

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 1 日現在

| | |
|-----------|---|
| 機関番号： | 32622 |
| 研究種目： | 若手研究（B） |
| 研究期間： | 2011～2012 |
| 課題番号： | 23792383 |
| 研究課題名（和文） | 口腔扁平上皮癌における HIF2- α 関連脱分化誘導機構の解明と分子標的治療への応用 |
| 研究課題名（英文） | Investigation of a mechanism of HIF2-alpha-related dedifferentiation in oral squamous cell carcinoma. |
| 研究代表者 | |
| | 南雲 達人 (Tatsuhito Nagumo) |
| | 昭和大学・歯学部・助教 |
| | 研究者番号：70555078 |

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌細胞の低酸素環境における癌幹細胞様細胞への転換における HIF-2 α の役割を解析し、HIF-2 α を分子標的とした癌幹細胞様細胞の治療戦略を解析することができた。具体的には、1) 口腔扁平上皮癌細胞株からの癌幹細胞の濃縮、2) 低酸素による口腔扁平上皮癌細胞株の脱分化誘導、3) 低酸素培養癌細胞における ALDH 活性の解析、4) 低酸素培養癌細胞の遺伝子発現解析、5) 口腔扁平上皮癌細胞株における HIF-2 α の発現解析、6) HIF-2 α 遺伝子ノックダウンが低酸素環境下における脱分化に与える影響についての解析が達成された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, the mechanism of HIF-2 alpha on transformation of oral squamous cell carcinoma cells into cancer stem cells during hypoxia has been investigated, and thereby, HIF-2 alpha have been shown as a molecular target for a novel therapeutic strategy against cancer-stem-cell-like cells.

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 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：Hypoxia、扁平上皮癌、口腔癌

1. 研究開始当初の背景

i) 低酸素と脱分化

近年、様々な癌において癌幹細胞の存在が認められ、頭頸部癌でも報告されている。癌幹細胞は様々な抗癌剤や放射線療法にも抵抗性を示し、癌再発の原因細胞であるとされ (Nature, 2006, Mol. cancer, 2006)、根治の為には腫瘍形成の根本となる癌幹細胞を標的とした治療戦略が必要と考えられている。その為には癌幹細胞の生物学的特性（性状やニッチ）を正確に理解することが極めて重要である。癌幹細胞自体の性状把握はもちろんのこと、一般に癌組織内では血管構築の遅延や異常、組織内圧による微小血管の血流不足のため酸素濃度が低い領域（低酸素領域）が

生じ、未分化性を維持するのに重要な微小環境、いわゆるニッチが生じる。低酸素領域の癌細胞は癌幹細胞と類似する点が多く、低酸素がニッチとして作用し、癌細胞の脱分化が起こり、癌幹細胞様の性質を示すようになるという知見が得られてきている。

申請者らはこれまでに低酸素暴露口腔扁平上皮癌細胞においてもニッチ内細胞周期 G0/G1 期に停止することを確認し、抗腫瘍薬である 5FU に対して抵抗性を示すことを報告してきた。この現象はニッチ内において休眠状態として存在し、抗癌剤に対して抵抗性を示すという癌幹細胞の性質に類似しており、口腔扁平上皮癌細胞においても低酸素による癌細胞の脱分化現象が起こっている可能

性を示唆するものと考えた。

ii) 低酸素応答因子 Hypoxia-inducible factor

低酸素環境下の細胞はそれに対応しようとして多彩な遺伝子を発現するが、この低酸素応答で主役を演じているのが転写因子 Hypoxia-inducible factor (HIF) である。HIF にはこれまでに HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の3つのアイソフォームの存在が報告されており、今まで癌の低酸素応答に関しては特に HIF-1 α を中心に研究がなされてきた。申請者らも低酸素暴露口腔扁平上皮癌においても HIF-1 α の発現プロファイルを詳細に検討し比較的短時間での発現増強、その後の減弱といった変化を確認した。しかしながら、低酸素応答の鍵分子である HIF は、こと上皮系細胞においては、HIF-1 α よりも、HIF-2 α の発現が高いと言われており、申請者が注目する扁平上皮癌における低酸素下脱分化現象には HIF-2 α の関与が大きいのではないかとの仮説をたてた。

