

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861427

研究課題名(和文) CD271シグナルによる下咽頭癌幹細胞制御と治療戦略への応用

研究課題名(英文) Possible role of CD271 for maintaining stemness and application to treatment in HPC.

研究代表者

望月 麻衣 (Mochizuki, Mai)

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)・発がん制御研究部・研究技師

研究者番号：40726303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、表面分子CD271が下咽頭癌において癌浸潤部に強く発現し、予後との相関性を持つ悪性度マーカーであることを報告しているが、下咽頭癌における機能は未だ不明であった。本研究では、下咽頭癌におけるCD271の働きについて、臨床検体由来の細胞株を樹立し、siRNAを用いたノックダウン株を作成し検証した。ノックダウンの結果、下咽頭癌細胞株の細胞増殖は強く抑制され、免疫不全マウス皮下への造腫瘍能も抑制された。更に、増殖のみならず、CD271は下咽頭癌細胞の遊走能を制御していることも判明した。このことから、CD271は単なる予後マーカーではなく、自身が悪性度を制御する機能因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that CD271 (p75 neurotrophin receptor) is a marker for tumor formation and correlated with a poor prognosis in human hypopharyngeal cancer. To elucidate the role of CD271 in HPC, we established HPC cell lines and CD271-knockdown cells using siRNA. We revealed that CD271-knockdown strongly suppressed the tumorigenesis and cell growth. In addition, CD271 depletion diminished the in vitro migration capability of the HPC cells. Collectively, CD271 initiates tumor formation by increasing the cell proliferation capacity and by accelerating the migration signaling pathway in HPC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：下咽頭癌 CD271 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は近年罹患率の上昇が認められている癌種のひとつである。加えて、診断時既に進行癌(ステージ III, IV)である症例が多くを占め、放射線療法、化学療法を施行しても予後不良例が多い特徴がある。そのような頭頸部癌の中でも特に下咽頭癌は、咀嚼・嚥下等生活に必要な生体機能を損なうことから、生命予後のみならず生活の質の観点からもその克服が急がれている。

近年の研究から、がんの治療抵抗性の原因の1つに、「がん幹細胞」があることが明らかとなった。この概念によると、腫瘍は単一の細胞集団ではなく、幹細胞性を有する一部の細胞だけが腫瘍を形成する。一方で、がんの多くを占める非がん幹細胞は、抗癌剤や放射線治療に感受性を持つとされている。がん幹細胞は、自己複製能、多分化能、抗癌剤・放射線抵抗性、を大きな特徴として、癌治療抵抗性の元凶であるとされている。実際に、乳癌や脳腫瘍などでがん幹細胞の存在が相次いで報告された。下咽頭癌を含む頭頸部癌においてもがん幹細胞理論はあてはまると考えられており、がん幹細胞をターゲットとした治療は、次世代の先進的治療法として期待を集めている。では、どのようにがん幹細胞を特異的に区別するのか?すでに乳癌等では、CD44+/CD24-ががん幹細胞マーカーであることが報告され、CD44を治療標的とする実用化が進んでいる。しかしながら、このようながん幹細胞マーカーはすべての癌において共通ではなく、下咽頭がん幹細胞を規定するマーカーについては、決定的なエビデンスがなく、治療開発に進めずにいた。申請者らの研究室では、下咽頭がん幹細胞について、免疫不全マウスであるNOGマウスへの造腫瘍能を指標としてスクリーニングを開始した。その結果、CD271陽性細胞が高い造腫瘍能を持ち、CD271の発現と患者予後が相関するなどのエビデンスを得た。このことから、CD271が下咽頭癌のがん幹細胞マーカーであることを世界に先駆けて見出した(*PLoS ONE*, 2013)。CD271はp75 neurotrophin receptor (p75NTR)とも呼ばれる神経成長因子の受容体であり、正常神経細胞においては、細胞死に働く一方で、細胞生存にも関与するという、一見して正反対の生理活を有する報告がある。しかし、先行研究では、悪性黒色腫や食道癌のがん幹細胞マーカーとしての報告があるものの、がん幹細胞機能におけるCD271の解析は殆どなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、下咽頭がん幹細胞マーカーとして見出した表面分子CD271に着目し、

