

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659901

研究課題名(和文) 口腔のがん幹細胞を標的とした新規がんワクチン開発

研究課題名(英文) Development of a novel cancer vaccine that targets oral cancer stem cells

研究代表者

平塚 博義 (Hiratsuka, Hiroyoshi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50165180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がん幹細胞は口腔癌細胞株からALDEFLUOR assayでALDH1強陽性細胞(ALDH1br)として分離され。ALDH1br細胞ではがん幹細胞関連遺伝子の発現が上昇し、強い造腫瘍能と高い増殖能を持っていた。ALDH1brではSPRR1Bの発現が亢進しており、SPRR1BをノックダウンするとALDH1の発現と細胞増殖能が低下した。SPRR1B強制発現細胞ではがん抑制遺伝子であるRASSF4の発現が抑制されていた。以上の結果から、口腔癌細胞株ではALDH1br細胞にがん幹細胞が含まれ、SPRR1BはRASSF4の抑制によって細胞増殖を調整する役割を持っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer stem cells were isolated from oral cancer cell lines as aldehyde dehydrogenase 1 bright (ALDH1br) cells using the ALDEFLUOR assay. Expression of cancer stem cell-associated genes is increased in ALDH1br cells with a strong carcinogenesis and a high proliferative capacity. The small proline-rich protein-1B (SPRR1B) gene was shown to be overexpressed in ALDH1br cells. SPRR1B gene knockdown decreased the ALDH1br cell population and its proliferative capacity. Expression of the tumor suppressor gene Ras association domain family member 4 (RASSF4) was found to be suppressed in cells overexpressing SPRR1B. Our results suggest that oral cancer stem cells isolated as ALDH1br cells and SPRR1B have a role in cell growth by the suppression of RASSF4.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：口腔がん がん幹細胞 がんワクチン ALDH1

## 1. 研究開始当初の背景

(1)がん幹細胞は腫瘍の維持、再発・転移に必須であると考えられている。そのため癌を治癒させるためにはがん幹細胞を根絶することが不可欠である。がん幹細胞マーカーに関しては全てのがん幹細胞に共通するマーカーは明らかではなく、がんの組織型の違いにより様々な報告がある。口腔扁平上皮癌のがん幹細胞マーカーとして CD44 陽性細胞が報告されているが、完全に肯定されていない。

(2)口腔がんに対するワクチン療法の標的分子はきわめて限られている。研究者らは CTL の共通抗原となりうる Survivin を標的とした Survivin-2B ペプチドワクチンの第 1 相臨床試験を行い、その有効性を報告してきた。しかし、がんを治癒させるためには腫瘍の維持、再発・転移にかかわるがん幹細胞を根絶することが重要であり、がん幹細胞を標的とした分子標的治療、がん免疫治療などの研究がさまざまな領域で進められている。

## 2. 研究の目的

再発、多重がんの発生を考慮すると、口腔がんの生存率は 60-70%程度と予測される。しかも、口唇、頬粘膜原発がんは醜形を後遺し、舌、歯肉、口蓋粘膜原発がんの多くは機能障害を後遺する。よって、非侵襲的にがんを消失し、再発・転移を予防する治療法を確立する必要がある。口腔扁平上皮癌(口腔癌)におけるがん幹細胞の存在、同定は十分に明らかにされていない。本研究は、口腔癌のがん幹細胞を同定し、がん幹細胞を標的とする免疫療法の可能性を模索することにより、新たな口腔癌のがん幹細胞を標的としたワクチンを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)がん幹細胞の分離  
CD44 陽性細胞の発現を細胞株、がん組織で免疫染色によって確認を行った。  
ALDEFLUOR assay により、アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 強陽性細胞 (ALDH1<sup>br</sup>) を分離し検討を行った。

(2)がん幹細胞の同定  
ALDH1<sup>br</sup> におけるがん幹細胞関連遺伝子の発現を RT-PCR で解析をおこなった。また、NOD/SCID 免疫不全マウスをもちいて、造腫瘍能を検討した。

(3)口腔がん幹細胞の網羅的遺伝子解析  
分離された ALDH1<sup>br</sup> と ALDH1<sup>low</sup> をマイクロアレイ法を用いて解析し、ALDH1 陽性細胞で高発現している遺伝子を同定し、

その生物学的特性を解析した。

## 4. 研究成果

(1)頭頸部癌のがん幹細胞は上皮系がん幹細胞マーカーとして知られた CD44 陽性細胞として最初に分離され、報告された。しかし、CD44 陽性細胞はがん組織のみならず良性病変や健常組織でも発現が見られた。口腔扁平上皮癌細胞 8 株を材料に ALDEFLUOR assay を行った結果、ALDH1<sup>br</sup> は細胞株によりばらつきがあるものの 12.2% ~ 28.4% の分離が可能であった。

(2)ALDEFLUOR assay で分離した ALDH1<sup>br</sup> では、SOX2, Nanog, POU5F1 などがん幹細胞関連遺伝子の発現が mRNA レベルで上昇していることが確認された。ALDH1 強陽性細胞を NOD/SCID 免疫不全マウスの皮下に移植したところ、弱陽性細胞に比較し、10 分の 1 の細胞数で造腫瘍能が認められた。さらに、腫瘍の増殖能を比較したところ ALDH1<sup>br</sup> は ALDH1<sup>low</sup> に比較し、強い増殖能を示した。

