

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861603

研究課題名(和文)新規頭頸部がん幹細胞マーカーCD271の解析と治療戦略への応用

研究課題名(英文)CD271+ cancer stem cells: a novel therapeutic target of head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

今井 隆之 (IMAI, TAKAYUKI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：80408583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌幹細胞マーカー候補CD271に焦点を当て、頭頸部がん幹細胞の細胞生物学的特徴の解析を行った。第一に免疫不全マウスを用いた頭頸部癌細胞の異種移植系の構築に成功した。次いでCD271+細胞の癌幹細胞としての性質を調べたところ、高い造腫瘍能を示した。増殖した腫瘍ではCD271+細胞からCD271-が生じておりヘテロ分化能を有していた。腫瘍スフェアではCD271+分画の割合が増加しており、幹細胞性と一致すると考えられた。CD271+細胞はCDDPに対して抵抗性を示した。さらにCD271発現と患者予後は関連していた。以上の結果からCD271は新たな頭頸部癌幹細胞マーカーであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells contribute to the malignant phenotypes of a variety of cancers, but markers to identify human head and neck cancer (HNSCC) stem cells remain elusive. Several patient-derived xenograft (PDX) lines were established, and CD271+ population sorted from PDX-derived cells showed an enhanced tumor-initiating capability in immunodeficient mice. Tumors generated from the CD271+ cells contained both CD271- positive and -negative cells, indicating that the population could undergo differentiation. Accordingly, tumor-spheres contained more CD271+ cells than those from the normal in vitro culture condition. After the CDDP treatment, in vivo tumors contained increasing number of CD271+ cells, suggesting CD271+ cells are chemoresistant. Furthermore, using primary specimens, I found that high CD271 expression was correlated with a poor prognosis for patients. Together, the present findings indicate that CD271 is a novel marker for HNSCC stem-like cells and for the prognosis.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：癌 頭頸部扁平上皮癌 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌は世界的に発症数が多い癌の1つであり、発見時に既に進行癌となっている症例も多いことから新しい治療法開発が期待されている。頭頸部癌は咽頭・喉頭等に発生し、咀嚼、呼吸、嚥下等の生体機能を損なうことから、単に生命予後のみならずQOLの観点からもその克服が急がれている。頭頸部癌の大部分は扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma) である。組織学的に強い角化傾向を呈し、原発部位と転移部位に硬い腫瘍を形成しながら頭部・頸部さらに体幹へとリンパ管・静脈に沿って浸潤・転移する。

(2) 最近になって「がん幹細胞」(Cancer Stem Cell, Cancer Initiating Cell) が悪性形質の発現に重要な役割を果たしていることが報告された。一般に、がん細胞は①増殖能亢進、②不死化、③浸潤・転移、という3つの特性を持つ。しかしながら、がん組織を構成するがん細胞のすべてが、これらの特徴を持っているわけではなく、一部の細胞が腫瘍形成能を有するのみである。これら一部の特殊な細胞群は、1) 自己複製能、2) 分化能、という2つの特徴を持ち、自己複製により同一の未分化形質を維持しながら大多数のがん細胞を生み出している。「がん幹細胞」を悪性の起源とし、がんが発生・進行するという「がん幹細胞仮説」は頭頸部癌にも当てはまると想定されるが、頭頸部癌 (扁平上皮癌) の幹細胞マーカーについてはCD44等の一部分を除いて、十分な解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

ヒト頭頸部癌に着目し、癌幹細胞を同定し、これら細胞集団に特徴的に発現する細胞マーカー分子の同定と解析を行う。頭頸部癌に含まれる癌幹細胞の特性を明らかにするために、頭頸部扁平上皮癌から既知がん幹細胞マーカー (CD44 等) を指標として細胞分画し、それらを超免疫不全マウス NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) に移植する。腫瘍形成能の高い細胞分画と腫瘍形成能の低い細胞分画について、網羅的な遺伝子発現を比較することで、がん幹細胞性を規定する新たな細胞表面マーカーの同定を行うことを目的とする。さらに、スフェア形成能との関連性および幹細胞性マーカーの発現との関連性を探る。一般にがん幹細胞には抗癌剤耐性が認められるため、治療モデルを作成し癌幹細胞マーカーと治療抵抗性の関連について解析する。また、患者予後との関連について調査研究することで、新たに同定した癌幹細胞マーカーが診断マーカーとしても有用であるか明らかにする。以上の解析により、*in vitro* および *in vivo* の両面から頭頸部癌幹細胞マーカーを解析し、悪性形質との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト頭頸部癌検体に由来する Patient-derived Xenograft (PDX)株の構築：宮城県立がんセンター頭頸科においてインフォームド・コンセントの得られた手術検体を NOG マウスに異種移植する。NOG マウスを用いて腫瘍組織を継代することで頭頸部癌 PDX 株を樹立する。*in vitro* 培養可能な細胞株を樹立し、以下の癌幹細胞解析に用いる。

