する。これらのプロテアーゼファミリーに特異的なインヒビターを発見するトランスジェニックマウスを用いて、どのプロテアーゼが癌幹細胞のニッチからの離脱に関わるのかを生体内で明らかにする。

研究成果の概要（英文）：In oral tumor micro environment (stem cell niche), the role of extracellular matrix degradation enzymes, MMP and ADAM which is critical for tumor invasion and metastasis, is not clear. To address this question, we establish transgenic mice which overexpress MMP or ADAM specific inhibitor in niche cells specifically, and try to identify which protease is involved in regulation of oral tumor micro environment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：

キーワード：ADAM、MMP、TIMP3、癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

組織内微小環境を構成する細胞外マトリックスや、それと結合する増殖因子などの生理活性物質、さらにはそれらの受容体や細胞膜タンパクの代謝には、プロテアーゼのMMPやADAMおよびこれらのインヒビターであるTIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) 遺伝子ファミリーが中心的役割を果たしている。申請者はリコン

ビナントTIMP-3を精製し、それがADAMを阻害することを証明し、それまで不明であった生体内でのADAMのインヒビターの一つがTIMP-3である可能性を示した<sup>(FEBS Lett, 494: 192-195, 2001)</sup>。また、本来TIMP-3が持っているMMPに対する阻害活性を欠失させた変異体TIMP-3 (-1A1aTIMP-3) を作製し、この阻害活性がADAMに特異的なことを示した。さらに、TIMP-3あるいは-1A1aTIMP-3が軟骨細胞

特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、関節症モデルマウスでの関節破壊抑制にはADAMの阻害が重要であり、一部のMMPは関節を破壊から防御する働きを持つ可能性を示した (論文投稿中)。

これまで申請者を含む多くの研究者によって一群のMMPが、癌組織中で高発現しており (Cancer Res, 59: 467-473, 1999) かつその高い細胞外マトリックス分解能から、癌治療の最適の標的であると考えられてきた。しかしながら、理論的には有効と考えられたMMPインヒビターは臨床治験で明らかな治療効果を示さなかった。製薬会社が作製したインヒビターの中にはプラセボと比較して生存率がかって悪化した症例や、癌の進行や肝転移を促進した例もあった (Nat Rev Cancer, 7: 800-808, 2007)。臨床治験は図らずもMMPの腫瘍抑制効果を示唆する結果となり、実際に一部のMMPは癌の悪性化において防御的に働くと報告されている (Nat Rev Cancer, 7: 800-808, 2007)。例えば、MMP-3, -9, -11ノックアウトマウスに誘導した扁平上皮癌は、大きさは縮小したが未分化癌細胞が増え悪性度が増大していた (Nat Rev Cancer, 7: 800-808, 2007)。メラノーマではMMP-8遺伝子がしばしば変異しており、変異していない野生型MMP-8はメラノーマ細胞の成長や腫瘍形成を防ぐ作用を有していた (Nat Genet, 41: 518, 2009.)。また、MMPと同様に細胞外マトリックスに対し分解活性をもつADAMTS-1, -8, -9, -15, -18の発現が癌組織において劇的に低下しており、腫瘍抑制効果が推測されている (Nat Rev Cancer, 7: 800-808, 2007)。臨床治験に用いられたMMPインヒビターはMMP以外のメタロプロテアーゼであるADAMも同様に阻害することから、臨床治験の失敗がどのプロテアーゼファミリーの阻害によるのかは明らかでなく、また一部のMMPが癌の悪性化に防御的に働く詳しいメカニズムは不明である。

最近、癌は数%以下の癌幹細胞/癌前駆細胞と、残りの大部分を占める分化した癌細胞から形成されると考えられている (Nature, 444: 756, 2006)。先行する正常組織幹細胞の研究結果を踏まえると、癌幹細胞は正常組織幹細胞と同様に特別な微小環境(ニッチ)内で細胞周期を停止させ、休眠状態で存在していると推定される。そのため増殖細胞を標的とする従来の抗癌剤を用いた治療法は癌幹細胞に効果はなく、癌再発の原因と推測されている。癌幹細胞が一旦ニッチより離れて分化が進むと、癌形成能は極端に低下し、理論的には抗癌剤感受性となる。しかしながら、癌幹細胞のニッチからの離脱過

程には不明な点が多い。癌幹細胞ニッチを構成する候補分子には、フィブロネクチン、CD44、ヒアルロン酸、インテグリン、Notchおよびプロテオグリカン等の細胞外マトリックスや細胞膜タンパクが報告されており、癌幹細胞のニッチからの離脱過程でこれらの分子に分解活性をもつMMPおよびADAMの関与が予想される。MMPインヒビターを用いた臨床治験での予想外のデータは癌幹細胞のニッチからの離脱に関わるMMPやADAMプロテアーゼの阻害に基づく可能性が考えられるが、これまで詳細に解析した報告はみられない。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究ではMMPとADAMに焦点を絞って、以下の4研究項目のもとに、これら分子による口腔癌幹細胞ニッチ制御機構の解明を目指す。

①線維芽細胞または血管内皮細胞特異的にTIMP-3あるいは-1A1aTIMP-3を発現するトランスジェニックマウスの作製: 癌幹細胞に関する情報は限られており、これまでに報告された癌幹細胞で働くプロモーターの特異性は必ずしも高くなく、インヒビター発現に用いるには問題が多い。一方ニッチについては、間質線維芽細胞や (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 14842-14847, 2006)、血管内皮細胞がニッチ形成細胞としてそれぞれ新たに注目されている (Cancer Cell 11: 69-82, 2007)。

I型コラーゲンプロモーターは線維芽細胞で、Tie2プロモーターは血管内皮細胞で特異的に働くことが既によく知られていることから、これらのプロモーターの制御下でTIMP-3あるいは-1A1aTIMP-3を発現するトランスジェニックマウスを作製する。さらにDNA組換え酵素のCreリコンビナーゼとエストロゲン受容体のリガンド結合部位と融合させたCreERT2を用いて、インヒビターの発現開始時期を薬剤(タモキシフェン)で調節し、マウス胎生期からの発現による正常発育への影響を排除する。さらに、これらのマウスを重度免疫不全NOGマウスと交配させ、ヒト口腔癌細胞の移植が可能なマウスを作製する。

②①で作製したTIMP-3あるいは-1A1aTIMP-3発現マウスへのヒト口腔癌幹細胞の移植: 癌幹細胞は細胞表面抗原CD133<sup>+</sup>細胞群やヘキスト排出能力を有するSP (Side Population)に濃縮されることが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 781-786, 2004, Nature, 432: 396-401, 2004)。金沢大学医学部歯科口腔外科教室で樹立されたヒト

口腔癌細胞株 (OSC-19、-20) の CD133<sup>+</sup>分画または SP 分画を採取し①で作製したマウスに同所移植する。その後、TIMP-3 または-1A1aTIMP-3 存在下で、移植癌幹細胞の造腫瘍・転移能や、抗癌剤に対する抵抗性を比較観察する。

③マウス組織内の癌幹細胞の同定と分子発現プロファイル:②で得られた腫瘍の切片を作製し、癌幹細胞を幹細胞マーカー (CD133、CD44、SOX2 等) で免疫組織学的に同定し、癌幹細胞の増減と分布を TIMP-3 あるいは-1A1aTIMP-3 存在下で比較検討する。さらに、癌幹細胞およびニッチでの MMP と ADAM ファミリー分子の発現プロファイリングを免疫組織化学染色やマイクロアレイを用いて行い、癌幹細胞のニッチからの離脱に関わる MMP または ADAM 分子の候補を絞る。

④ニッチからの離脱に関わる MMP、ADAM を過剰発現する口腔癌幹細胞の移植:③で同定した候補 MMP、ADAM 発現遺伝子をレトロウイルスでヒト口腔癌細胞 (OSC-19、-20) の CD133<sup>+</sup>分画または SP 分画に導入し、重度免疫不全 NOG マウスに同所移植する。癌幹細胞の造腫瘍性と増減を比較観察し、ニッチからの離脱を促進する MMP や ADAM 分子を同定する。さらに、癌細胞が残存する場合抗癌剤を投与し、残存癌細胞が抗癌剤感受性か抵抗性なのかを観察し、どの MMP や ADAM 分子がニッチからの離脱、分化を促進するかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線維芽細胞または血管内皮細胞特異的に TIMP-3 あるいは-1A1aTIMP-3 を発現するトランスジェニック NOG マウスの作製

①線維芽細胞特異的に CreERT2 を発現するトランスジェニックマウスの作製

マウス I 型コラーゲンプロモーター (1.5kb Enhancer + Coll1a1 proximal promoter) 制御下で CreERT2 とルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスを作製する。

②Cre リコンビナーゼの活性により TIMP-3 あるいは-1A1aTIMP-3 を発現するマウスと上記①で作製したマウスおよび Tie2-CreER マウスとの交配

