

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463045

研究課題名(和文)再発・転移口腔癌症例に対する新規治療戦略の開発—天寿癌を目指して—

研究課題名(英文)Development of the new therapeutic strategy for recurrence/metastatic oral cancer -toward natural life with oral cancer-

研究代表者

上山 吉哉 (UEYAMA, Yoshiya)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00168668

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)：マイクロアレイでの検討により、リプログラミング因子を遺伝子導入して作製した人工口腔癌幹細胞は、親株と比較して、ミトコンドリアの機能異常に関連のある因子や、細胞の形態および代謝異常に関わる因子等の発現が亢進していたが、重要な鍵となるような新たな因子を見出せなかった。また人工口腔癌幹細胞は、抗癌剤ならびに放射線に対して抵抗性を示すだけでなく、分子標的薬にも抵抗性を示したが、潰瘍性大腸炎や関節リウマチの薬として使用されているスルファサラジンに感受性を示すことを見出した。以上から、スルファサラジンを併用した新規治療戦略により口腔癌幹細胞を制御し、再発・転移口腔癌症例を効果的に治療できるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：We made a comparison between the artificial cancer stem cells obtained by the induction of cellular reprogramming and the parental cells by microarray analysis. The expression of the factors related to the malfunction of mitochondria and the morphological or metabolic aberration of cell was increased in the artificial cancer stem cells. However, we could not find the new important factors associated to the artificial cancer stem cells. Also, we found sulfasalazine, medicine for ulcerous colitis or articular rheumatism was effective for the artificial cancer stem cells though they exhibited increased resistance to chemotherapeutic agents, molecular targeting agents and radiation. Our findings suggested that the new therapeutic strategy with sulfasalazine may be effective for recurrence/metastatic oral cancers through the regulation of oral cancer stem cells.

研究分野：口腔癌

キーワード：癌幹細胞 リプログラミング iPS エピソーマルベクター IPA スルファサラジン

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療に携わってから 30 年以上、これまでに 1000 名以上の口腔癌治療に関わってきたが、治療成績を振り返ると癌撲滅への道程はまだ先だと痛感している。癌対策基本法が制定され、癌治療に携わるスタッフの質的向上や治療成績の向上が図られるも、癌患者数が減少しているわけではなく、また画期的な癌治療法が開発されたわけでもない。口腔癌治療に携わり始めた頃、「天寿癌」という言葉を耳にしたことがある。これは担癌状態であるが、生活の質を落とすこと無く天寿を全うすることを意味する。近年話題となった Tumor dormancy therapy (腫瘍の休眠療法)に相通ずるものであり、最近注目されている Metronomic chemotherapy (最大耐用量以下の抗癌剤を小刻みに連日頻回投与する方法)、Anti-angiogenic therapy (血管新生阻害療法)、Molecular targeting therapy (分子標的療法)等は天寿癌を目指した治療法の一つと考えられる。肉眼的に観察可能な口腔癌に対する標準治療は今も変わらず外科的切除手術であり、早期癌であれば 90%以上が完治できるが、進行・再発症例の場合は 5 年生存率が 40~60%程度しかない。これまでに、多剤併用化学放射線療法、癌分化誘導療法、養子免疫療法、樹状細胞療法、定位放射線治療、重粒子線治療など様々な癌治療法に関わってきたが、いずれも進行・再発症例の生存期間延長につながる画期的な治療法ではなかった。すなわちこれまでの概念で、新規薬剤を開発しても治療戦略を練っても進行・再発癌患者に対する治療効果は期待出来ない。

癌の撲滅を夢みて来たこの 30 年余り、他の疾患と異なり何が癌を難治性に行っているのかを問い続けてきた。その答えの一つとして、近年、癌幹細胞の存在が明らかにされた。癌組織は多様な細胞で構成されているが、その中に正常組織幹細胞と同様に、自己複製能と多分化能を有する少数の癌幹細胞が存在しており、これらが分裂・増殖、あるいは分化することで腫瘍形成を維持している。また癌幹細胞はニッチと呼ばれる微小環境を必要とし、ニッチ内で休眠状態として存在しているため、細胞周期の G0 期にあり、薬剤排出能も高いために、従来の抗癌剤は癌幹細胞に対して効果が低く、癌の浸潤や転移、再発の原因と考えられている。このため癌幹細胞は癌治療における重要な標的として、その性状解析や新規治

