

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861735

研究課題名(和文) 静止期癌細胞モデルの確立による tumor dormancy の包括的理解と制御

研究課題名(英文) Quiescent tumor cell models for regulating tumor dormancy

研究代表者

神力 悟 (Shinriki, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：00583048

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)：がん抑制遺伝子CYLDに対するsiRNAを、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)細胞株に導入したところ、G0期の割合が著しく増加することが判明した。そこで、静止期癌細胞モデルの樹立を目指し、Tet-on shRNAによるCYLDの発現制御を試みたが、CYLD発現抑制の程度が穏やかであったため、現在改善を目指している。

一方、OSCC細胞株HEp3を移植したマウスより、休眠骨髄播種癌細胞(BM-DTC)由来株を樹立し、種々の解析を行った。そして、休眠BM-DTCの増殖抑制と抗癌剤抵抗性には、DTCの自律的なTGF- β 2-SDF-1-CXCR4シグナリングが重要であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Suppression of CYLD expression by siRNA in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines led to an increase in G0 phase. Although, to establish a quiescent tumor cell model, we utilized Tet-on shRNA to regulate CYLD expression, the knockdown efficacy has been insufficient. Therefore, further investigation is needed.

Besides, we established a dormant bone marrow-disseminated tumor cell (BM-DTC)-derived subclone using OSCC cell line, HEp3. Using this subclone, we reported that intrinsic TGF- β 2-SDF-1-CXCR4 signaling was important for slow-cycling state and drug resistance in dormant BM-DTC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：静止期癌細胞 骨髄播種癌細胞 CYLD 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡のほとんどは転移・再発を原因とする。そして、癌細胞が明らかな病変を形成する以前の無症候性かつ検出不可能な期間を「Tumor dormancy(がんの休眠状態)」と呼ぶ。この現象は、治療後に微小な残存病変として数十年の期間で認められるとの報告もある。なんらかの要因により腫瘍細胞が増殖開始することで致死的な再発や転移に至る。したがって、tumor dormancy のメカニズムの解明とその制御が癌治療における最重要課題のひとつと考えられている。

Tumor dormancy のメカニズムとしては、血管新生や免疫監視システムなどによる制御も存在するが、根本的な問題として位置付けられているのは「癌細胞の分裂自体が静止している状態(tumor cell dormancy)」である。しかし、臨床的に検出不可能であることに加え、実験レベルにおいてもさまざまな技術的障壁(マーカーの欠落、ニッチの特性不明、培養不可能、など)が存在するため、tumor dormancy を担う静止期癌細胞の存在自体やその特性に関する情報は極めて少ない。

本研究では、ニッチ非依存的静止期癌細胞モデルの特性や意義を探ることで、tumor dormancy のメカニズムを解明し、癌の転移・再発を標的とした新規診断・治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

(1) 分裂静止癌細胞“株”の樹立

(2) 分裂静止癌細胞の特性の解明

ニッチ非依存的に分裂静止状態の長期維持を可能としている細胞生物学的特徴を明らかにするとともに、G0 期特異的マーカーの開発を目指す。

(3) 静止期癌細胞の転移・再発における意義の解明

静止期癌細胞モデルの生体内での挙動を解析することで、転移・再発機構の解明と休眠癌の検出・制御法の開発を目指す。

(4) 静止期を誘導する分子機構の解明と新たな診断・治療法の開発

CYLD 発現低下が誘導する分裂静止およびその解除に重要な分子ネットワークの解明を目指す。さらに、本モデルを切り口として新たな治療標的分子と普遍的 G0 期制御因子の同定も試みる。

(5) 骨髄における tumor cell dormancy の維持機構の解明

臨床的に、骨髄へ播種された癌細胞(Disseminated tumor cells: DTC)の多くは分裂停止状態であることが知られているが、多くの癌に共通して、その存在は後の再発と非常に強く関連している。また、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)細胞株の一つである HEP3 細胞株は、マウスにおいて早期から多臓器転移を来すにも関わらず骨髄ではほぼ 100% dormant を保つことが知られているが、その詳細な分子機構や意義は未だ不明である。本研究では、上記の静止

期細胞モデルを用いた検討と並行して、HNSCC 患者および Hep3 細胞移植マウスモデルの骨髄 DTC およびそのニッチを解析することで、tumor dormancy と転移・再発システムの包括的理解に迫る。

3. 研究の方法

(1) CYLD 発現抑制が誘導する各種表現型の解析

申請者は、HNSCC 細胞株である SAS 細胞を対象として、CYLD 発現制御を基盤とする「分裂静止細胞株」を確立すると同時に、CYLD の癌抑制的な機能を各種 HNSCC 細胞株を用いて実証してきた。本検討では、CYLD 発現低下により誘導される分裂静止とそれに付随する各種表現型や発現プロファイルなどを包括的に解析するとともに、G0 期特異的マーカーの探索を行う。主な評価項目は、細胞形態学的特徴、核型、遺伝子、miRNA 発現プロファイル、各種タンパク質の発現、ゲノムメチル化状態、代謝産物プロファイル、癌幹細胞(cancer stem cell: CSC)形質、多分化能の有無、各種悪性形質、などとする。