研究協力者の Dr. George Bou-Gharios (Imperial College London, UK) と共同で作製した、ユビキタスプロモーター (CAG プロモーター、エンハンサー+ $\beta$  アクチンプロモーター) の下流に LoxP に挟まれた polyA (floxed polyA) とさらにその下流に TIMP-3

あるいは-1A1aTIMP-3 遺伝子をもつトランスジェニックマウス (図 1-TG②) と、上記①で作製したマウスおよびジャクソンラボラトリーから購入した Tie2 プロモーター制御下に CreER を発現するマウスをそれぞれ交配する。さらに、これらのトランスジーンを重度免疫不全 NOG マウスへ戻し交配によって導入し、ヒト口腔癌細胞の移植が可能なマウスを作製する。NOG マウスは、NOD マウスと SCID マウスと IL-2 レセプター $\gamma$  鎖ノックアウトマウスを掛け合わせた複合マウスで、T 細胞、B 細胞、NK 細胞のみでなく、その他の免疫担当細胞も機能不全に陥っている。そのため、ヒト腫瘍のみならず、種々のヒト正常細胞の移植も可能となる。

#### (2) 交配後の仔マウスでのトランスジーン発現の確認

CreERT2 の発現は、サロゲートマーカーのルシフェラーゼ活性を生体イメージング技術で検出することにより確認する。TIMP-3、-1A1aTIMP-3 および  $\beta$  gal の発現は、抗 TIMP-3 抗体を用いた免疫染色と X-gal 染色で確認し、局在が線維芽細胞または血管内皮細胞特異的であることを確認する。さらに TIMP-3、-1A1aTIMP-3 および  $\beta$  gal の発現がタモキシフェンの投与で開始されることを確認する。

#### (3) (1)で作製したトランスジェニック NOG マウスへの口腔癌幹細胞の移植

腫瘍の大部分は非癌幹細胞であるが、少数しか存在しない癌幹細胞は細胞表面抗原 CD133 を利用して濃縮することができる。さらに、癌幹細胞は ABCG2 ポンプの作用により Hoechst33342 という蛍光色素に対して高い排出能を持つことが報告されており、Side Population (SP) と呼ばれている。金沢大学医学部歯科口腔外科教室で樹立されたヒト口腔癌細胞株 (OSC-19、-20) の CD133<sup>+</sup>分画および SP 細胞分画を FACS ソーティングシステムにて採取する。この分画を前年度作製したトランスジェニック NOG マウスにそれぞれ同所移植し、造腫瘍性およびリンパ節転移を TIMP-3 または-1A1aTIMP-3 存在下で比較する。さらに、腫瘍形成後、それぞれのトランスジェニック NOG マウスに抗癌剤を投与し、耐性度の違いを観察する。TIMP-3 あるいは-1A1aTIMP-3 の発現は、タモキシフェンの腹腔投与により 10 週齢で開始し、発育段階からの発現によるこれら分子の影響を排除する。

#### (4) マウス組織内癌幹細胞の局在解析と分子発現プロファイリング

上記 (3) で得られた腫瘍の凍結およびパラフィン切片を研究協力者である慶應義塾大

学医学部病理学教室の岡田保典教授と共同で作製し、癌幹細胞を現在用いられている幹細胞マーカー (CD133, CD44, SOX2 等) を複数用いて免疫組織学的に同定する。幹細胞マーカー陽性癌細胞の増減、分布、場所および進展の違いを TIMP-3 あるいは AlaTIMP-3 の有無で比較する。さらに、岡田保典教授らが開発した MMP (MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14) とプロテアーゼ型 ADAM (ADAM-9, -10, -12, -15, -17, -28) に対する特異抗体を用いて免疫染色し、癌幹細胞およびニッチに特異的な MMP と ADAM 分子を確認・同定する。次いで、マーカーで同定された癌幹細胞を、レーザーマイクロダイセクション法で連続凍結切片から採取し、マイクロアレイを用いて発現分子プロファイリングを行う。得られた結果から、発現が大きく異なる分子を MMP と ADAM に絞って解析し癌幹細胞の維持や離脱に関わる候補分子を絞る。