療法の開発が進められている。ただし、腫瘍組織中から Side population 法や癌幹細胞マーカーを用いて採取可能な癌幹細胞数には限りがあるため、薬剤スクリーニングや動物モデルを用いた検討が困難な状況にある。そこで、人工癌幹細胞の樹立が強く望まれる。

これまでに我々は、癌細胞へ Stemness の維持につながる遺伝子導入を行い、癌細胞の脱分化を誘導することによって、人工癌幹細胞の樹立を試みて来た。すなわち OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソーマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL の 3 種類)を電気穿孔法により、線維芽細胞へ遺伝子導入することで iPS 細胞が樹立されることを確認した。同様に口腔癌細胞株(HSC2)へ上記ベクターを遺伝子導入することによって得られたトランスフェクタント (HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL)は、親株と比較して浸潤能、sphere 形成能が高く、抗癌剤・放射線・分子標的薬に対して著明な抵抗性を示すとともに、ヌードマウスにおいて高い造腫瘍性を示すことを確認することができた。すなわち、HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL は口腔癌幹細胞に比較的類似していると考えている。

2. 研究の目的

本研究では人工口腔癌幹細胞 HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL とその親株間において特異的な発現変動する遺伝子を、マイクロアレイ解析を用いて検索することにより、山中因子以外に Stemness の維持あるいは癌幹細胞への脱分化につながる因子の同定を試みた。さらに、抗癌剤・放射線・分子標的薬に対して著明な抵抗性を示す人工口腔癌幹細胞に対して抗癌効果を発現できる薬剤を検索し、人工口腔癌幹細胞の転移能、再増殖能、薬剤耐性能等を減弱できるような新規治療戦略の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1)人工癌幹細胞の樹立

OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソーマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL の 3 種類)を Addgene (Cambridge,

MA, USA)より購入し、遺伝子導入装置 (Microporator) (invitrogen, Carlsbad, CA, USA)ならびに Neon Transfection System Kit (100 μ L) (Invitrogen)を用いた電気穿孔法により、口腔癌細胞株(HSC2)、肝癌細胞株(Hep G2)、乳癌細胞株(MCF-7)、子宮頸癌細胞株(HeLa)へ上記ベクターを遺伝子導入することによって人工的に癌幹細胞の樹立を試みた。

(2)トランスフェクタントの比較検討

各トランスフェクタントの人工癌幹細胞としての特徴について以下の方法にて検討した。

MTT assay による細胞増殖能および各種抗癌剤、分子標的薬、放射線に対する抵抗性の評価、 Migration assay (Boyden chamber; Neuro Probe, Inc., Chemotaxicell; クラボウ)による細胞移動能、 Wound healing assay による細胞遊走能、 低付着性細胞培養プレート (Costar 3474; Corning)を用いた sphere 形成能、 免疫不全マウスにおける腫瘍形成能。

(3)人工口腔癌幹細胞とその親株間における遺伝子発現の差異の検討

次世代シーケンサーを用いた SAGE 法による特異的な発現変動を示す遺伝子の検索および IPA を用いたパスウェイ解析。

4. 研究成果

これまでに OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソーマルベクター(pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL の3種類)を電気穿孔法により、口腔癌細胞株(HSC2)へ遺伝子導入することによって人工的に癌幹細胞の樹立を行ってきた。この手法を用いて肝癌細胞株(Hep G2)、乳癌細胞株(MCF-7)、子宮頸癌細胞株(HeLa)に対して、リプログラミング因子を遺伝子導入して、各トランスフェクタント Hep G2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL、MCF-7/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL、HeLa/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL を作製した。それぞれのトランスフェクタントは各親株と比較して、抗癌剤 Cisplatin、5-fluorouracil、Docetaxel ならびに放射線に対して抵抗性を示した。さらに、MTT assay による細胞増殖能、Migration assay による細胞移動能、Wound healing assay による細胞遊走能、低付着性細胞培養プレートを用いた sphere 形成能を比較したところ、それぞれのトランスフェクタントは各親株よりも高い細胞増殖能、細胞移動能、細胞遊走能、sphere 形成能を示した。さら