(3)ALDH1<sup>br</sup> では SPRR1B (small proline-rich protein-1B) の発現が有為に亢進していた。SPRR1B を siRNA でノックダウンすると ALDH1<sup>br</sup> の割合は有為に低下した。また、SPRR1B を強制発現させた細胞では ALDH1 の発現が有為に増加した。さらに、SPRR1B を siRNA でノックダウンすると腫瘍の増殖能は低下した。SPRR1B の下流遺伝子についてマイクロアレイで検討した結果、SPRR1B 強制発現細胞では RASSF4 と STEAP1 遺伝子発現が抑制されていた。

以上の結果から、口腔癌細胞株では ALDH1<sup>br</sup> にごん幹細胞が含まれていた。口腔癌のがん幹細胞では SPRR1B 遺伝子の発現が増強されており、SPRR1B は下流のがん抑制遺伝子 RASSF4 の発現を抑制することにより、腫瘍増殖能を増大させていることが示唆された。

## 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 5 件)

: Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Fujino J, Tamura Y, Tsukahara, T, Kanaseki T, Kobayashi J, Sasaki T, Takahashi A, Nakamori K, Yamaguchi A, Hiratsuka H, Sato N.

Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 13;439(1):96-102. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.021. 査読あり

: Yamamoto T, Tamura Y, Kobayashi J, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Miyazaki A, Torigoe T, Asanuma H, Hiratsuka H, Sato N. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication. Exp Cell Res. 2013, 15;319(17):2617-26. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.07.025. 査読あり

: Shimanishi M, Ogi K, Sogabe Y, Kaneko T, Dehari H, Miyazaki A, Hiratsuka H. Silencing of GLUT-1 inhibits sensitization of oral cancer cells to cisplatin during hypoxia. J Oral Pathol Med. 2013, 42(5):382-8. doi: 10.1111/jop.12028. 査読あり

: Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, Fujino, J, Asanuma H, Tamura Y, Nakamori K, Hasegawa T, Hiratsuka H, Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. Pathol Int. 2012, 62(10):684-9. doi:10.1111/j.1440-1827.2012.02851.x. 査読あり

宮崎 晃亘、平塚 博義、医学と薬学【口腔外科疾患の病態と診断・治療】 口腔悪性腫瘍、67巻6号、2012、799-805

〔学会発表〕(計16件)

西山 廣陽, 丸山 玲緒, 竹田 康佑, 中垣 貴文, 新沼 猛, 荻 和弘, 出張 裕也, 甲斐 正広, 宮崎 晃亘, 佐々木 泰史, 時野 隆至, 平塚 博義, 鈴木 拓

Identification of long non-coding RNAs potentially involved in oral squamous cell carcinoma

第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日～27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

宮崎 晃亘, 小林 淳一, 鳥越 俊彦, 廣橋 良彦, 佐々木 敬則, 宮本 昇, 荻 和弘, 出張 裕也, 佐藤 昇志, 平塚 博義

Immunotherapeutic benefit of -interferon in survivin2B-derived peptide vaccination for patients with oral cancer 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日～27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

宮本 昇, 金関 貴幸, 高橋 あかり, Vitaly Kochin, 廣橋 良彦, 鳥越 俊彦, 平塚 博義, 佐藤 昇志

Identification of the natural antigenic peptide derived from FAM83B that is specifically expressed in cancer stem cells

第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日～27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

金子 剛, 出張 裕也, 荻 和弘, 竹田 康佑, 小林 淳一, 宮崎 晃亘, 平塚 博義 Hypoxia induced EMT is regulated by phosphorylation of GSK3- in oral

squamous cell carcinoma

第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

竹田 康佑, 佐々木 泰史, 中垣 貴文, 田村 みゆき, 大箸 智子, 井戸川 雅史, 荻和弘, 平塚 博義, 時野 隆至

Identification and characterization of intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 family target

第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

金子 剛, 出張 裕也, 五十嵐 友彦, 佐々木 敬則, 小林 淳一, 宮崎 晃亘, 平塚 博義

Wnt/ -catenin signaling pathway directly controls hypoxia induced epithelial mesenchymal transition in oral cancer

第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

佐々木 敬則, 金関 貴幸, 川見 祥代, 坂 絵利, 田村 保明, 鳥越 俊彦, 平塚 博義, 佐藤 昇志

Tumor cells exposed to microenvironmental stresses express non-classical MHC Ib that attenuates CD8+ T cell response

第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

宮崎 晃亘, 小林 淳一, 鳥越 俊彦, 廣橋 良彦, 佐々木 敬則, 宮本 昇, 出張 裕也, 荻和弘, 佐藤 昇志, 平塚 博義

口腔がんに対するサバイピン 2B ペプチドワクチン・インターフェロン併用療法の臨床試験

第 52 回日本癌治療学会学術集会 2014 年 8 月 28 日～30 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

宮崎 晃亘, 小林 淳一, 佐々木 敬則, 藤野 準己, 五十嵐 友彦, 仲盛 健治, 平塚 博義

進行・再発口腔がんに対するアジュバント併用 survivin-2B ペプチドワクチン療法 第 37 回日本頭頸部癌学会、2013 年 6 月 13 日～14 日、京王プラザホテル（東京都）

佐々木 敬則, 金関 貴幸, 川見 祥代, 田村 保明, 鳥越 俊彦, 平塚 博義, 佐藤 昇志

細胞ストレスにより提示される MHCI 抗原ペプチド

第 16 回日本がん免疫学会総会 2012 年 7 月 26 日～28 日、北海道大学（北海道札幌市）

〔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：  
出願年月日：  
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

平塚 博義 (HIRATSUKA, Hiroyoshi)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50165180

(2) 研究分担者

出張 裕也 (DEHARI, Hironari)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00381260

宮崎 晃巨 (MIYAZAKI, Akihiro)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10305237

荻 和弘 (OGI, Kazuhiro)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40433114

道振 義貴 (MICHIFURI, Yoshitaka)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：00457722

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：