(2) in vivo における分裂静止癌細胞の挙動の解析

先述のように申請者が確立した静止期癌細胞株は、生体内においても静止期を維持できるため、CYLD 発現(赤色の有無)および増殖の ON/OFF も、Dox の投与で十分可能であると考えられる。本検討では、静止期/増殖期における癌細胞のマウス生体内における挙動を治療実験と併用しつつ時空間的に解析し、臨床的な tumor dormancy やそれに続く転移・再発を再現できるかどうかを検証する。Dox を用いる場合は、飲料水に含有させる。過去にないこのような手法により、転移・再発過程の各プロセスにおける分裂静止状態・増殖の意義の解析が可能となる。

申請者は既に、GFP(緑)およびホタルルシフェラーゼを共発現する分裂静止癌細胞株を樹立しているため、in vivo イメージング、詳細な組織解析(癌細胞および微小環境)、フローサイトメトリーによるソーティングなどを利用した幅広い解析が可能である。さらに、CFP(青)のみを発現する SAS 細胞も樹立済みであるため、各種蛍光(赤、緑、青)を指標として、混合移植することで、増殖癌細胞と静止期癌細胞の両方の挙動を同じ固体内で解析することも可能である。

(3) G0 期維持機構の解析と診断・治療法開発への応用

CYLD 発現抑制により誘導される分裂静止とその維持機構の解析

上記(1)から明らかとなった遺伝子、miRNA やタンパク質発現プロファイルとバイオインフォマティクスを併用し、関連シグナル伝達経路や転写因子を抽出する。また、CYLD 結合分子を液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)により同定する。さらに、各細胞周期段階における CYLD の局在、発現変化を解析する。以上の解析から、静止期癌細胞の増殖

再開や細胞死誘導に関連した遺伝子を特定する。特に、CYLD を切り口として、普遍的に静止期を制御する“マスター調節因子(もしくは複合体)”を探索する。

患者検体および HEP3 細胞を用いた自然発生型 tumor dormancy の分子機構の解析

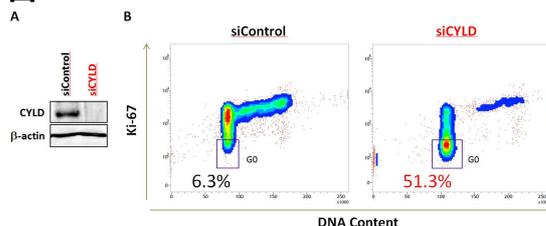
Hep3 細胞移植マウスモデルおよび HNSCC 患者の骨髄 DTC およびその周囲の骨髄組織の遺伝子発現プロファイルを解析し、ニッチ非依存の静止期癌細胞モデルとの共通項を探ることで、tumor dormancy を担う静止期癌細胞の特性のさらなる理解と、分裂停止/増殖に関連したニッチ(細胞外シグナル)の特性の解明に迫ることができると考えられる。

4. 研究成果

(1) HNSCC 細胞における CYLD 発現低下は静止状態を誘導する。

我々の先行研究では、CYLD の発現がヒト HNSCC 組織の浸潤領域で著減しているということ、CYLD 発現程度が低い症例ほど全生存期間が有意に短いことが明らかとなっている。そこで我々は、CYLD 発現抑制が HNSCC 細胞に及ぼす影響を検討した。コントロール siRNA (siControl) あるいは CYLD siRNA (siCYLD) をヒト HNSCC 細胞株 SAS に導入し(図 1A)、10%血清含有条件で培養したところ、siCYLD 群で Ki-67 陰性 G0 期の割合が著しく増加していることが判明した(図 1B)。また、トランスクリプトーム解析の結果、CYLD 発現抑制時の遺伝子発現プロファイルは、造血幹細胞の静止期維持に関連する遺伝子発現プロファイルに非常に類似しているということが判明した。

図1



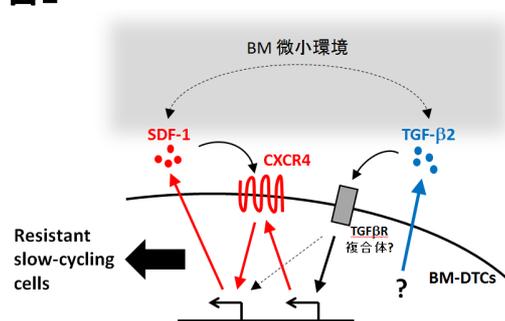
(2) BM-DTC は内因性 TGF-2-SDF-1-CXCR4 シグナルにより、増殖能低下と抗癌剤耐性を獲得している。

