

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463093

研究課題名(和文) 癌幹細胞に着目した口腔癌の新たな治療戦略 - SALL4の治療への応用 -

研究課題名(英文) A new treatment strategy focused on the novel oncogene SALL4 in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

太田 和俊 (OTA, KAZUTOSHI)

熊本大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：20336209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)の生検時標本ではSALL4(sal-like4)が過剰発現し、浸潤様式と相関関係がみられた。SALL4は胚性幹細胞やiPS細胞の増殖あるいは未分化維持に関与しているため、口腔扁平上皮癌細胞株にセルソーティングを行い、SP細胞ではSALL4の発現がnon-SP細胞に比べ有意に増加していることがわかった。さらに5-FU耐性SAS細胞株においてSALL4発現抑制を行うと抗癌剤耐性が緩和した可能性があることを示した。また、OSCC細胞株でSALL4発現を抑制すると、Bmi-1の発現を減少することを示した。これらの結果は第22回国際顎顔面外科学会で報告した。

研究成果の概要(英文)：Expression of SALL4(sal-like4) mRNA in primary oral squamous cell carcinoma (OSCC) specimens was found to be significantly correlated Mode of Invasion and indicated of a relation of malignant potential. Fluorescence-activated cell sorter analysis demonstrated the existence of SP in OSCC cells and the expression of SALL4, which is associated with embryonic development and induced pluripotent stem (iPS) cells, was significantly upregulated in SP cells as compared with non-SP cells. We demonstrated that chemoresistance to 5-fluorouracil agents was weakened by inhibition of SALL4 in the 5-FU-resistant OSCC cell lines and expression of Bmi-1 was activated by SALL4. We presented SALL4 may also represent a therapeutic target of chemoresistance at 22th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 SALL4 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔扁平上皮癌 (OSCC) の治療は、外科的切除が最も確実性が高い方法と考えられているが単独での生存率向上は困難であり、化学療法、放射線療法を組み合わせた併存療法が多く施設で行われている。我々の施設においても術前放射線化学療法後に外科療法を行い治療成績の向上に努めてきた。しかし術前治療に対し局所の組織学的効果 (大星・下里分類) が a 以下で治療抵抗性の腫瘍では、再発率が高く生存率が低くなることわかってきた。

(2) 術前放射線化学療法 S-1 (TS-1^R) + 放射線 30Gy 後に手術を行った症例の生検時の組織を用いて、治療奏功症例 (大星・下里分類 もしくは) と非奏功症例 (組織学的効果) の生検時の検体を用いて cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析により比較検討を行った。その結果、非奏功症例に高発現している遺伝子の中で胚性幹細胞 (ES 細胞) や iPS 細胞の自己複製や多分化に必須である SALL4 遺伝子に着目した。

(3) SALL4 は眼球運動異常や四肢、心臓等の形成異常を呈する Okihiro 症候群の原因遺伝子とされ、その機能としては、Sox2、Oct3/4、Nonog とネットワークを形成し、未分化性を支持する遺伝子の転写活性化や分化を支持する遺伝子の転写を抑制していることが示されている。一方で SALL4 のトランスジェニックマウスでは週齢の早期から骨髄異形成症候群や白血病を高率に発症することがわかり、急性骨髄性白血病やリンパ芽球性白血病/リンパ腫では SALL4 が高発現し発癌遺伝子として作用していることが報告された (Ma Y, et al. BLOOD 2006, Cui W, et al. Mod Pathol. 2006, Shuai X, et al. Cancer Genet Cytogenet. 2009)。さらに白血病細胞では SALL4 がポリコム遺伝子である Bmi-1 を通して制御し癌細胞をアポトーシスに誘導することが報告された (Yang J, et al. BLOOD 2008)。Bmi-1 を発現しない白血病細胞では幹細胞の性質を持たず増殖停止が起こることが知られている (Lessard J, Sauvageau G. Nature. 2003)。Bmi-1 が SALL4 の標的因子であることは興味深く、SALL4 発現抑制による癌幹細胞標的療法の可能性も示唆される。その後、固形癌である肺癌や乳癌においても SALL4 が早期から発現し、癌細胞の増殖に深く関与していることが報告され始めていた (Kobayashi D, et al. Int J Oncol. 2011, Kobayashi D, et al. Oncol Rep. 2011)。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌 (OSCC) の生存率向上には抗癌剤耐性や放射線療法耐性などの問題解決が必須と考えられ、これらの問題には癌幹細胞が強く関わっていることが示唆されている。本研究では胚性幹細胞 (ES 細胞) や iPS

細胞の増殖あるいは未分化維持に關与している SALL4 (sal-like 4) 遺伝子に着目し、以下の項目を明らかにすることで耐性能を有した腫瘍細胞を死滅させることを目的とする。