iii) HIF2 α と癌幹細胞

幹細胞関連遺伝子であり、iPS 細胞の脱分化において必須の遺伝子である Oct4 が HIF-2 α の特異的な標的遺伝子になっていること、また HIF-2 α が c-myc の活性を上昇させることが報告され、HIF-2 α の癌幹細胞の stemness 維持への関与が示唆されている。本研究では口腔扁平上皮癌の低酸素による癌幹細胞様転換とその機序、特に HIF-2 α との関連について検討し、低酸素環境-HIF-2 α を標的とした癌幹細胞に対する新たな治療戦略の開発を試みる。

2. 研究の目的

1) 口腔扁平上皮癌細胞の低酸素暴露による癌幹細胞様細胞への脱分化確認

各種口腔扁平上皮癌細胞を低酸素環境下で培養し、ALDH 活性、表面抗原の変化、幹細胞関連遺伝子の変化、腫瘍形成能を検討することにより、低酸素により癌幹細胞様に誘導されるかを検討する。さらに、その状態での低酸素応答因子である HIF-2 α の発現に関して遺伝子レベルと蛋白レベルで解析する。

2) 低酸素暴露口腔扁平上皮癌細胞の脱分化誘導機序を解明

HIF-2 α の siRNA を用いて HIF-2 α の機能を阻害もしくは遺伝子導入により強発現させることにより癌幹細胞様転換誘導にどのような変化が現れるのかを検討し、そのメカニズムについても解析する。また、HIF の阻害剤を用いることにより HIF を標的とした癌幹細胞治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

1) 口腔扁平上皮癌細胞株からの癌幹細胞の濃縮

癌幹細胞研究において今まで、side population 法を用いた解析が主流であった。近年頭頸部癌で Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性を用いて、高度に癌幹細胞の分離を行った報告があり (Biochem Biophys Res Commun. 2009, Head Neck. 2010)、本研究でも ALDH assay にて癌幹細胞の濃縮を行う。FACS Aria II (BD) を使用したフローサイトメトリーにより各種口腔扁平上皮癌細胞の ALDH^{high} CD44+ 分画を解析する。また、ソーティングにより分離後、NOD/SCID マウスに移植を行い、腫瘍形成能を検討することにより濃縮した細胞が癌細胞の性質を有しているか確認する。

2) 低酸素による口腔扁平上皮癌細胞株の脱分化誘導

Hypoxia workstation Inivo 2 (Ruskin) 内で口腔扁平上皮癌細胞株を 1%O₂ 下で培養し、脱分化を誘導する。低酸素環境下で幹細胞様に変化したかどうか以下の実験を行い検討する。

3) 低酸素培養癌細胞における ALDH 活性の解析

低酸素培養癌細胞における ALDH 活性、表面抗原である CD44 の発現をフローサイトメトリーにて解析する。

4) 低酸素培養癌細胞の遺伝子発現解析

低酸素培養癌細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成、TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) および ABI PRISM 7900HT を使用した、Real-time PCR で幹細胞関連遺伝子 (Oct-4、Sox2、Nanog、c-myc、Nestin、Musashi、 β -catenin)、ABC トランスポーター (MDR-1、MRP-1、ABCG2) の発現を解析する。

5) 口腔扁平上皮癌細胞株における HIF-2 α の発現解析

低酸素培養、非低酸素培養癌細胞、双方での HIF-2 α タンパクの発現を Western blotting にて解析する。

6) HIF-2 α 遺伝子ノックダウンが低酸素環境下における脱分化に与える影響についての解析

HIF-2 α 遺伝子に対する siRNA を合成し、低酸素培養癌細胞へリポフェクション法を用いて導入し、HIF-2 α 遺伝子をノックダウンする。mRNA とタンパク発現の低下で導入効率を評価する。導入した細胞について、フローサイトメトリーを用いた ALDH 活性、CD44 発現の解析、Real-time PCR による遺伝子発現解析、Sphere 形成能の解析を行い、遺伝子ノックダウンにより脱分化癌細胞が再分化する可能性を検討する。

