

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792138

研究課題名（和文）シングルセルクローニング法を応用した口腔がん幹細胞の基礎的研究

研究課題名（英文） The basic study of the oral cancer stem cell by utilizing single cell cloning method

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：口腔がんにおいて、抗癌剤を用いた治療で奏功するがんと抵抗性を示すがんがあり、この違いのひとつの原因はがん幹細胞の存在といわれている。本研究は、がんの根源となるがん幹細胞を含む、癌を構成するすべての細胞を根絶することを目標としている。そこで、抗癌剤の一つであるシスプラチンに対する感受性の異なる細胞株を樹立して、その違いに着目することで抗癌剤抵抗性のメカニズムを調べた。シスプラチンに抵抗性を示すがん細胞では PTP4A1 遺伝子の発現が亢進し、それによって AKT タンパク質が活性化してシスプラチンによるアポトーシスに対して抵抗性を示すメカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The effect of the chemotherapy for malignant tumor is known to depend partly on the existence of cancer stem cells. Our aim is to eliminate all cells constituting cancer including cancer stem cells which play a major role in drug resistance and disease recurrence. We established several cell lines which have different chemotolerance phenotype and studied the cause of chemoresistance to cisplatin with focus on that difference. PTP4A1 gene was more expressed in cisplatin resistance cell lines compared to sensitive. PTP4A1 activated AKT activation and inhibited apoptosis induced by treatment of cisplatin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの治療は根治性の観点から外科的治療が第一選択になる場合が多い。口腔は摂食や呼吸といった生命として基本的な機能を行う器官であることはいまでもなく、発音、構音や表情の表出といった社会生活を営む上でも必要な機能を司る器官である。しかし外科的治療によってこれらの機能はしばしば障害される。そのため抗癌剤による化学療法や放射線療法などの非観血的治療法の確立が求められている。

口腔がんを含むほとんどのがんは、均一な細胞から成り立っているのではなく、不均一な細胞の集団であることがわかってきた。それらは大きく分けて2種類のタイプに分けられる。ひとつは自己複製能と多分化能をもつがん幹細胞（Cancer stem cell 以下 CSC）、もうひとつは最終的には増殖機能を失うがん細胞（Cancer cell）である。CSC は自己複製するとともに通常のがん細胞に分化し、両者ががん組織を構築している。がん細胞は細胞周期が早いため抗癌剤に感受性をもつが、

CSC は細胞周期が遅く、また薬物排出能が高いため抗癌剤に対して抵抗性を持つ。よってがんに対して抗癌剤治療を行うと、がんは一度小さくなるが、これはがん細胞が死んでいるだけであって、生き残ったごく少数の CSC が再びがん細胞を供給するため再発が起きる。つまりがん根治のためには CSC を根絶させることが必須となる。

2. 研究の目的

口腔がんにおいて、化学療法は多くの場合術前治療として用いられ、十分とはいえないが一定の効果を示している。実際に術前治療後の外科的処置による摘出物病理組織像を観察すると、化学療法のみで腫瘍が根絶していることがある。また抗癌剤治療のみによって、数年経過しても再発を来さない症例も見受けられる。つまり一部のがんは抗癌剤に対して感受性を示す。CSC ががんの発生に寄与しているならばすべての腫瘍に含まれているはずで、再発するものと根治できるものがあるということは、腫瘍の化学療法抵抗性の差異は、CSC の存在自体だけでなく腫瘍中の CSC の割合や CSC の性質の違いが奏効性を決定していると考えられる。本研究ではその違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト口腔がん細胞株 HSC-3 および SAS 細胞、及び以前樹立した細胞株 HSC-3-8 と HSC-3-10 を用いた。細胞は 37°C、5%CO₂ 下において 10% 牛胎子血清 (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) を用いて培養した。なお HSC-3、SAS 細胞は理化学研究所 (Tsukuba, Japan) から分与された。

(2) PTP4A1 発現プラスミドと PTP4A1 siRNA のトランスフェクション

PTP4A1 発現プラスミドは EGFP C1 ベクターのマルチクローニングサイトに PTP4A1 遺伝子の全長を挿入して作成した。細胞内への遺伝子導入には Hilymax (Dojin, Japan) を使用した。また siRNA による knockdown 法は PTP4A1 に特異的な siRNA (Qiagen, USA) を用い、遺伝子導入試薬として Hiperfect (Qiagen, USA) を使用した。

(3) 細胞数計測

HSC-3 細胞に遺伝子導入後 24 時間後にシスプラチンで処理し、48 時間後に PBS で 2 回洗浄してトリプシンにて細胞をディッシュから剥離し、細胞数を coulter counter にて計測した。

(4) Western blotting

細胞培養液中にシスプラチンを加え、PBS で

洗浄後、NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaF, 5 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, Protease inhibitor (sigma, MO. USA), 10% glycerol) にて可溶化、遠心後上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液は SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) にて展開後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore, MA. USA) に転写した。一次抗体として抗 Cleaved PARP、抗 p-AKT (Cell signaling, USA)、抗 β -actin (Santa Cruz Biotechnology, USA) 抗体を用い、二次抗体には HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Pierce, USA) を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce, IL. USA) にて検出を行った。

(5) Flow cytometry

HSC-3-8、HSC3-10 細胞をトリプシンにて浮遊させた後、1%BSA を含む PBS にて懸濁し Hoechst33342 にて染色後、FACS aria を用いて Side population の割合を測定した。

4. 研究成果

以前に申請者はヒト口腔癌細胞株 HSC-3 からシングルセルクローニングによって、いくつかの細胞株を樹立した。それらはシスプラチンに対する感受性が異なっており、このうち最も耐性を示した HSC-3-8 を耐性株、最も感受性を示した HSC-3-10 を感受性株として、これらに含まれる Side population (SP) の割合を FACS にて調べた。(図 1)

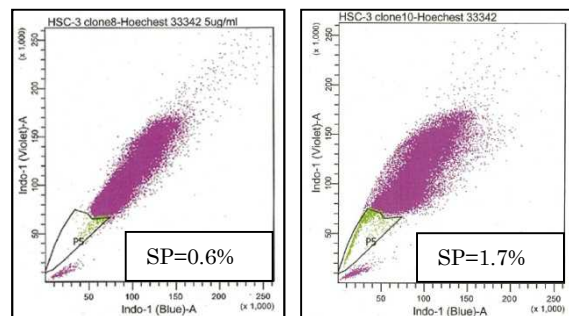


図 1 SP 細胞の割合
HSC-3-8 (左) と HSC-3-10 (右) の P5 に位置する細胞が SP 細胞を示す。

耐性株 HSC-3-8 の SP の割合は 0.6%、感受性株 HSC-3-10 では 1.7%で、予想に反して感受性株の方が SP の割合が多かった。このことは、シスプラチンに対する感受性は単純に SP の割合によるものではないことが明らかとなった。しかしこの値は、申請者がシングルセルクローニングを行ったときにシングルセルにした HSC-3 細胞から細胞株を樹立できた確率よりはるかに低かった。つまり、培養細胞から限界希釈した一つの細胞は、SP 細

胞もしくはがん幹細胞とは異なる可能性が考えられた。

そこで、申請者は CSC の存在がシスプラチン耐性に関与するのであれば、樹立した細胞株のなんらかの遺伝子発現の違いが、CSC そのものの遺伝子発現の違いや、CSC が存在するためのニッチとなる細胞の遺伝子発現の違いと関連している可能性を考えた。そこで、前述のシングルセルクローニングから樹立した細胞株 4 種のマイクロアレイ解析の結果から、シスプラチン耐性と正の相関を示す遺伝子、つまり耐性を示す細胞株でより発現が高い遺伝子を選択し耐性に関与する遺伝子の候補とした。CSC の薬剤耐性は細胞膜の薬剤透過性の亢進が関与していること、ニッチとなる細胞であれば、細胞膜に存在するタンパク質がなんらかのシグナル伝達を行なっていることを鑑みて、その選択した遺伝子のうち、細胞膜に局在するタンパク質 PTP4A1 に着目して研究を行った。

PTP4A1 は、チロシンフォスファターゼのひとつであり、肝臓の再生時に発現が上昇するタンパク質として同定された。その後、脳や消化管上皮などの正常組織にも発現していることが明らかとなった。また、いくつかの腫瘍組織において PTP4A1 の発現亢進が、細胞増殖の亢進や転移に寄与するという報告もある。

実際の PTP4A1 の局在を調べるために、EGFP タグを付与した PTP4A1 発現遺伝子を HSC-3 細胞に導入した (図 2)。EGFP-PTP4A1 を発現した多くの細胞では PTP4A1 は細胞膜に局在したが、一部細胞全体的に発現している細胞もみられた。

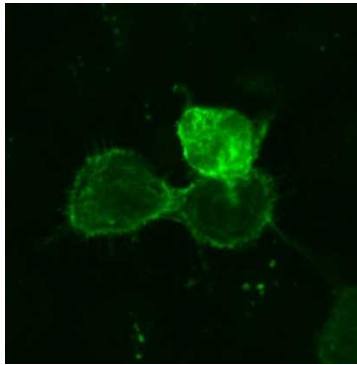


図 2 PTP4A1 の細胞内局在
EGFP-PTP4A1 を HSC-3 細胞に遺伝子導入した。多くの細胞では PTP4A1 は主に細胞膜に局在した。

次に EGFP-PTP4A1 およびコントロールベクターを HSC-3 細胞に強制発現させ、 $3 \mu\text{g/ml}$ のシスプラチンで 48 時間処理した後、生き残った細胞数を数えた (図 3)。PTP4A1 を遺伝子導入した HSC-3 細胞はコントロールベクターを導入した細胞に比べシスプラチンに抵抗性を示した。

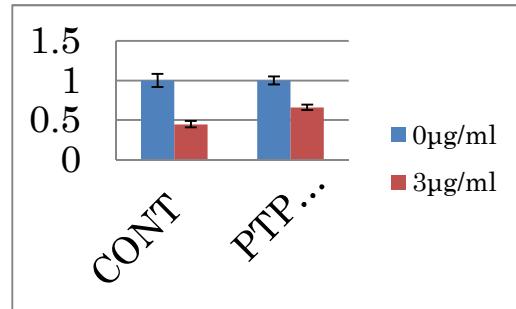


図 3 PTP4A1 のシスプラチン耐性
PTP4A1 を遺伝子導入した HSC-3 細胞はシスプラチンに抵抗性を示した。

PTP4A1 の耐性メカニズムを調べるため、EGFP-PTP4A1 発現ベクターおよびコントロールベクターを HSC-3 細胞に遺伝子導入し、 $5 \mu\text{g/ml}$ のシスプラチンで 18 時間処理した。コントロールおよび PTP4A1 強制発現細胞は同程度の AKT の活性化がみられたが、シスプラチンを作用させると、コントロールでは AKT の活性が著明に減少したのに対し、PTP4A1 を強制発現した細胞では AKT の活性化減少の割合は低かった。また切断型 PARP の発現を調べたところ、PTP4A1 を強制発現した細胞では、コントロールに比べ切断型 PARP の発現が阻害されていた (図 4)。これらのことから、PTP4A1 は AKT を活性化してアポトーシスを阻害していると考えられた。

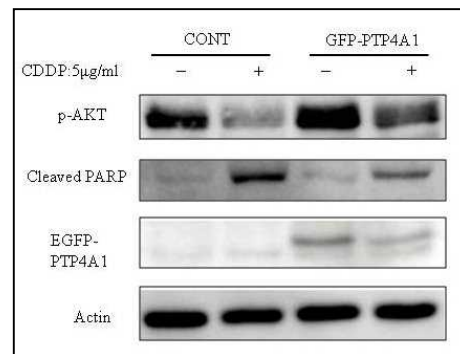


図 4 強制発現系における PTP4A1 と p-AKT、切断型 PARP の発現
HSC-3 細胞に PTP4A1 を遺伝子導入した細胞はシスプラチン存在下でも AKT の活性が高く、PARP の活性が阻害されていた。

逆に HSC-3 細胞に siRNA を遺伝子導入し、PTP4A1 の発現を抑制した細胞を用いて同様の実験を行った (図 5)。PTP4A1 の発現を抑制した細胞ではシスプラチン $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、コントロールに比べ切断型 PARP の発現は増加していた。

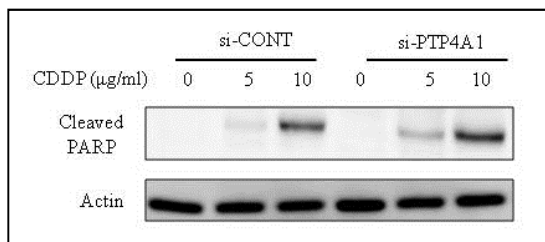


図5 knockdown系におけるPTP4A1の働き
PTP4A1をknockdownしたHSC-3細胞は、コントロールに比べシスプラチンに対する抵抗性が減弱した。

以上のことより、PTP4A1の発現亢進はシスプラチンに対してAKTを活性化することで抵抗性を示すことが明らかとなった。しかし、PTP4A1の発現とCSCの関係は明らかではなく、今後の更なる研究が必要である。

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4件)

(1) Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma. Nagamine K, Kitamura T, 他7名(2番目)、Oncol Rep. 2013 Jun;29(6):2114-8. 査読有り doi:10.3892/or.2013.2393.

(2) 小唾液腺細管状腺腫の1例、松井 英夫, 藤田 昌宏, 北村 哲也, 林 信, 佐藤 利宏、日本臨床細胞学会雑誌(0387-1193)52巻1号 Page23-27(2013.01) 査読有り

(3) E1A expression might be controlled by miR-214 in cells with low adenovirus productivity. Yanagawa-Matsuda A, Kitamura T, 他4名(1番目)、Virus Res. 2012 Dec;170(1-2):85-90. 査読有り doi:10.1016/j.virusres.2012.09.001.

(4) Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, 他6名(4番目)、Oncogene. 2011 Jun 30;30(26):2912-20. 査読有り doi:10.1038/onc.2011.14.

[学会発表] (計12件)

①北村哲也、口腔がんにおける内因性耐性遺

伝子の同定、日本臨床口腔病理学会、2012年8月31日、東京医科歯科大学

②岡田知之、北村哲也、他4名、口腔がんにおける内因性シスプラチン耐性遺伝子PTP4A1、日本病理学会、2012年4月26日、京王プラザホテル

③柏尾啓太、北村哲也、他4名、口腔がんにおける内因性耐性遺伝子の同定方法、日本病理学会、2012年4月26日、京王プラザホテル

④Tetsuya Kitamura, New approach to identify genes associated with cisplatin resistance, EDA international dental congress, 2011年10月22日, intercontinental city stars hotel, Egypt

⑤北村哲也、-震災から2ヶ月後に支援したこと、学んだこと-、口腔保健学会、2011年11月19日、北海道大学

⑥北村哲也、New methods of identify resistance genes for chemotherapy、日本臨床口腔病理学会、2011年8月24日、九州大学

⑦北村哲也、Cisplatin resistance: new method of seaching not acquired but intrinsic resistance gene、細胞生物学会、2011年6月27日、北海道大学

⑧北村哲也、抗癌剤によって誘導されない耐性遺伝子に検索の新たな試み、日本病理学会、2011年4月28日、パシフィコ横浜

[図書] (計0件)

[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：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

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