

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：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792005

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮がん幹細胞増殖における新規幹細胞分子SPRR1Bの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of oral cancer stem cell related gene, SPRR1B

研究代表者

道振 義貴 (MICHIFURI, Yoshitaka)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00457722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ヒト口腔がん細胞株よりAldefluor法を用いてがん幹細胞を分離した。口腔がん幹細胞の遺伝子発現プロファイルをcDNAマイクロアレイ法にてスクリーニングした結果、口腔がん幹細胞にはSPRR1B分子が高発現することを見出した。また、遺伝子ノックダウンおよび過剰発現により、SPRR1Bは、RASシグナルを介して、口腔がん幹細胞の細胞増殖に関わっている事を見出した。当該結果は、治療抵抗性口腔がん幹細胞に対して新たな治療戦略としてSPRR1Bが標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated oral cancer stem-like cells(CSCs)/cancer-initiating cells(CICs) by aldefluor assay. A cDNA microarray analysis revealed that SPRR1B is preferentially expressed in oral CSCs/CICs. Gene overexpression and gene knockdown experiments revealed that SPRR1B has a role in the cell growth of oral CSCs/CICs by activation of RAS signal. These observations indicate that SPRR1B might be a promising molecular target for treatment resistant oral CSCs/CICs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：口腔がん がん幹細胞 SPRR1B

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、(1)高い造腫瘍能、(2)自己複製能、(3)多分化能を有する細胞群と定義される。また、がん幹細胞は(i)休止期にある、(ii)トランスポート分子の発現が高い、(iii)抗アポトーシス分子(IAP)の発現が高い、(iv)活性酸素が低い等の機序により、化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療に対して抵抗性を示す事が示されている。これらの性質を有する為、がん幹細胞は治療後の再発や、遠隔転移といったがん患者の予後を直接左右するイベントに関わると考えられている。しかしながら、がん幹細胞における分子機構は不明な点が多い。

ALDEFLUOR 法は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)活性により緑色に発色する色素を用いたアッセイで、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する細胞を分離する為に使われる。また、がん幹細胞では、ALDH1 の発現が高い事が知られており、様々ながん種で ALDEFLUOR 法を用いてがん幹細胞の分離に成功したとの報告がなされている。申請者らは、複数の口腔扁平上皮がん細胞株からがん幹細胞を分離する為に、ALDEFLUOR 法にて検討した。その結果、POT1, OSC19, OSC20, OSC40, OSC70, SAS, HSC2 等の細胞株から ALDH1^{high} 細胞群を分離することに成功した。また、POT1 細胞から分離した ALDH1^{high} 細胞は、免疫不全マウス(NOD/SCID)に移植すると、ALDH1^{low} 細胞と比較して優位に造腫瘍能が低く、ALDH1^{high} 細胞中にごがん幹細胞が濃縮されていることを明らかにした(未発表データ)。

申請者らは、口腔扁平上皮がん幹細胞の分子メカニズムを明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いて、ALDH1^{high} 細胞特異的遺伝子をスクリーニングした結果、Small proline-rich protein 1B (SPRR1B)分子を同定した。SPRR1B 分子は、POT1, OSC19, OSC20, OSC70 等複数の口腔扁平上皮がんより分離した ALDH1^{high} 細胞において発現が高く、口腔扁平上皮がん幹細胞で共通して発現する分子である事が示唆される。

SPRR1B 分子の機能解析を進める為に、SPRR1B 分子過剰発現および遺伝子ノックダウンの効果を、SPRR1B 過剰発現細胞株、siRNA トランスフェクションにより確認した。その結果、SPRR1B 過剰発現株

では POT1 の細胞増殖能を亢進し、反面、遺伝子ノックダウンにより細胞増殖能が抑制された。この事は SPRR1B 分子ががん細胞の細胞増殖に関わっている事を示唆するものである。

SPRR1B による細胞増殖に与える効果の分子メカニズムを明らかにするために、SPRR1B 過剰発現株および SPRR1B siRNA で、発現の変化する遺伝子群を DNA マイクロアレイにてスクリーニングした。その結果、SPRR1B 分子が負の制御をする分子候補として Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4 (RASSF4)を同定した(未発表データ)。RASSF4 は RAS シグナルを抑制するがん抑制分子として知られている。この事は、扁平上皮がんが発現する SPRR1B 分子が RASSF4 分子の発現を抑制し、RAS/MAPK シグナルを間接的に活性化することにより細胞増殖を起こす可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮がん幹細胞の分子メカニズムを解析するために、口腔扁平上皮がん株からがん幹細胞分画を ALDH1^{high} 細胞として分離し、ALDH1^{high} 細胞に高発現する分子として、Small proline-rich protein 1B (SPRR1B)分子を同定した。本申請期間中に、SPRR1B の細胞増殖に関わる分子メカニズムの解析を進める。

3. 研究の方法

(1)口腔がん幹細胞の分離

がん幹細胞の分離法として、(1)CD44, CD133 等の細胞表面マーカーによる分離、(2)Side Population (SP)法、(3)Aldefluor 法、(4)Sphere 培養法などが知られている。本研究において、(3)Aldefluor 法を用いて、ヒト口腔がん細胞株 (POT1)よりがん幹細胞を分離した。

(2)口腔がん幹細胞のトランスクリプトーム解析

分離したがん幹細胞のトランスクリプトームを、非がん幹細胞を比較対象として cDNA マイクロアレイによりスクリーニングした。

トランスクリプトーム解析によりがん幹細胞特異的発現を示す候補分子群に関しては、正常臓器および他のがん細胞における発現を RT-PCR にて確認し、正常臓器における発現が無い、もしくは限定されており、がん幹細胞特異的発現を示す分子を選択した。

(3)SPRR1B 分子の機能解析

SPRR1B 分子の機能解析を行うために、SPRR1B 特異的 siRNA をデザインした。また、SPRR1B のアミノ酸コーディング配列をクローニングし、レトロウイルスベクター (pMXs-puro) にサブクローニングした。同コンストラクト

を用いて、SPRR1B 過剰発現株を作成した。SPRR1B ノックダウンおよび過剰発現による形質の変化を検討した。

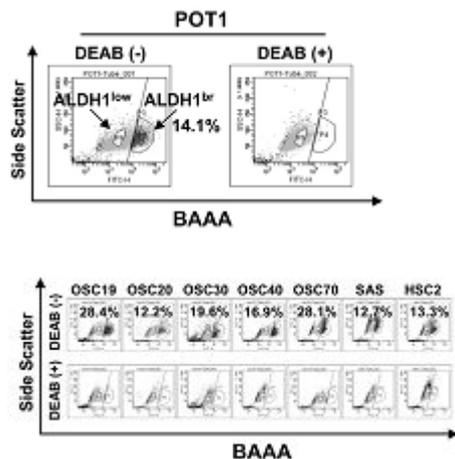
(4)SPRR1B 分子関連分子の検索

SPRR1B 分子が制御する因子を検討するために、SPRR1B ノックダウンおよび SPRR1B 過剰発現による遺伝子発現の変化を cDNA マイクロアレイ法にてスクリーニングした。同スクリーニングにて同定された RASSF4 分子機能解析を進めるため RASSF4 特異的 siRNA をデザインし、検討した。

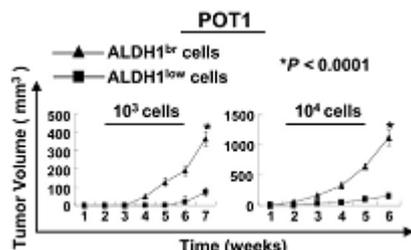
4. 研究成果

(1)口腔がん幹細胞の分離

ヒト口腔がん細胞株からがん幹細胞を分離するために Aldefluor 法を用いて解析した。口腔がん株 POT1 からは 14%程度の ALDH^{br} 細胞を検出した。また、他の口腔がん株からは 10%-30% 程度の ALDH^{br} 細胞を検出した(下図1)。



ALDH^{br} 細胞に、がん幹細胞が濃縮されていることを確認するために、免疫不全マウスに ALDH^{br} 細胞および ALDH^{low} 細胞を移植した。その結果、ALDH^{br} 細胞の方が有意に高い造腫瘍能を示した(下図2)。

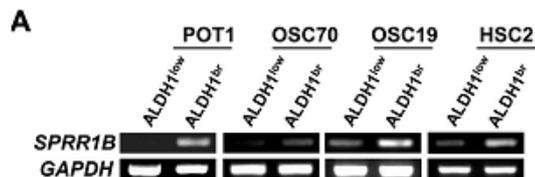


これらの結果は、ALDH^{br} 細胞にがん幹細胞が濃縮されていることを示唆する。

(2)口腔がん幹細胞のトランスクリプトーム解析

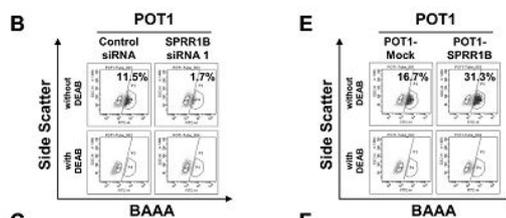
POT1 細胞由来 ALDH^{br} 細胞に濃縮される口腔がん幹細胞に発現する遺伝子群をスクリ

ーニングするために、cDNA マイクロアレイ法を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。その結果 SPRR1B (small proline-rich protein 1B)遺伝子が、複数の口腔がん幹細胞に優位に発現を示す事が確認された(下図3)。

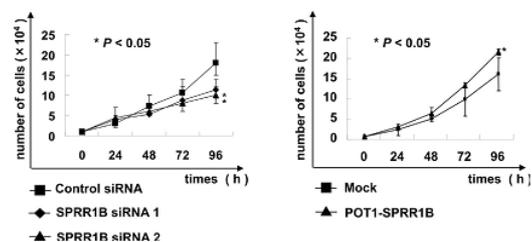


(3)SPRR1B 分子の機能解析

SPRR1B 分子の機能解析を進めるため siRNA によるノックダウンおよび、SPRR1B 過剰発現株の Aldefluor 解析および invitro における細胞増殖能を検討した。その結果、SPRR1B ノックダウンにおいて ALDH^{br} 細胞の減少、SPRR1B 過剰発現において、ALDH^{br} 細胞の増加を観察した(下図4)。



さらに、in vitro における細胞増殖能を検討した結果、SPRR1B ノックダウンにおいて細胞増殖の低下が、SPRR1B 過剰発現において細胞増殖能の亢進がみられた(下図5)。

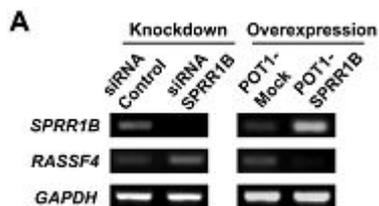


これらの結果から、SPRR1B は、口腔がん幹細胞の維持および細胞増殖に寄与する可能性が示唆された。

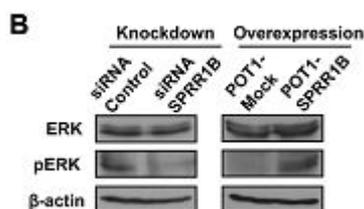
(4)SPRR1B 分子関連分子の検索

SPRR1B の下流で働く分子を明らかにするため、SPRR1B ノックダウンおよび SPRR1B 過剰発現による遺伝子発現の変化を cDNA マイクロアレイ法にてスクリーニングした。その結果、SPRR1B により負に制御される分子候補として RASSF4(Ras Association (RaIGDS/AF-6) Domain Family Member 4)を同定した。すなわち SPRR1B ノックダウンにより RASSF4 発

現亢進、SPRR1B 過剰発現により RASSF4 発現抑制を観察した(下図6)



RASSF4 は RAS シグナル伝達を負に制御する癌抑制遺伝子として報告されている(Cancer Res 2004, 64, 8688-93)。そこで、SPRR1B ノックダウンおよび過剰発現による RAS シグナル活性を、ERK リン酸化状態で検討した。その結果、SPRR1B ノックダウンにより、ERK のリン酸化が低下、SPRR1B 過剰発現により ERK のリン酸化が亢進していた(下図7)



SPRR1B ノックダウンによる ERK リン酸化低下は、RASSF4 のノックダウンによりキャンセルされた。すなわち、SPRR1B が RASSF4 発現を負に制御することにより、RAS シグナルを更新し、ALDH^{br} 細胞における細胞増殖亢進に寄与する可能性が示唆された。

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2件)

1: 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 Sep 13;439(1):96-102.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.021. (査読あり)

2: 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 Oct;62(10):684-9.
doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02851.x. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

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