我々は、BM-DTC の抗癌剤耐性機構を明らかにするために、HEP3 細胞をマウスに移植し、in vivo セレクションを行うことで、移植部位(P-HEP3)、BM(BM-HEP3)、肺(Lu-HEP3)由来細胞株を樹立した。Lu-HEP3 は、BM-HEP3 とは異なる別のアグレッシブなコントロール細胞群とした。過去の報告と一致し、遅くとも移植後 5 週目には肺転移巣を認められたが、樹立過程において明らかな骨転移は認められなかった。我々は、BM-HEP3、Lu-HEP3 細胞の表現型を P-HEP3 と比較検討した。その結果、BM-DTC はオートクライン TGF-2-SDF-1-CXCR4 シグナリングによって抗癌剤耐性と増殖能低下を獲得していることが明らかとなった。

TGF- 誘導性の EMT や細胞生存に CXCR4 発現誘導が必要であるという報告があり、そのよ

うなシグナルカスケードが BM-DTC に優位に起こっていることが考えられた。遠隔臓器における DTC の挙動は、DTC 自身と微小環境との相互作用によって決まる。重要なことに、TGF-2 と SDF-1 はいずれも BM 環境で豊富に存在するサイトカインであるため、癌細胞と BM 微小環境との間において、TGF-2、SDF-1、CXCR4 シグナリングの相乗効果が起こっている可能性がある。我々は、そのような相乗効果が BM-DTC の静止期維持とより頑強な抗癌剤耐性を確立させ、臨床的な微小残存腫瘍を成立させていると考える(図2)。CXCR4 や TGF-2 の阻害は、BM-DTC の抗癌剤耐性の克服と HNSCC の再発予防に有用かもしれない。また、DTC や転移細胞本来の性質の理解と微小環境要因の統合的理解が、恐らく臓器によって異なる抗癌剤耐性機構の理解と克服に重要であると考えられた。

図2



今後のさらなる解析は、静止期細胞モデルの構築と HNSCC をはじめとした癌の転移・再発機構の解明に寄与すると考えられる。

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 5 件)

Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Guo J, Ueda M, Hayashi M, Yamashita S, Zijlstra A, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y. Intrinsic TGF-2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget*, 6:1008-1019, 2015. (査読有)

DOI: 10.18632/oncotarget.2826

Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Ueda M, Nagata M, Guo J, Hayashi M, Yoshida R, Ota T, Ota K, Kawahara K, Nakagawa Y, Yamashita S, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y. Osteopontin-integrin v 3 axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma. *FEBS Lett*, 589:231-239, 2015. (査読有)

DOI: 10.1016/j.febslet.2014.12.004.

Guo J, Shinriki S, Su Y, Nakamura T,

Hayashi M, Tsuda Y, Murakami Y, Tasaki M, Hide T, Takezaki T, Kuratsu J, Yamashita S, Ueda M, Li JD, Ando Y, Jono H. Hypoxia suppresses cylindromatosis (CYLD) expression to promote inflammation in glioblastoma: possible link to acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Oncotarget*, 5: 6353-6364, 2014. (査読有)
DOI: 10.18632/oncotarget.2216

Hayashi M, Jono H, Shinriki S, Nakamura T, Guo J, Sueta A, Tomiguchi M, Fujiwara S, Yamamoto-Ibusuki M, Murakami KI, Yamashita S, Yamamoto Y, Li JD, Iwase H, Ando Y. Clinical significance of CYLD downregulation in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 143: 447-457, 2014. (査読有)

DOI: 10.1007/s10549-013-2824-3.

〔学会発表〕(計 5 件)

神力悟, 安東由喜雄, 松井啓隆. 骨髄播種癌細胞の増殖抑制状態と抗癌剤耐性への細胞自律的制御機構の関与. 第62回日本臨床検査医学会学術集会, 2015年11月19-22日, 岐阜県, 岐阜.

神力悟, 中村拓哉, 城野博史, 郭建莹, 瀬藤光利, 安東由喜雄, 松井啓隆. 骨髄播種癌細胞が自律的に誘導する増殖抑制状態と抗癌剤耐性. 第55回日本臨床化学会年次学術集会, 2015年10月30-11月1日, 大阪府, 吹田.

神力悟, 中村拓哉, 城野博史, 郭建莹, 瀬藤光利, 安東由喜雄, 松井啓隆. Intrinsic molecular characteristics of bone marrow-disseminated tumor cells. 第74回日本癌学会学術集会, 2014年10月8日-10日, 愛知県, 名古屋.

神力悟, 城野博史, 中村拓哉, 郭建莹, 篠原正徳, 安東由喜雄, 瀬藤光利. Loss of CYLD promotes cell migration by inhibiting Smurf2-dependent ALK5 degradation in oral squamous cell carcinoma. 第19回静岡健康・長寿学術フォーラム, 2014年11月7日, 静岡県, 沼津.

神力悟, 城野博史, 中村拓哉, 郭建莹, 篠原正徳, 安東由喜雄, 瀬藤光利. Loss of CYLD promotes cell migration by inhibiting Smurf2-dependent ALK5 degradation in oral squamous cell carcinoma. 第73回日本癌学会学術集会, 2014年9月25日-27日, 神奈川県, 横浜.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神力 悟 (SHINRIKI, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号: 00583048