(2) 頭頸部癌細胞を用いたがん幹細胞の同定：がん幹細胞分画に用いられているマーカーである CD44 発現の有無をフローサイトメトリーにて検討する。セルソーターによって CD44 発現の程度に基いて細胞を分画し、各細胞分画を NOG マウスに移植する。*in vivo* において腫瘍形成能が最も高い細胞分画、最も低い分画を同定し取得することで最良のがん幹細胞マーカーを決定する。さらに、関連分子についても解析を行うことで新規マーカーを同定する。

(3) *in vitro* における腫瘍形質の解析：選抜した細胞表面マーカーの発現に注目し、腫瘍形成能細胞が高い分画と低い分画について、*in vitro* での細胞増殖能、スフェア形成能等を比較検討する。

(4) 臨床検体を用いた新規がん幹細胞マーカー発現解析：手術にて切除した病理標本を用いて免疫組織染色による検討を行い、組織内のがん幹細胞の局在、血管との関係について解析する。

(5) 患者予後因子としての解析：臨床ステージとの関連、予後との関連との関係性を解析することで診断マーカーとしての有用性がある解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト頭頸部癌に由来する PDX 株の構築：頭頸部癌細胞株として FaDu、HPC1-3 等の既存細胞株を用いたところ、極めて少数の細胞 (1~100 細胞程度) 移植によって腫瘍が形成された。悪性度が高くヘテロ性が失われているものと判断した。そこで患者由来細胞を用いた解析を行うこととした。切除検体を NOG マウスの皮下に異種移植し数代の継代を行うことで、複数の PDX (Patient-Derived Xenograft) 株 HPCM を得た。HPCM2 は *in vitro* でも培養可能であったため、これを選抜し以後の解析に使用した。

(2) 新規がん幹細胞マーカーCD271の同定：

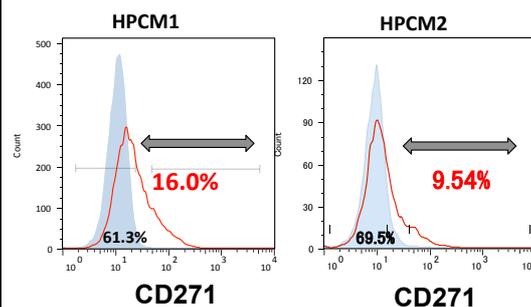


図1. CD271を高発現する細胞が約10%程度存在した

CD44 の発現による造腫瘍能の差異は HPCM2 ではわずかであった。一方、粘膜基底層にある正常組織幹細胞マーカーである CD271 を同時に検討した。FACS 解析では複数の細胞株で CD271+細胞群を認めた(図 1)。次に CD271 発現によりセルソーター (FACS AriaII) で細胞を分取したところ、CD271+分画では腫瘍形成が高いことが明らかとなった(表 1)。

表 1. CD271陽性細胞分画は高い造腫瘍性を示した

移植細胞数	1,000	300	100
CD271positive	4/8	1/6	0/4
CD271negative	1/8	0/6	0/4

この結果から、CD271 は頭頸部癌幹細胞マーカーである可能性が高いと考えられた。

(3) CD271 発現とスフェア形成能との関連：癌幹細胞は低栄養のスフェア培養培地において球状の塊 (スフェア) を形成することが知られている。そこで HPCM2 を用いてスフェア形成を行った。スフェア形成細胞と in vitro 培養細胞を比較検討したところ、FACS 解析においてスフェア形成細胞では CD271 の発現が亢進していた (図 2)。

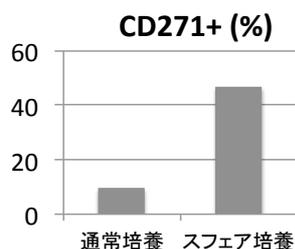
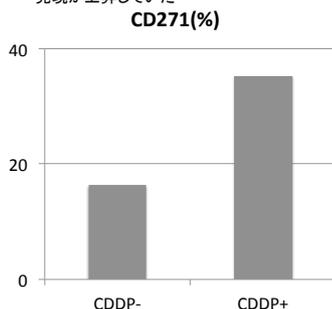


図2. スフェアを形成するHPCM細胞では CD271発現が明らかに亢進していた

したがって、CD271+細胞集団は癌幹細胞性を有することが強く示唆された。

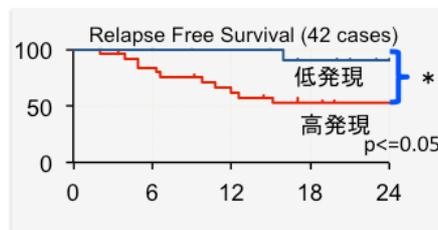
(4)薬剤耐性と CD271 の関連：HPCM2 を NOG マウスに移植して腫瘍を形成させ、CDDP を投与した。CDDP 投与前後で病理組織を解析したところ、投与後検体では明らかに CD271 発現が亢進していた。以上の結果から、CD271 発現細胞は癌幹細胞として重要な化学療法耐性という形質を示しているものと考えられた。(図 3)

図3. CDDPIによる化学療法後ではCD271の発現が上昇していた



(5) 下咽頭癌患者検体を用いて CD271 を免疫染色したところ、無再発期間と CD271 発現に有意な逆相関を認めた(図 4)。

図4. CD271高発現する症例は無再発生存が短い



さらに mRNA を採取し定量 PCR を行い、患者予後を調べた。CD271 mRNA を高発現する症例は予後不良であることが確認された。以上の結果から、CD271 は下咽頭癌幹細胞の新たなマーカー分子であることが明らかとなった。CD271 は細胞表面に表出しているため、抗体を用いた治療標的となりうる。今後、新規治療法開発が期待される。さらに診断マーカーとしても有用である可能性が高く、併せて今後の研究開発が期待される。

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 2件)

1. Imai, T., Tamai, K., Oizumi, S., Oyama, K., Yamaguchi, K., Sato, I., Satoh, K., Matsuura, K., Saijo, S., Sugamura, K. and Tanaka, N.: CD271 defines a stem cell-like population 1 in hypopharyngeal cancer. PLoS One. 2013 8(4):e62002. doi: 10.1371/journal.pone.0062002. Print 2013.
2. Imai, T., Matsuura, K., Asada, Y., Sagai, S., Katagiri, K., Ishida, E., Saito, D., Sadayasu, R., Wada, H. and Saijo, S.: Effect of HMB/Arg/Gln on the prevention of radiation dermatitis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. Jpn J Clin Oncol 査読有り 44:422-7. 2014 doi:10.1093/jjco/hyu027

[学会発表] (計 9件)

- ① Tanaka, N., Imai, T., Mochizuki, M., Sugawara, S., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Sugamura, K. CD271 defines a cancer initiating cell population in hypopharyngeal cancer. AACR2015, Philadelphia, PA, USA, 2014. 4
- ② Tanaka, N., Imai, T., Tamai, K., Mochizuki, M., Ogama, N., Yamaguchi, K., Satoh, K., Sugamura, K.: PDX model for Head and Neck Cancer reveals functional significance of CD271+

- cancer stem cells. 第73回日本癌学会学術総会(シンポジウム) 横浜, 2014.9
- ③ Mochizuki, M., Imai, T., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Ogama, N., Yokoyama, M., Sugamura, K., Tanaka, N.: CD271 plays critical roles in invading cancer cells in hypopharyngeal carcinoma. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014.9
- ④ Imai, T., Matsuura, K., Saijo, S. 下咽頭癌における癌幹細胞表面マーカーCD271の高発現は予後不良因子である. 第115回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、福岡市, 2014.5.
- ⑤ Imai, T., Matsuura, K., Saijo, S. 下咽頭癌の新規がん幹細胞表面マーカーの同定:CD271. 第114回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、札幌市, 2013.5
- ⑥ Imai, T., Mochizuki, M., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Ogama, N., Yokoyama, M., Matsuura, K., Saijo, S., Sugamura, K., Tanaka, N.: CD271 defines a stem cell population in hypopharyngeal cancer. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.9
- ⑦ 今井隆之:放射線皮膚炎と栄養. 法. 第37回頭頸部癌学会学術セミナー(招待講演). 2013.5 札幌市
- ⑧ 今井隆之:下咽頭癌の新規がん幹細胞マーカーの同定:CD271. 第51回日本癌治療学会, 京都市, 2013.10
- ⑨ 今井隆之:頭頸部癌 CCRT 皮膚炎に対するアバンドTMを用いた栄養介入と腎機能の検討. 第51回日本癌治療学会, 京都市, 2013.10

[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:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 隆之 (IMAI, Takayuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号: 80408583

(2) 連携研究者

松浦 一登 (MATSUURA, Kazuto)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号: 70271947

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号: 60280872