- (1) OSCC における癌幹細胞の同定
- (2) SALL4 の発現と薬剤耐性への関連
- (3) SALL4 を用いた耐性克服治療への可能性

3. 研究の方法

(1) SP 細胞を利用した癌幹細胞の同定
・OSCC 細胞株である SAS 細胞株、HSC2 細胞株、HSC3 細胞株、HSC4 細胞株、OSC19 細胞株に DNA 結合色素である Hoechst33342 で染色し、フローサイトメトリーで SP 細胞の検出を行う。SP 細胞が多くみられた細胞株を用いて、これらの SP 細胞が幹細胞特異的な性質を持つかを解析するため、セルソーターを用いて SP 細胞、non-SP 細胞に分離した後に継体培養を行い、さらにフローサイトメトリーを用いて SP 細胞の有無を解析する。

(2) SP 細胞、non-SP 細胞における SALL4 の発現確認

・上記実験において SP 細胞、non-SP 細胞における SALL4 の発現確認と継体培養による発現変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析する。

(3) OSCC 細胞株における SALL4 発現抑制解析 (薬剤耐性)

・RNAi による Loss of function の解析手法を用いて、SALL4 の薬剤耐性に対する病態解析を行い新たな治療法への可能性を検討する。具体的には OSCC 細胞の中で SALL4 が高発現していた SAS 細胞株と、当分野で作成した 5-FU 耐性 SAS 細胞株 (Nagata M, et al. Br J Cancer 2012) を用いて RNAi 誘導ベクターで SALL4 発現抑制を行い、抗癌剤 (5-FU 製剤) を投与した際の抗腫瘍効果について比較検討を行う。

(4) 臨床検体における SALL4 発現と組織学的効果判定、予後との相関

・術前放射線化学療法後に外科療法を行った症例の生検時組織における SALL4 遺伝子発現と、術後検体における組織学的効果 (大星・下里分類) 予後との関連を検討する。SALL4 発現は組織破碎後に RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析する。また、SALL4 発現と組織学的効果に相関が見られない場合には、得られた遺伝子も含めた耐性獲得細胞のスクリーニングについて検討を行う。

(5) OSCC 細胞株における SALL4 発現抑制解析

・(3) で用いた手技を用いて SAS 細胞株で

SALL4 発現抑制を行い、SALL4 の標的因子とされる Bmi-1 の発現変化とアポトーシス、細胞周期の解析を行う。

(6) SALL4 発現抑制 OSCC 細胞株のモデルマウスへの影響

・ Scid マウスに OSCC 細胞株と SALL4 発現抑制処理した OSCC 細胞株を皮下に移植してモデルマウスを作成し、腫瘍の大きさや増殖スピード、マウスの母体に対する影響について検討を行う。次にそれぞれのモデルマウスに抗癌剤 (5-FU) を投与し、経時的な腫瘍の縮小率を計測し抗腫瘍効果の変化についても検討を行う。

(7) モデルマウスにおける SALL4 を用いた耐性能変化の検討

・ Scid マウスの皮下に 5-FU 耐性 SAS 細胞株を移植してモデルマウスを作成する。SALL4 siRNA をモデルマウスの腹腔内に投与し、腫瘍の大きさを経時的に計測する。また、同時に体重測定も含め母体への影響を観察する。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞株 - SAS 細胞, HSC-3 細胞, HSC-2 細胞, KB 細胞, Ca9-22 細胞 - に DNA 結合色素である Hoechst33342 を処理後、フローサイトメトリーで解析後に非染色細胞を SP 細胞、染色細胞を non-SP 細胞としてセルソーティングを行った。その後、継代培養を行いながら SALL4 の発現を比較したがいずれの細胞株も、SP 細胞が non-SP 細胞に比べ有意に発現が増加していた。この結果は癌幹細胞の可能性が高いと考えられる Hoechst33342 で処理した SP 細胞でも ES 細胞と同様に SALL4 の発現が重要な役割を担っていると考えられた。

(2) OSCC 細胞株に RNAi を用いて、SALL4 の薬剤耐性に対する病態解析を行った。OSCC 細胞の中で SALL4 が高発現していた SAS 細胞株と、当分野で作成した 5-FU 耐性 SAS 細胞株を用いて RNAi 誘導ベクターで SALL4 発現抑制を行った。その結果、SALL4 発現抑制を行うとどちらの細胞株もコントロールに比べ細胞の増殖能は減少した。さらに抗癌剤 (5-FU) を投与した場合には、SAS 細胞株も 5-FU 耐性 SAS 細胞株も細胞は同様に死滅した。この結果は、SALL4 の発現抑制が抗癌剤耐性を緩和した可能性を示唆している。