にヌードマウス背部皮下へ移植を行ったところ、それぞれのトランスフェクタントは各親株よりも高い造腫瘍性を示した。以上の結果から、癌幹細胞に類似した性格を有する人工癌幹細胞が作製できている可能性が示唆された。

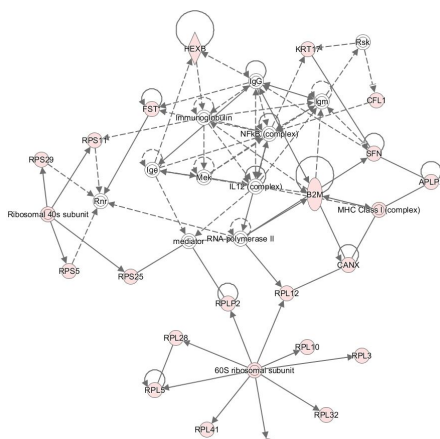
なお、上記肝癌細胞株(Hep G2)、乳癌細胞株(MCF-7)、子宮頸癌細胞株(HeLa)に関しては、iPS 細胞作製可能なエピソーマルベクターの導入により、初期化された iPS 細胞様の形態を示すコロニーは認められなかった。

次に、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソーマルベクター(pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL の3種類)を電気穿孔法により遺伝子導入することによって作製した、HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL、Hep G2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL、MCF-7/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL、HeLa/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL とそれぞれの親株間において特異的な変動を示す遺伝子をマイクロアレイベースに検索を行ったところ、口腔癌細胞株(HSC2)、肝癌細胞株(Hep G2)、乳癌細胞株(MCF-7)、子宮頸癌細胞株(HeLa)に共通して顕著な発現増強を示す遺伝子としては、導入したリプログラミング因子以外には見出すことができず、また顕著な発現低下を示す因子も見出せなかった。しかしながら、人工口腔癌幹細胞とその親株と比較して人工癌幹細胞様細胞において発現増強が認められた因子には、

MT-CO2 (Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase II)、MTRNR2L8 (MT-RNR2-like 8)、MT-ND3 (Mitochondrially Encoded NADH Dehydrogenase 3)、S100A2 (S100 Calcium Binding Protein A2)、RPS29 (Ribosomal protein S29)、TGF-1 (Transforming growth factor 1)、TUBA1B (Tubulin, Alpha 1b)、RPL41 (Ribosomal Protein L41)、MMP1 (Matrix Metalloproteinase-1) があり、ミトコンドリアの機能異常に関連のある因子や、細胞の形態および代謝異常に関わる因子等が見出された。

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
MT-CD2	257991.023	
MTFRVRL2.S	170569.069	
GAPDH	100000.000	
MT-ND3	81470.261	
S100A2	58114.873	
RPS29	49973.391	
TGFBI	38502.497	
TUBA1B	34700.005	
RPL41	34671.583	
MMP1	33373.699	

マイクロアレイ解析ならびに IPA 解析の結果得られた、親株と比較して人工口腔癌幹細胞において発現増強が認められた遺伝子。



IPA によるネットワーク解析の結果の一部

人工口腔癌幹細胞は、抗癌剤 Cisplatin、5-fluorouracil、Docetaxel ならびに放射線に対して抵抗性を示すだけでなく、分子標的薬 Cetuximab、Bortezomib にも抵抗性を示した。そこで、人工口腔癌幹細胞が CD44v を発現していることに着目し、CD44v が細胞膜の表面においてシスチントランスポーター (xCT) を安定化させることで細胞外からのシスチンの取込みを増加させ、グルタチオンの生成を促進することで酸化ストレスを軽減できることから、潰瘍性大腸炎や関節リウマチの薬として使用されている xCT タンパク質の特異的阻害剤スルファサラジン処理したところ、人工口腔癌幹細胞 HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL の増殖は顕著に抑制された。さらにヌードマウス背部皮下に HSC2/hOCT3/4-shp53-F+hSK+hUL を移植して担癌ヌードマウスを作製し、スルファサラジンを投与したところ、Cisplatin、5-fluorouracil、Docetaxel、放射線、Cetuximab、Bortezomib と比較して有意な

抗腫瘍効果が得られた。またスルファサラジンの投与により、著しい体重減少を認めず、肉眼的には明らかな有害事象は観察されなかった。

以上の結果から、スルファサラジンを併用した新規治療レジメンを検討することにより、口腔癌幹細胞を制御し、再発・転移口腔癌症例に対する新規治療戦略が開発でき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 6 件)

Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y. Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 2017, 13.6: 4857-4862. 査読あり

真野隆充, 梅田浩嗣, 竹縄隆徳, 今釜崇, 森亜希, 上山吉哉. テリパラチド投与と外科的治療により治癒したビスフォスフォネート関連顎骨壊死の 1 例. *日本歯科先端技術研究所学会誌*, 2017, 23(1):11-13. 査読あり

Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. Gimeracil Exerts Radiosensitizing Effects on Oral Squamous Cell Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *Anticancer Res*. 2016 Nov;36(11):5923-5930. 査読あり

Harada K, Ferdous T, Cui D, Kuramitsu Y, Matsumoto T, Ikeda E, Okano H, Ueyama Y. Induction of artificial cancer stem cells from tongue cancer cells by defined reprogramming factors. *BMC Cancer*. 2016 Jul 27;16:548. 査読あり

Harada K, Harada T, Ferdous T, Takenawa T, Ueyama Y. Osteogenic cell fractions isolated from mouse tongue muscle. *Molecular medicine reports*, 2015, 12.1: 31-36. 査読あり

Harada K, Ferdous T, Kobayashi H, Ueyama Y. Paclitaxel in combination with cetuximab exerts antitumor effect by suppressing NF- κ B activity in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2014, Dec; 45 (6): 2439-2445. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

梅田浩嗣、真野隆充、原田耕志、内田堅一郎、三島克章、上山吉哉、過去 14 年間における遊離皮弁再建を行った症例の臨床的検討、第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2017 年 1 月 26、27 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

山城康太、真野隆充、内田堅一郎、堀永大樹、梅田浩嗣、宮本寿太郎、三島克章、上山吉哉、当科における過去 13 年間の顎矯正手術症例の検討、第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 25 日～27 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

三島克章、白石麻美、河井由衣、梅田浩嗣、上山吉哉、内視鏡鼻咽腔計測システムの小型化と改造に伴う精度の検証、第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 25 日～27 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

Takenawa T, Harada K, Ferdous T, Ueyama_Y. Expression of calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. ESMO(EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY) Congress 2016, 2016 年 10 月 7 日～10 月 11 日(Copenhagen, Denmark)

原田耕志、加藤芳明、梅田浩嗣、上山吉哉、ヒト唾液腺癌における PD-L1 の発現、第 69 回日本口腔科学会学術集会、2015 年 5 月 14 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

原田耕志、Ferdous Tarannum、上山吉哉、リプログラミング因子導入による癌細胞の脱分化、第 62 回日本口腔科学会 中国・四国地方部会、2014 年 10 月 25 日、徳島大学歯学部大講義室(徳島県・徳島市)

原田耕志、Ferdous Tarannum、上山吉哉 口腔扁平上皮癌における RTP3 発現の Docetaxel 耐性ならびに予後への関与、第 13 回中四国口腔癌研究会 学術講演会、2014 年 10 月 24 日、ホテルグランドパレス 徳島(徳島県・徳島市)

Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. Establishment of Induced Cancer Stem Cells by Transfection of a Tongue Cancer Cell Line with Yamanaka 's Factor. The EACMFS, 23-26 September 2014, Prague Congress Center, (Prague・Czech republic)

Ferdous T, Harada K, Ueyama Y. Identification of docetaxel-resistance related genes in oral squamous cell carcinoma. The 96th AAOMS, 8-13 September

2014, Hawaii Convention Center, (Honolulu・U.S.A.)

〔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

上山 吉哉 (UEYAMA, Yoshiya)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00168668

(2)研究分担者

原田 耕志 (HARADA, Koji)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60253217

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

フェルドゥス タランヌム (FERDOUS, Tarannum)
山口大学・大学院医学系研究科・学術研究員
研究者番号：70647932