(5) ニッチからの離脱に関わる MMP または ADAM を過剰発現する口腔癌幹細胞の移植  
上記 (4) で同定した候補 MMP と ADAM 分子を発現する遺伝子ベクターを、ヒト口腔癌細胞株 (OSC-19, -20) の CD133<sup>+</sup> 分画および SP 細胞分画にレトロウイルスを用いて遺伝子導入する。その後、これらの細胞を重度免疫不全 NOG マウスに同所移植し癌幹細胞の造腫瘍・浸潤・転移能をコントロールと比較する。さらに、癌細胞が残存する場合抗癌剤を投与し癌細胞が抗癌剤感受性か抵抗性なのかを観察する。これらのデータを統合しどの MMP と ADAM が癌幹細胞のニッチからの離脱を促進し、分化を誘導し抗癌剤感受性癌細胞の増加に寄与しているかを検討する。

#### 4. 研究成果

初年度に作製した CAG プロモーターを用いた TIMP-3 および AlaTIMP-3 発現トランスジェニックマウスではトランスジーンを持つ全ての細胞で発現が観察されなかった。つまり発現遺伝子を持ちながらタンパクの発現がない細胞が多く観察された。これまで CAG プロモーターは細胞の種類によっては働かないことが報告されていたため、次年度は CAG プロモーターの代わりにユビキチン C プロモーターを用いて TIMP-3 および AlaTIMP-3 を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。トランスジーン作製過程で、TIMP-3 または AlaTIMP-3 の下流にリボゾームスキップ活性をもつ 2A ペプチドと mCherry 遺伝子を挿入しこの蛍光タンパクをサロゲートマーカーとして使用できるように設計した。このトランスジーンを胚にインジェクトし 2 系統の TIMP-3 発現マウスと、3 系統の

AlaTIMP-3 発現マウスを樹立した。実際の TIMP-3、AlaTIMP-3 タンパクの発現の確認は I 型コラーゲンプロモーター調節下に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配することにより行った。その結果、作製した全てのマウスで mCherry の発現を確認した。さらに CAG プロモーターを用いたトランスジェニックマウスと異なり、マウス皮膚でほぼすべての線維芽細胞で mCherry の発現を確認した。今後は当初の目的に沿って TIMP-3 または AlaTIMP-3 発現を確認したユビキチン C をプロモーターにもつトランスジェニックマウスに口腔癌幹細胞の移植を行う。腫瘍形成後、抗癌剤を投与し耐性癌細胞の局在を検討する。

#### 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 3 件)

① Sonnylal, S., Shi-Wen, X., Leoni, P., Naff, K., Van Pelt, CS., Nakamura, H., Leask, A., Abraham, D., Bou-Gharios, G., and de Crombrughe, B.: Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*, 62, 1523-1532, 2010.

② Bou-Gharios, G., Amin, F., Hill, P., Nakamura, H., Maxwell, P., and Fisk, NM.: Microchimeric fetal cells are recruited to maternal kidney following injury and activate collagen type I transcription. *Cells Tissues Organs*, 193, 379-392, 2011.

③ Eba, H., Murasawa, Y., Iohara, K., Isogai, Z., Nakamura, H., Nakamura, H., and Nakashima, M.: The anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase-3 on irreversible pulpitis of mature erupted teeth. *PloS one* 7, e52523 2012.

[学会発表] (計 6 件)

① 中村博幸: 細胞外マトリックス分解最近の知見, 第 17 回プロテオグリカンフォーラム, 東京, 2010 年 2 月 27 日

② 中村博幸: 細胞外マトリックス分解最近の知見, 平成 23 年愛知医科大学分子医科学研究所フォーラム, 愛知, 2011 年 4 月 20 日

③ 中村博幸: 歯科再生医療の背景と最先端事情, 第 22 回金沢歯科口腔外科懇話会, 金沢, 2012 年 2 月 25 日

④ 中村博幸: MMP-3 の歯髄炎での抗炎症, 組織再生作用の検討, 第 10 回日本再生歯科医

学会（シンポジウム I）, 神戸, 2012 年 9 月  
1 日

⑤中村博幸：歯の再生医療, 平成 24 年度九州歯科大東京都同窓会学術講演会, 東京, 2012 年 10 月 13 日

⑥中村博幸：歯の再生医療, 平成 25 年度九州歯科大同窓会北陸支部学術講演会, 福井, 2013 年 3 月 2 日

〔図書〕(計 1 件)

①中村博幸, 岡田保典：炎症メディエーターメタロプロテアーゼ, 日本臨床, 68, 195-199, 2010 年

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 博幸 (HIROYUKI NAKAMURA)  
国立長寿医療研究センター・再生歯科医療  
研究部・副部長  
研究者番号：30542253

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし