

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592521

研究課題名(和文) EMTによる頭頸部癌悪性化および癌幹細胞活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of Head and Neck Cancer malignancy related to EMT and Cancer Stem Cells

研究代表者

加藤 健吾 (KATO, KENGO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：40455788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌の浸潤・転移にはEMTが重要であるが、EMTは癌幹細胞を誘導しうるということが明らかとなった。そこで頭頸部がんにおける両者の役割を検討した。EMT関連分子およびポリコム系遺伝子に注目し頭頸部がん細胞株HSC-3に遺伝子導入したところ、Bmi1, EZH2, Twist, slugがALDH1活性化を誘導した。Bmi1導入細胞はNOGマウスにおいて造腫瘍能を示した。炎症性サイトカインTNF およびTGFβはBmi1と協調して幹細胞性を増強した。以上の結果から、EMT関連遺伝子とポリコム遺伝子はがん幹細胞を誘導し、ニッチから供給される炎症環境において悪性度を増している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant phenotype of Head and Neck Cancer (HNC) is related to EMT and polycomb gene induction, and emerging evidence suggests a role of EMT/Polycombs on Cancer stem cell (CSC) induction. In this study, we investigated whether EMT and polycomb genes control CSC of HNC cells. Forced expression of the Bmi1, EZH2 and Slug in HNC cell lines induced cancer stemness phenotypes, such as ALDH1 activity. Two inflammatory cytokines, TGFβ and TNFα potentiated Bmi1-related CSC phenotypes. These results suggest that polycomb and EMT genes under inflammatory environment regulate malignant phenotypes of HNC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：癌 癌幹細胞 EMT

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は咽頭・喉頭等に発生し、咀嚼、呼吸、嚥下等の生体機能を損なうことから、単に生命予後のみならず Quality of Life の観点からもその克服が急務である。頭頸部癌の大部分を占める扁平上皮癌は、強い角化傾向を呈し、原発部位と転移部位に硬い腫瘤を形成しながら頭部・頸部さらに体幹へとリンパ管・静脈に沿って浸潤・転移する。

最近になって、癌の浸潤・転移には癌細胞自身の上皮間葉転換 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) が必須の役割を果たしていることが明らかになった。EMT とは上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、従前は初期胚発生(原腸陥入・神経堤細胞運動・器官形成過程)に関わることが知られていた。EMT の獲得は癌細胞の運動性亢進や細胞外基質の蓄積をもたらす、癌の浸潤や転移との関連が示された。一方、癌転移研究によって EMT が「がん幹細胞」(Cancer Stem Cell, Cancer Initiating Cell) 形質の獲得にも関連していることが明らかとなってきた。たとえば EMT の鍵分子の1つである Twist1 を発現すると癌幹細胞形質が具有され治療抵抗性や再発を制御する。一般に、がん細胞は正常体細胞と比較して、(1)増殖能亢進、(2)不死化、(3)浸潤・転移、という3つの特性を持つ。しかしながら、がん組織において実際に造腫瘍性を有するがん細胞は全体のごく一部に過ぎない。癌幹細胞は、(1)自己複製能、(2)多潜能性、という2つの特徴を持ち、がん組織中で自己複製により同一の未分化形質を維持しながら大多数のがん細胞を生み出していると考えられている。がんの治療抵抗性が幹細胞にあるとする「がん幹細胞仮説」は、頭頸部癌にも当てはまると想定されるが、「EMT 分子群」による浸潤・転移能の獲得は、癌幹細胞性獲得も同時に惹起している可能性が高い。実際に、頭頸部癌(扁平上皮癌)における EMT と癌幹細胞の関連性については、これまで十分に解析されていなかった。

### 2. 研究の目的

頭頸部癌の EMT (浸潤・転移) および癌幹細胞誘導 (治療抵抗性・再発) に関わる新規分子の同定を行い頭頸部癌が悪性形質を獲得する機序を解析する。第1に、頭頸部癌細胞株 FaDu, HSC-3, HSC-4 を対象としてポリコム遺伝子のうち Znf277, Bmi1, EZH2 に着目する。これら遺伝子を各細胞株に発現させ、1)E-Cadherin, 2)vimentin 等の EMT マーカーの発現が変化し細胞形態が間葉系(紡錘形)に変化を解析する。EMT が誘導されれば癌細胞の悪性度が増加するはずである。Znf277 等が新規 EMT 誘導分子として頭頸部癌の悪性化を惹起させか検証する。本研究の第2の目的は、上記遺伝子が癌遺伝子として機能するか解析する。既に Bmi1 を発現させた細胞は増殖能が上昇することが

示唆されている。そこで Znf277, EZH2 の発現により癌細胞の増殖亢進、コロニーフォーマーションアッセイ等によって悪性化形質の変化を検証する。

本研究の第3の目的は、頭頸部癌の癌幹細胞が上記遺伝子群によって誘導されるか検証する。一般に癌幹細胞は通常の幹細胞と同様に幹細胞マーカー分子(Oct-4, Nanog, GF11, Sox2, Notch1, Notch2)を発現することから、頭頸部癌細胞株に Znf277 等のポリコム遺伝子を発現させた時にこれら幹細胞性マーカーが発現することを Real-timePCR 法にて検討する。次いで、頭頸部癌細胞株に Bmi1, Znf277, EZH2 を発現させ、癌幹細胞表面マーカーとして知られている Hoechst 陰性サイドポピュレーション (SP 細胞), CD44, CD24, EpCAM, ALDH1 が増加するか検討する。他方、癌幹細胞性を in vitro で調べるため、Spheroid formation assay を行う。以上の解析により、Znf277, Bmi1, EZH2 が EMT および癌幹細胞誘導を同時に行うことを検証する。Znf277 と Bmi1 を発現する高腫瘍形成能細胞分画と、2者とも発現しない低腫瘍形成能細胞分画について、遺伝子発現を比較する。特に、がん幹細胞と ES 細胞の間で遺伝子発現の類似性が指摘されていることに着目して、新たな EMT および癌幹細胞マーカーとなり得る発現分子を同定する。一方、これら遺伝子の頭頸部癌検体での発現と予後の関係を検討する。本研究の最終目的は、in vitro および in vivo 両面から頭頸部癌における悪性化機序を明らかにするのみならず、分子標的としてがん治療法開発の可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 頭頸部がん細胞株を用いたポリコム関連遺伝子群による EMT 誘導の解析: 頭頸部癌由来癌細胞株を用いて EMT 関連ポリコム遺伝子のうち Bmi1, Znf277, EZH2 を発現させ、EMT に特徴的な生物学的特徴が誘導されることを検証する。頭頸部癌(扁平上皮癌)由来の細胞株 (FaDu, HSC-2, HSC-3) について、上記3遺伝子をはじめとするポリコム抑制性複合体 (PRC) 遺伝子を恒常的に発現させた細胞株を樹立する。これら細胞株について形態を観察し EMT の特徴を解析する。a) ウエスタンブロット法により、EMT マーカーの発現が変化することを解析する。b) qRT-PCR 法により twist1, snail, slug 等の遺伝子発現変化を解析する。c) 細胞形態の間葉系への変化を解析する。以上により、ポリコム関連遺伝子による EMT 誘導を調べる。

(2) 頭頸部がん細胞株を用いたポリコム関連遺伝子群による幹細胞性誘導能の解析: 頭頸部癌由来癌細胞株を用いて EMT 関連ポリコム遺伝子のうち Znf277, Bmi1 および EZH2 を発現させ、癌幹細胞に特徴的な生物学的特徴(癌幹細胞性)が誘導されることを検証する。樹立した細胞株 (FaDu, HSC-3, HSC-4) につ

いて、がん幹細胞分画標識に用いられているマーカー(CD44, ALDH1, CD24 等)の発現の有無をフローサイトメトリー法にて検討する。(3) 癌幹細胞性を得た場合に顕著な差異が現れる Spheroid Formation アッセイを用いて、幹細胞性が誘導されるか確認する。癌幹細胞性が誘導されれば、細胞死に変化が認められるはずである。細胞生存、アポトーシスを解析する。これらマーカーを用いて既存のセルソーターによって細胞を分画し、各細胞分画を NOG マウスに移植する。腫瘍形成能について  $1 \times 10^3$  から  $1 \times 10^5$  の範囲の癌幹細胞分画を皮下移植し癌の生着を調べる。腫瘍サイズ、腫瘍個数について調べる。NOG マウスに形成された腫瘍について浸潤、転移、血管新生等を病理学的に解析する。(4) 頭頸部癌検体におけるポリコム関連遺伝子の発現解析: がん幹細胞マーカーが実際に臨床検体で発現し予後と相関するかどうか検証する。患者由来頭頸部癌についてポリコム遺伝子の発現について、遺伝子的に解析する。EMT と癌幹細胞を同時に誘導する因子が頭頸部癌患者と相関するかどうか検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 頭頸部がんに対する EMT およびポリコム遺伝子導入細胞の樹立と形態変化: 頭頸部癌の一般的細胞株として知られている FaDu, HSC-3, HSC-4 を対象として細胞を用いた in vitro 悪性化解析を行った。まず、遺伝子発現に用いるレトロウイルスベクター (pBabe および pMX 系) を作成した。作成した遺伝子は EMT 関連分子として、Twist1, Slug, Snail である。ポリコム系遺伝子として Bmi1, EZH2, Znf277 を選択した。さらに、低酸素環境と幹細胞の関連を探るため活性化型 HIF1 を用いた。これらウイルスを上記細胞に感染させ安定発現する細胞株を得た。各遺伝子発現については qPCR にて確認した。EMT に特有の紡錘形細胞への形態変化を解析した、Twist1, Slug, Snail において形態変化を軽度認めた。

(2) 頭頸部がんに対する EMT およびポリコム遺伝子導入による頭頸部がん造腫瘍能の変化: 第 1 に、Sphere 形成を解析した。HSC-3 は形成能が極めて低く、HSC-4 は良好であった。しかしながら、いずれの細胞とも、EMT 関連分子 Twist1, Slug, Snail、およびポリコム系遺伝子として Bmi1, EZH2, Znf277 導入による明確な差異を認めなかった。これら頭頸部がん細胞株では Sphere 形成能では幹細胞性の解析が困難であると考えられた。第 2 に、遺伝子導入細胞株を用いて超免疫不全 NOG マウス皮下に移植し腫瘍形成を解析した。予備的に遺伝子導入のない親細胞で予備実験したところ、FaDu 細胞はわずか 10 細胞で腫瘍形成した。この結果から FaDu 細胞は幹細胞性がほぼ 100%あると解釈された。一方、HSC-3, HSC-4 は  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  細胞で腫瘍形成が軽度観察された。したがって、HSC-3, HSC-4

を用いて解析を行った。その結果、Bmi1 を導入した細胞を  $1 \times 10^3$  移植すると移植後 6 週で腫瘍形成が認められた (表 1)。なお、低酸素遺伝子 HIF1 の活性化型を比較に用いたが腫瘍形成しなかった。この結果から、Bmi1 は HSC-3 細胞の造腫瘍能を亢進させることが明らかとなった。

表 1. ポリコム遺伝子 Bmi1 は腫瘍形成能を亢進させる (Host NOG マウス: HSC-3 細胞)

導入遺伝子	control	Bmi1	HIF1
腫瘍形成 (6W)	0/4	2/4	0/4

(3) 頭頸部がんに対する EMT およびポリコム遺伝子導入による頭頸部がん幹細胞性の変化: がん幹細胞では、特にフローサイトメータによるがん幹細胞形質が表出する。そこで、まず Side Population (SP) 分画を解析した。EMT 関連分子 Twist1, Slug, Snail およびポリコム系遺伝子 Bmi1, EZH2, Znf277 を導入しても SP 分画はほとんど検出できなかった。そこで次に ALDH1 を解析した。aldefluor assay により各種細胞の ALDH1 活性を測定した。その結果、EMT 関連分子のうち Twist1 および Slug が ALDH1 活性を誘導した。ポリコム系遺伝子では Bmi1 および EZH2 が ALDH1 を強力に誘導した。さらに、Znf277 遺伝子も軽度ではあるが ALDH1 を活性化した。この結果から、EMT 関連分子およびポリコム系分子の一部は頭頸部がん幹細胞を誘導することが明らかとなった。将来の頭頸部がん治療において、これら分子は治療標的として選択肢に入ることが示唆された。

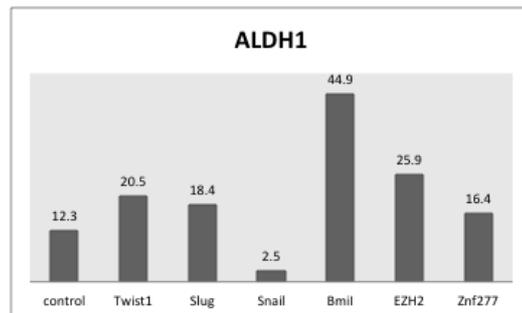


図 1. EMT およびポリコム関連遺伝子による癌幹細胞性の発現誘導 (HSC-3 細胞)

(4) Ras 活性化型癌遺伝子による頭頸部がん幹細胞性の誘導: 膀胱癌などでは、K-ras 変異により発がんするのみならずがん幹細胞性が誘導されている。そこで、頭頸部がん Ras を活性化し同様の変化が誘導できるか調べた。活性化 H-Ras を HSC-3 に導入したところ、ALDH1 陽性はコントロールの 9.6% から 35.9% に上昇した。この結果は、Bmi1 などと類似した上昇割合であった。したがって、Ras のような強力な発がんドライバー変異は、がん幹細胞性を同時に誘導する可能性が示唆

された。

(5) ポリコム遺伝子と炎症性サイトカインの協調による頭頸部がん幹細胞性誘導パターンの解明：臨床癌においては、時に炎症性の変化を合併することがある。このため、ポリコム活性化状態において、炎症性サイトカインががん幹細胞性を誘導するか調べた。CD24<sup>low</sup> 分画は、乳癌等でがん幹細胞分画とされる。Bmi1 を導入した HSC-3 細胞は CD24<sup>low</sup> 分画が増加した。これに加えて、培養条件に TGF あるいは TNF を添加したところ、同細胞分画がさらに上昇した。興味深いことに TGF と TNF を同時に加えると、CD24<sup>low</sup> 分画が特に強く誘導された。したがって、炎症性の変化ががん組織に発生すると癌細胞が幹細胞化することが示唆された。TNF および TGF は繊維芽細胞および免疫系細胞から分泌され供給される可能性が高い。今後、炎症性の変化が頭頸部がんの悪性化におよぼす影響を解析することが重要であると考えられた。

表2. ポリコム遺伝子Bmi1はTNF $\alpha$ およびTGF $\beta$ と協調して癌幹細胞を増加させた(HSC-3細胞)

導入遺伝子+サイトカイン	control	Bmi1	Bmi1+TNF $\alpha$	Bmi1+TGF $\beta$	Bmi1+TNF $\alpha$ +TGF $\beta$
CD24 <sup>low</sup> 発現	+	+	++	++	+++

(6) 頭頸部がん臨床検体におけるポリコムおよび EMT 関連遺伝子の発現：臨床検体についての解析は TCGA コンソーシアムによる全ゲノムシーケンスデータベースを利用した。(http://www.cbioportal.org) その閣下、頭頸部がんでは Bmi1 異常が約 2% (TCGA 解析データ)、EZH2 異常 4% (Broad 解析)、Twist 1 異常 (遺伝子増幅: TCGA) が 2%、Znf277 が 1%、Slug (SNAI2: TCGA) が 7%、であった。以上の結果から、頭頸部がん幹細胞性を誘導する遺伝子のうち、臨床的には Slug の寄与が大きいことが示唆された。Slug は癌の EMT だけでなく幹細胞性を誘導することから有望な治療標的である可能性が高いことが明らかとなった。

## 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 16 件)

- Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of  $\alpha$ -synuclein. 査読有 PLoS One. 2011;6(12):e29460.
- Suzuki S, Tamai K, Watanabe M, Kyuuma M, Ono M, Sugamura K, Tanaka N. AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system. 査読有 Biochem Biophys Res Commun. 2011;408(4):582-8.
- Amano Y, Yamashita Y, Kojima K, Yoshino K, Tanaka N, Sugamura K, Takeshita T. Hrs Recognizes a Hydrophobic Amino Acid Cluster in Cytokine Receptors during Ubiquitin-independent Endosomal Sorting. 査読有 J Biol Chem. 2011; 286: 15458-72.
- Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Juliana FM, Tanaka N, Asao H. WSB-1, a novel IL-21 receptor binding molecule, enhances the maturation of IL-21 receptor. 査読有 Cell Immunol. 2011;269(1):54-9.
- Juliana FM, Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Jin L, Fujii H, Tanaka N, Hoshino T, Asao H. Apurinic/apurimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. 査読有 Biochem Biophys Res Commun. 2012 420(3):628-34
- Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. 査読有 Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. Virology. 2012 Jan 20;422(2):377-85.
- Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H, Yamamoto M. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. 査読有 Cancer Sci. 2012 Apr;103(4):760-6.
- Imai T, Tamai K, Oizumi K, Oyama S, Yamaguchi K, Sato I, Satoh K, Matsuura N, Saijo S, Sugamura K, and Tanaka N. CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. 査読有 PLoS ONE, 8, (4), e62002
- Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, Abe J, Tamai K, Tanaka N, Sato I, Takahashi S, Kondo T, Satoh K. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. 査読有 Biochem Biophys Res Commun. 436, 319-324 (2013)
- T. Sakashita, A. Homma, R. Hayashi, K. Kawabata, K. Yoshino, S. Iwae, Y. Hasegawa, K. Nibu, T. Kato, K. Shiga, K. Matsuura, N. Monden, M. Fuji: The role of initial neck dissection for patients with node-positive oropharyngeal squamous cell

- carcinomas. Oral Oncology 査読有  
doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.03.003
11. T. Sakashita, R. Hayashi, A. Homma, K. Matsuura, K. Kato, K. Kawabata, N. Monden, Y. Hasegawa, T. Onitsuka, Y. Fujimoto, S. Iwae, K. Okami, T. Matsuzuka, K. Yoshino, M. Fujii, : Multi-institutional retrospective study for the evaluation of ocular function - preservation rates in maxillary sinus squamous cell carcinomas with orbital invasion. 査読有 HEAD & NECK—DOI 10.1002/hed.23639 HED MONTH 2014
  12. 加藤健吾、松浦一登：化学放射線療法に対する栄養管理・口腔ケア。査読無。耳鼻と臨床 59巻Suppl.1, S8-S13 (2013)
  13. 本間明宏、林隆一、松浦一登、加藤健吾、川端一喜、門田伸也、長谷川泰久、鬼塚哲郎、藤本保志、岩江法、大上研二、松塚崇、吉野邦俊、藤井正人。上顎洞原発扁平上皮癌T4症例の多施設による後ろ向き観察研究。査読無。頭頸部癌 (1349-5747), 39, 310-316 (2013).
  14. 加藤健吾、松村治、菅野元、山崎克彦、齋藤文則、渡會恵介、菅野龍彦。活動性の低下した高齢者に対し補中益気湯とアマンタジンが改善効果を示した2症例。査読無。漢方医学 (0288-2485)37, 232-234. (2013)
  15. 角田 梨紗子、松浦一登、野口哲也、加藤健吾、片桐克則、今井隆之、石田英一、西條茂。経皮内視鏡的胃瘻造設術(PEG)を行った頭頸部癌患者の検討。査読無。頭頸部癌(1349-5747)37,433-438(2011)
  16. 加藤健吾、松村治、太田信之介、菅野龍彦。嚥下障害に対して半夏厚朴湯とアマンタジンおよび嚥下訓練の併用療法が著効した1症例。査読無。漢方医学 35, 276-278(2011).
  17. 志賀清人、小川武則、加藤健吾。当科における喉頭全摘術後の合併症の検討。査読無。喉頭 23, 22-25(2011)

〔学会発表〕(計 1件)

今井隆之、玉井恵一、山口壱範、佐藤郁郎、佐藤賢一、松浦一登、西條茂、菅村和夫、田中伸幸

下咽頭癌における新規がん幹細胞表面マーカー”CD271”の同定。第72回日本癌学会学術総会、横浜市 2013年10月2-5日

〔図書〕(計 1件)

松浦一登、加藤健吾：第 章 各種がんにおける栄養管理 1. 頭頸部がん。NST・緩和ケアチームのための癌栄養管理完全ガイド(比企直樹・土師誠二・向山雄人編)、234-244、文光堂(2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 健吾 (KATO, Kengo)  
東北大学・病院・非常勤講師  
研究者番号：40455788

(2)研究分担者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)  
地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長  
研究者番号：60280872

(3)連携研究者

松浦 一登 (MATSUURA, Kazuto)  
地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員  
研究者番号：70271947