CD271のがんにおける機能の解析と臨床応用に取り組む。具体的には、

- (1) 下咽頭癌のがん幹細胞性の発揮に必要なCD271の細胞内機能ドメインは何か?
 - (2) 下咽頭癌のがん幹細胞性を伝達するパスウェイは何か?
 - (3) がん幹細胞性を発揮する転写活性化標的分子は何か?
 - (4) CD271を標的とした下咽頭癌治療モデルの構築はできるか?
- の4点について検討をすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 下咽頭癌臨床検体におけるCD271高発現細胞の特性

CD271が下咽頭癌に果たす機能を *in vivo* で探索するため、下咽頭癌患者検体を用い、CD271、及び細胞増殖マーカーであるKi67、分化マーカーであるInvolucrin抗体で免疫染色を行った。更に、癌の進行に伴ってCD271陽性細胞の働きに変化があるのかを詳細に検討するため、CD271及びKi67抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。さらに検体を、正常上皮、軽度異形成、中度異形成、高度異形成、上皮内癌、扁平上皮癌に区分し、各程度におけるCD271とKi67の共局在率の変化を、TissueFACSを用いて解析した。

(2) CD271ノックダウンを用いたCD271の増殖制御機構と下流シグナルの探索

(1)の解析により、下咽頭扁平上皮癌におけるCD271高発現細胞は、増殖が高く未分化な細胞を規定することが示された。しかし、CD271が実際に増殖に関与しているかどうかは不明である。このため、次にCD271が細胞の増殖制御に直接に作用しているかどうかを、下咽頭癌患者検体から独自に樹立した細胞株であるHPCM2及びHPCM7に対し、siRNAを導入しCD271をノックダウンすることによって評価した。解析は、細胞増殖能、細胞周期、活性化増殖シグナル、マイクロアレイを用いた増殖関連因子の変動解析、

の上位変動因子ノックダウン後の細胞周期解析にて行った

(3) CD271による浸潤能制御機構

以前申請者らは、CD271高発現細胞が下咽頭癌患者検体において浸潤部に多く発現することを報告した。このことからCD271は増殖のみならず浸潤能の制御を行う可能性が示唆されている。下咽頭癌において、CD271が浸潤能を制御するという可能性を検討するため、下咽頭癌細胞株HPCM2およびHPCM7へのCD271 siRNAの導入、及びCD271とその下流因子であるRhoAの特異的阻害薬であるTAT-Pep5を用いてトランスウェルのmigration assay及びスクラッチアッセイを

行い、移動能を検証した。

4. 研究成果

(1) CD271 は下咽頭癌において未分化で増殖能の高い細胞を規定する

下咽頭癌臨床検体に対する免疫染色の結果、下咽頭正常組織において CD271 は基底膜に染まり、未分化で増殖能の低い細胞を規定することが判明した。一方で、異形成から扁平上皮癌に至るにつれて、CD271 は増殖能が高く未分化な細胞を規定していることが判明した。このことから、CD271 が下咽頭癌において、癌の進行に伴いその働きを変化させている可能性が示唆された。

(2) CD271 をノックダウンした細胞は細胞周期が停止する

(1)の結果、CD271 ががん細胞の増殖を制御する可能性が示唆された。これを確かめるため、siRNA 導入による CD271 ノックダウンを行って細胞増殖を確認したところ、細胞増殖は顕著な低下を認めた。更に、ノックダウン細胞について細胞周期を確認したところ、CD271 ノックダウン細胞は特に G₀ 期に誘導されていることが判明した。この増殖の変化は、細胞内増殖シグナルである Erk のリン酸化がノックダウン細胞で減少していること、及びマイクロアレイ解析において、G₀ 期誘導因子である CDKN1C の発現がノックダウン細胞で上昇していることとの関連が考えられた。この仮説を検証するため、Erk の阻害薬である U0126 を使用して細胞増殖を確認したところ、増殖は顕著に低下した。また、CD271 と CDKN1C の同時ノックダウンを行い細胞周期の確認をしたところ、CD271 ノックダウンによる G₀ 期誘導が、CDKN1C のノックダウンによって緩和されていた。このことから、CD271 下流では複数のパスウェイによって増殖・細胞周期の制御が働いていることが示唆され、CD271 の治療標的としての有用性が示された。

(3) CD271 は RhoA を介して細胞遊走を制御する

CD271 が下咽頭癌の浸潤能を制御するかどうかを、スクラッチアッセイ及びトランスウェルアッセイを用いて検討したところ、CD271 のノックダウンによって顕著に遊走能が減少していた。さらに、CD271-RhoA 間の特異的な阻害薬である TAT-Pep5 を使用したところ、有意に遊走能は減少した。しかし、CD271 ノックダウン細胞に対して、この阻害薬は遊走能を減少させなかった。この結果から、CD271 による下咽頭癌細胞株の遊走能の制御は、下流に RhoA の活性化を含んでいると考えられる。

以上の結果より、CD271 は増殖のみならず遊走能を制御しており、下咽頭癌において複数の下流経路を制御し悪性化に関与してい

ると考えられた。よって、今後治療標的としてさらに詳細な解析が必要であると考えられる。

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 3 件)

1. Yamaguchi K, Takanashi T, Mochizuki M, Sugamura K. et al. (12 人中 5 番目)

Xenotransplantation elicits salient tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells via aberrant AKT activation. *Cancer Sci.*, in press. (査読あり) doi: 10.1111/cas.12921.

2. Watanuki Z, Mochizuki M, Tanaka N et al. (14 人中 5 番目)

Synergistic cytotoxicity of afatinib and cetuximab against EGFR T790M involves Rab11-dependent EGFR recycling.

Biochem Biophys Res Commun. (2014) 455: 269-276. (査読あり) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.003.

3. Tamai K, Mochizuki M, Tanaka N et al. (15 人中 4 番目)

Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma.

Cancer Sci. (2014) 105(6):667-74. (査読あり) doi: 10.1111/cas.12406.

[学会発表](計 6 件)

1. 望月 麻衣、玉井 恵一、今井 隆之、中村 真央、小鎌 直子、本橋 ほづみ、菅村 和夫：下咽頭癌において CD271 は増殖能・浸潤能を制御する

平成 27 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 2016.2(一橋講堂、東京都千代田区)

2. 望月 麻衣、今井隆之、松浦一登、小鎌直子、玉井恵一、本橋ほづみ、菅村和夫、田中伸幸：頭頸部癌における CD271 の機能性
第 38 回日本分子生物学会, 2015.12(神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)

3. Mai Mochizuki, Takayuki Imai, Keiichi Tamai, Hozumi Motohashi, Nobuyuki Tanaka: CD271 marks cancer initiating cells in hypopharyngeal carcinoma with enhanced proliferative potential

第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10(名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)

4. Keiichi Tamai, Mao Nakamura, Naoko Ogama, Rie Shibuya, Mai Mochizuki, Kazunori Yamaguchi, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh, Nobuyuki Tanaka: BEX2

plays critical roles for maintaining dormant cancer stem cells

第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10 (名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市)

5. 望月麻衣、今井隆之、松浦一登、小鎌直子、玉井恵一、本橋ほづみ、菅村和夫、田中伸幸: 頭頸部がん幹細胞における CD271 の役割の解明

口演, 日本生化学会東北支部第 81 回例会・シンポジウム, 2015.5 (さくらホール, 宮城県仙台市)

6. Mochizuki M, Imai T, Tamai K, et al. CD271 plays critical roles in invading cancer cells in hypopharyngeal carcinoma.

口演, 73 回日本癌学会学術総会, 2014.9 (パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)

7. Mochizuki M, Imai T, Sugamura K, Tanaka N.

CD271 defines a stem cell population in hypopharyngeal cancer.

ポスター, 平成 25 年度がん若手研究者ワークショップ. 2013.9 (蓼科グランドホテル滝の湯, 長野県茅野市)

〔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:

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

望月 麻衣 (Mochizuki, Mai)

宮城県立がんセンター研究所・発がん制御部・研究技師

研究者番号: 40726303

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

()

(4) 研究協力者

玉井 恵一 (Tamai, Keiichi)

今井 隆之 (Imai, Takayuki)

菅原 早百合 (Sugawara, Sayuri)