(3) 臨床検体を用いて術前放射線化学療法後に外科療法を行った症例の生検時組織における SALL4 の遺伝子発現とタンパク質発現をリアルタイム RT-PCR 法と免疫組織学的に確認しステージ分類や T 分類、頸部リンパ節転移、分化度、腫瘍浸潤様式、術後検体における組織学的効果 (大星・下里分類) 予後

との相関を検討した。その結果、臨床病理学的因子の中では SALL4 mRNA の発現と腫瘍浸潤様式において有意差が認められ、3 型と 4 型で SALL4 の発現が多く認められた。また、術後検体において組織学的効果判定が Grade0、Grade1、Grade2 症例において SALL4 mRNA 発現が高い傾向にはあったが有意差は認められなかった。また、SALL4 mRNA の発現と予後についても検討を行ったが有意な結果は得られなかった。

Relationship between clinical parameters and SALL4 mRNA expression

Clinical parameters	No. of patients	SALL4 mRNA expression		P-values
		Mean	SD	
Clinical stage	I	41	73.4 ± 117.4	0.391
	II	34	33.1 ± 53.7	
	III	18	45.0 ± 72.9	
	IV	51	71.7 ± 140.3	
Tumor size (mm)	<40	68	43.5 ± 75.9	0.133
	≥40	46	74.8 ± 143.7	
Cervical lymph node Metastasis (N factor)	N(-)	53	71.2 ± 137.3	0.170
	N(+)	61	43.1 ± 75.3	
OSCC differentiation	Well	75	52.6 ± 107.0	0.734
	Moderately	29	69.3 ± 128.0	
	Poorly	10	43.9 ± 57.5	
Mode of Invasion*	Grade 1,2	31	19.7 ± 40.6	0.014
	Grade 3,4	83	69.7 ± 122.8	

*Mode of Invasion
 Grade 1: Well defined borderline
 Grade 2: Cords, less marked borderline
 Grade 3: Groups of cells, no distinct borderline
 Grade 4: Diffuse invasion
 Willen R, 1975)

(4) SALL4 に関連する遺伝子を調査するため siRNA によって OSCC 細胞株 (SAS 細胞株) の SALL4 発現により減少する遺伝子について検討を行った。SALL4 siRNA を用いて SAS 細胞の SALL4 発現を抑制すると、Bmi-1 の発現が有意に減少することが判明し、口腔扁平上皮癌においても SALL4 が上流で Bmi-1 の発現をコントロールしている可能性を示唆した。

(5) Scid マウスの皮下に当研究室で作成した 5-FU 耐性 SAS 細胞株を移植してモデルマウスを作成し、SALL4 発現抑制を抑制することで 5-FU 耐性の減弱が得られるかの実験を行ったが、SALL4 発現抑制が困難であり有意な実験結果は得られなかった。

引用文献

Ma Y, Cui W, Yang J, Qu J, Di C, Amin HM, Lai R, Ritz J, Krause DS, Chai L., SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. Blood. 2006 Oct 15;108(8):2726-35

Cui W, Kong NR, Ma Y, Amin HM, Lai R, Chai L., Differential expression of the novel oncogene, SALL4, in lymphoma, plasma cell myeloma, and acute lymphoblastic leukemia. Mod Pathol. 2006 Dec;19(12):1585-92.

Shuai X Cytogenet. 2009 Oct 15;194(2):119-24.
 doi:10.1016/j.cancerencyto.2009.06.006

Yang J, Chai L, Gao C, Fowles TC, Alipio Z, Dang H, Xu D, Fink LM, Ward DC, Ma Y., SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):805-13.
doi: 10.1182/blood-2007-11-126326

Lessard J1, Sauvageau G., Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):255-60.

Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N., SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer. *Int J Oncol*. 2011 Apr;38(4):933-9.
doi: 10.3892/ijo.2011.929.

Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N., Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. *Oncol Rep*. 2011 Oct;26(4):965-70.
doi: 10.3892/or.2011.1374.

Nagata M, Nakayama H, Tanaka T, Yoshida R, Yoshitake Y, Fukuma D, Kawahara K, Nakagawa Y, Ota K, Hiraki A, Shinohara M., Overexpression of cIAP2 contributes to 5-FU resistance and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* (2011) 105, 1322 - 1330

5 . 主な発表論文等 〔学会発表〕(計1件)

Ota K, Shinriki S, Ando Y, Nakayama H, M. Shinohara M., Overexpression of the novel oncogene SALL4 in oral squamous cell carcinoma. 22th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. 27-30, Aug, 2015. Melbourne, Australia.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

太田 和俊 (OTA, Kazutoshi)
熊本大学医学部附属病院
非常勤診療医師
研究者番号 : 20336209

(2)研究分担者

篠原 正徳 (SHINOHARA, Masanori)
熊本大学医学部附属病院
非常勤診療医師
研究者番号 90117127