7) HIF-2 α 遺伝子の強発現が癌細胞の脱分化に与える影響についての解析

レトロウィルスを用いた遺伝子導入による強発現細胞株を樹立する。HIF-2 α 遺伝子

を RT-PCR で増幅後、エントリークローンである pENTER-D-TOPO (Invitrogen)へサブクローニングする。それを Gateway cloning system (Invitrogen)を用いて pMXs ベクターへ転換する。レトロウイルス調整用の宿主細胞として PLAT-E packaging cells を使用し、Fugene 6 transfection reagent (Roche) でトランスフェクションを行い、24h, 48h 後細胞上清を回収する。回収した上清をフィルター濾過して、組み換えレトロウイルス液とする。レトロウイルス液と癌細胞を 24-48h 共培養することにより遺伝子導入を行う。得られた強発現株を用い、2)と同様に各種解析を行う。また、HIF の阻害剤を作用させることによる、再分化の可能性を検討する。

4. 研究成果

1) 口腔扁平上皮癌細胞株からの癌幹細胞の濃縮

ALDH assayにて癌幹細胞の濃縮を行い、FACS Aria II (BD) を使用したフローサイトメトリーにより各種口腔扁平上皮癌細胞の ALDH^{high} CD44⁺ 分画を解析した。また、ソーティングにより分離後、NOD/SCIDマウスに移植を行い、腫瘍形成能を検討することにより濃縮した細胞が癌細胞の性質を有しているか確認した。

2) 低酸素による口腔扁平上皮癌細胞株の脱分化誘導

Hypoxia workstation Inivo 2 (Ruskin)内で口腔扁平上皮癌細胞株を1%O₂下で培養し、脱分化を誘導する。低酸素環境下で幹細胞様に変化したかどうか以下の実験を行った。

3) 低酸素培養癌細胞におけるALDH活性の解析

低酸素培養癌細胞におけるALDH活性、表面抗原であるCD44の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

4) 低酸素培養癌細胞の遺伝子発現解析

低酸素培養癌細胞からtotal RNAを抽出し、Real-time PCRで幹細胞関連遺伝子 (Oct-4、Sox2、Nanog、c-myc、Nestin、Musashi、 β -catenin)、ABCトランスポーター (MDR-1、MRP-1、ABCG2) の発現を解析した。

5) 低酸素培養癌細胞のSphere形成能の解析
増殖因子を添加した無血清培地で細胞を培養することにより、Sphere (細胞塊) の形成を促す。低酸素培養、非低酸素培養でその数を比較した。

5) 口腔扁平上皮癌細胞株におけるHIF-2 α の発現解析

低酸素培養、非低酸素培養癌細胞、双方でのHIF-2 α タンパクの発現をWestern blottingにて解析した。

6) HIF-2 α 遺伝子ノックダウンが低酸素環境下における脱分化に与える影響についての解析

HIF-2 α 遺伝子に対するsiRNAを合成し、低酸素培養癌細胞へリポフェクション法を用いて導入し、HIF-2 α 遺伝子をノックダウンし、mRNAとタンパク発現の低下で導入効率を評価した。また、導入した細胞について、フローサイトメトリーを用いたALDH活性、CD44発現の解析、Real-time PCRによる遺伝子発現解析、Sphere形成能の解析を行い、遺伝子ノックダウンにより脱分化癌細胞が再分化を試みた。

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2件)

Yasuda, A., Kondo, S., Nagumo, T., Tsukamoto, H., Mukudai, Y., Umezawa, K., Shintani, S. Anti-tumor activity of dehydroxymethylepoxyquinomicin against human oral squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. Oral oncology. 47(5). 2011

Tsukamoto, H., Kondo, S., Mukudai, Y., Nagumo, T., Yasuda, A., Kurihara, Y., Kamatani, T., Shintani, S. Evaluation of anticancer activities of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. Anticancer Res. 31(9). 2011

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南雲 達人 (Tatsuhito Nagumo)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70555078

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし