

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689064

研究課題名(和文)細胞競合現象に基づく上咽頭癌発癌機構の解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment new therapy and analysis of carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma by cell competition

研究代表者

近藤 悟 (Satoru, Kondo)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：70436822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織は、少数の癌幹細胞と多数の分化細胞から構成される「癌幹細胞」理論が提唱された。我々は、Epstein-Barrウイルス(EBV)遺伝子を用い、上咽頭癌の癌幹細胞作成に成功した。

他方、癌細胞増殖は、周囲の正常細胞との相互作用「細胞競合」により規定されることが報告された。本研究では、「正常細胞」「前癌病変細胞」「癌細胞」「癌幹細胞」を作成し、細胞競合現象を検討した。いずれの共培養でも細胞競合は起こった。上咽頭癌組織・細胞モデルにおいて、細胞競合マーカーのSparc発現低下と、周囲の正常組織でSparcの発現亢進を認めた。これらからSparcは細胞競合に強く関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In recent study, new theory has been proposed that cancer tissues composed by a few “cancer stem cells” which can generate cancer cells, and many “differentiated cancer cells”. From this theory, we reported Epstein-Barr virus (EBV) genes could induce cancer stem cells of nasopharyngeal carcinoma (NPC).

On the other hand, it is reported that cancer proliferation is regulated by “cell competition”, interaction between normal cells surrounding cancer cells and cancer cells. In this study, we generate “normal cell”, “precancerous cell”, “cancer cell”, and “cancer stem cell” using plasmid that contains EBV gene and other precancerous NPC genes. Finally, we examined cell competition phenomena between these cell lines. We detected cell competition phenomena in every co-culture of these cells. In NPC tissues and cell lines, we found that high Sparc expression in normal cells. These finding suggest that Sparc is closely related cell competition.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：細胞競合 発がん 上咽頭がん EBV 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

癌化のプロセスは、initiation, promotion, progression の3過程からなる。上咽頭癌は、Epstein-Barr virus (EBV) が癌化に関与するユニークな頭頸部癌である。近年の癌幹細胞仮説の隆盛とともに、initiation ステップにおける解析が進んでいる。申請者は正常咽頭細胞に EBV-LMP1 を発現させるとその細胞は癌幹細胞性を獲得することを報告した。20 世紀までは、「EBV の正常細胞へ潜伏感染が最初に起こり、EBV によって前癌病変が発生し癌化する」と考えられていた。21 世紀初頭、上咽頭前癌病変に遺伝子変異(3 番、9 番、13 番染色体)が存在し、それらは EBV 感染によって生じるのではなく、EBV 非感染細胞において既に認められることが報告された。さらに近年の大規模な疫学調査により上咽頭癌の前癌状態形成に必須の遺伝子がそれらの染色体上に特定された。これらの報告から「EBV 感染は上咽頭癌発癌において、initiation の最初のステップで必要なのではなく二番目のステップで必要である」ことが示唆された。1964 年に Stocker らは、ショウジョウバエ由来正常細胞と変異細胞を共培養すると、周囲を正常細胞に囲まれた変異細胞の増殖が抑制されることを報告した。本現象は「細胞競合(cell competition)」と命名され、近年、急速に解明が進み、哺乳類にもこの現象が観察されることが判明した。

「細胞競合」とは、2 種類の適応能力が異なる細胞が同時に隣接し存在する状況において、適応能力で勝る細胞(winner)が劣る細胞(loser)を積極的に排除する、winner の増殖と loser の細胞死が相互依存的に起こるため、集団のサイズは一定に保たれる現象である。遺伝子変異を有するものの異形成など組織学的変化を呈する以前の癌細胞は、正常細胞との間の細胞競合の winner となり、徐々に広範な領域が癌細胞へと置換される、すなわち、initiation ステップが細胞競合によって制御されている可能性がある。藤田らは、世界で初めて哺乳類細胞を用いて正常細胞と癌細胞の「細胞競合」現象を報告した。正常細胞と Ras 癌遺伝子によって癌化させた細胞を混合培養すると、癌細胞は正常細胞層の apical 側(管腔側)にはじき出されて排除される(apical exclusion)。

Apical exclusion によって排除されなかった癌細胞は正常細胞の基底層側に潜り込むようにして増殖する。つまり、「正常細胞との細胞競合で loser となった癌細胞は、確率的に管腔側に排除されるか、基底側に escape する。基底層で生き残る細胞集団が癌として増殖する。」ことになる。

実際のヒト組織においては、癌細胞と正常細胞の「細胞競合」が起こるのではなく、「正常細胞と前癌状態の細胞」あるいは「正常細胞と癌幹細胞」の細胞競合において、前癌細胞・癌幹細胞が排除されずに winner となる

ことが、発癌の initiation となる。この現象を利用することで全く新規の癌治療戦略が提唱できると考え、本研究コンセプトの着想に到った。

### 2. 研究の目的

上咽頭癌発癌の initiation ステップを「細胞競合」という側面からアプローチして、EBV 感染以前の遺伝子変異の重要性、EBV 感染後の EBV 遺伝子発現、特 EBV-LMP1 の重要性、の 2 相に細分化し、その分子機構を解明することを目的とした。すなわち、「正常細胞 vs 癌細胞」だけでなく、「正常細胞 vs 癌幹細胞」および「正常細胞 vs 前癌病変細胞」という細胞競合現象の視点から上咽頭組織で繰り広げられている上咽頭癌発癌の第一ステップを解明することが目的である。

### 3. 研究の方法

1) 「正常上咽頭細胞」、「EBV 感染前-前癌細胞」、「EBV 感染-前癌細胞」、「EBV 感染-癌細胞」、各段階のモデル細胞を作成する。各モデル細胞を共培養することで、上咽頭癌発癌の initiation の段階で生じている「細胞競合」現象を再現すると共に「細胞競合」関連分子の変化を網羅的に解析する。

上咽頭癌幹細胞の候補遺伝子、MDS-EVI1、CDKN2A/B、TNFRS19 の遺伝子を正常上咽頭細胞に発現させ前癌状態の細胞を作成する。正常上咽頭細胞 NP69 は EBV-LMP1 発現により、形質転換するものの発癌はしない。それは、癌化に必要な遺伝子変異を有していないためである。MDS-EVI1、CDKN2A/B、TNFRS19 遺伝子をエストロゲン誘導性レトロウイルスベクターを作成する。そして正常上咽頭細胞 NP69 に導入し、「EBV 感染前-前癌細胞」モデルを作製する。

「EBV 感染前-前癌細胞」モデルにテトラサイクリンにより LMP1、LMP2、EBNA1 を発現誘導するウイルスベクターを導入、「EBV 感染-前癌細胞」を作製する。この時点で一定の少数細胞が「癌幹細胞化」する。

「EBV 感染前-前癌細胞」に LMP1 を導入し、「EBV 感染-癌細胞」が誘導する。

以上により作成した細胞を用いてタイムラプス顕微鏡下に、「細胞競合」現象 apical exclusion 及び基底層側への潜り込み現象を解析する。

2) 上咽頭病理組織標本における「細胞競合」関連分子の発現解析を行った。実際の臨床検体における「細胞競合」関連発現と我々の作製したモデルの整合性を評価した。当科にて保存されている 120 例の上咽頭癌原発巣パラフィン包埋病理組織を用いた。

Sparc はヒト組織において発現検討可能な細胞競合マーカー、すなわち、winner と loser を規定するマーカーの中で最も解析が進んでいる。そしてもうひとつ代表的マ-

カーとして flower を候補とした。この蛋白は loser 細胞が発現するマーカーであり、積極的にアポトーシスを促進する。多数の上咽頭癌組織標本における Sparc 蛋白発現および flower 蛋白発現を免疫組織化学的に評価する。そして、上咽頭癌とその周囲組織における癌細胞と周辺の咽頭細胞で生じている現象を細胞競合の視点から分析した。これら二つのマーカーと他に報告されているマーカーについても発現を検討した。EBV 陽性の有無は、EBER-In situ hybridization (ISH)を用いた。

3) Sparc 発現の上咽頭癌発癌 initiation における重要性について検討する。すなわち、「正常細胞」、「EBV 感染前-前癌細胞」、「EBV 感染-前癌細胞」、それぞれ単独培養した場合の Sparc 発現について検討する。一般に Sparc は細胞競合の関係の中で誘導される。次に共培養前の各モデル細胞における Sparc と flower の発現について検討する。最後に、これらの細胞に種々のサイトカインやシスプラチンをはじめとした抗がん剤を添加し、細胞競合現象がどの程度変化するかを検討した。

#### 4. 研究成果

1) 「正常上咽頭細胞」、「EBV 感染前-前癌細胞」、「EBV 感染-前癌細胞」、「EBV 感染-癌細胞」の各段階のモデル細胞を作成した。MDS-EV11, CDKN2, TNFRS19 のベクターを「正常上咽頭細胞」NP69 および AdAH、ならびに MDCK 細胞に導入し発現させた。また、「EBV 感染前-前癌細胞」モデルに EBV 癌遺伝子と考えられる LMP1, LMP2, EBNA1 を発現誘導するウイルスベクターを導入し、「EBV 感染-前癌細胞」および「EBV 感染-癌細胞」を作製した。正常上咽頭細胞である NP69、AdAH、イヌ上皮細胞 MDCK 細胞に感染後、細胞集団よりシングルクローンを採取した。「正常上咽頭細胞」、「EBV 感染前-前癌細胞」、「EBV 感染-癌細胞」の各段階のモデル細胞を作成し、タイムラプス顕微鏡下に細胞競合が起こるかを検討した。また、これらの細胞の転写産物を解析した。「正常細胞 vs 癌幹細胞」、「正常細胞 vs 前癌病変細胞」、「正常細胞 vs 癌細胞」の間で一定の「細胞競合」現象を認めしたが、「正常細胞 vs 癌細胞」において顕著に現象を認めた。

2) 上咽頭癌病理組織標本における「細胞競合」関連分子の発現解析を行った。Sparc 発現を解析したところ、EBV 陽性例における腫瘍部分での Sparc 発現低下と、腫瘍と接する正常組織における Sparc の著明な発現が認められた。この現象は、EBV 陽性上咽頭癌では有意差を持って差異を認めしたが、EBV 陰性上咽頭癌においては Sparc の発現は特定の傾向は認めなかった。また、同時に染色を行った flower についても同時に解析を行ったが一

定の傾向は見出せなかった。同様に他の「細胞競合」現象に関連する分子について免疫染色を行ったが一定の傾向は認めなかった。

3) 「正常細胞」、「EBV 感染前-前癌細胞」、「EBV 感染-前癌細胞」、それぞれ単独培養した場合の Sparc 発現について検討を行った。いずれの場合も単独細胞では、Sparc 発現は低い状態であった。共培養を行った上で、フロサイトメーターでセルソーティングを行うと、Sparc は正常咽頭細胞で高発現していることが判明した。しかし、シスプラチンをはじめとした抗がん剤添加によっても TFN や IFN などのサイトカイン刺激によってもその発現の程度に変化は認めなかった。flower の発現についても検討を行ったが、共培養においても単培養においても、flower の発現は低く「細胞競合」現象とは関連性が低いことが示唆された。

#### 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 22 件)

- 1) Wakae K, Aoyama S, Kondo S. (他 16 名, 12 番目) Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing. **Virology** 485:460-466, 2015. 査読有.
- 2) Ahasan MM, Wakae K, Kondo S. (他 14 名, 12 番目) APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem Biophys Res Commun**. 457:295-299, 2015. 査読有.
- 3) Komori T, Kondo S, Wakisaka N. (他 6 名, 2 番目) IL-18 is highly expressed in inflammatory infiltrates of submandibular glands in patients with IgG4-related disease. **Hum Pathol**. 46:1850-8, 2015. 査読有.
- 4) Endo K, Tsuji A, Kondo S. (他 3 名, 3 番目) Carnitine is associated with fatigue following chemoradiotherapy for head and neck cancer. **Acta Otolaryngol**. 135:846-852, 2015. 査読有.
- 5) Yoshizaki T, Kondo S. (他 9 名, 2 番目) Progress and controversy for the role of chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma. **Jpn J Clin Oncol**. 45:244-247, 2015 査読有.
- 6) Endo K, Masatani T, Tsuji A, Kondo S. (他 3 名, 4 番目) Thyroid dysfunction after intra-arterial chemotherapy for hypopharyngeal and laryngeal cancer. **Auris Nasus Larynx** 42:231-234. 2015. 査読有.
- 7) Kanda T, Miyata M, Kano M, Kondo S, Yoshizaki T. (他 2 名, 4 番目) Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. **J Virol**. 89:2684-2697. 2015. 査読有.
- 8) Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Yoshizaki

- T. (他 6 名、3 番目) HPV Status Determines the Efficacy of Adjuvant Chemotherapy With S-1, an Oral Fluorouracil Prodrug, in Oropharyngeal Cancer. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 124:400-406, 2015. 査読有.
- 9) Murono S, Tsuji A, Endo K, Kondo S, Yoshizaki T. (他 2 名、4 番目) Factors associated with gastrostomy tube dependence after concurrent chemoradiotherapy for hypopharyngeal cancer. **Support Care Cancer** 23:457-462. 2015. 査読有.
- 10) Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S. (他 7 名、3 番目) Induction of epithelial-mesenchymal transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. **Histopathology** 66:771-780. 2015. 査読有.
- 11) Aga M, Betnz GL, Kondo S, Yoshizaki T. (他 6 名、5 番目) Exosomal HIF1 $\alpha$  supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. **Oncogene** 33:4613-4622. 2014. 査読有.
- 12) Ueno T, Endo K, Kondo S, Yoshizaki T. (他 4 名、3 番目) Factors affecting outcomes of alternating chemoradiotherapy for nasopharyngeal cancer. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 123:509-516. 2014. 査読有.
- 13) Aga M, Kondo S, Yamada K, Yoshizaki T. (他 9 名、2 番目) Immunoglobulin class switching to IgG4 in Warthin tumor and analysis of serum IgG4 levels and IgG4-positive plasma cells in the tumor. **Hum Pathol.** 45:793-801. 2014. 査読有.
- 14) Yoshizaki T, Kondo S, Wakisaka N. (他 6 名、2 番目) Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett.** 337:1-7 2013. 査読有.
- 15) Murono S, Tsuji A, Endo K, Kondo S. (他 2 名、4 番目) Immunohistochemical detection of SATB1 is independent of thyroid cancer differentiation. **Laryngoscope** 123:2909-2912. 2013. 査読有.
- 16) Nakanishi Y, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T. (他 7 名、2 番目) Role of activation-induced cytidine deaminase in the development of oral squamous cell carcinoma. **PLoS One** 8:e62066. 2013. 査読有.
- 17) Aga M, Kondo S, Yamada K, Yoshizaki T. (他 7 名、2 番目) Warthin's tumor associated with IgG4-related disease. **Auris Nasus Larynx** 40:514-517. 2013. 査読有.
- 18) Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T. (他 6 名、2 番目) Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett.** 331:52-57 2013. 査読有.
- 19) Endo K, Ueno T, Kondo S. (他 6 名、3 番目) Tumor-targeted chemotherapy with the nanopolymer-based drug NC-6004 for oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.** 104:369-374. 2013. 査読有.
- 20) Hirota K, Wakisaka N, Sawada-Kitamura S, Kondo S, Yoshizaki T. (他 4 名、4 番目) Lymphangiogenesis in regional lymph nodes predicts nodal recurrence in pathological N0 squamous cell carcinoma of the tongue. **Histopathology** 61: 1065-1071. 2012. 査読有.
- 21) Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Yoshizaki T. (他 2 名、2 番目) Adjuvant chemotherapy with an oral fluoropyrimidine, S-1, following reduced RADPLAT in advanced laryngeal cancer. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 121:555-562, 2012. 査読有.
- 22) Wakisaka N, Hirota K, Kondo S. (他 4 名、3 番目) Induction of lymphangiogenesis through vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor receptor 3 axis and its correlation with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. **Oral Oncol.** 48:703-708. 2012. 査読有.
- [学会発表](計 7 件)
- 1) Kondo S, Kano M, Aga M, Wakisaka N, Yoshizaki T. The expression of Sparc in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and its relation with cell competition. 7th International Nasopharyngeal Carcinoma Biannual Meeting Symposium. 2015 年 6 月 3 日-6 日、Yogyakarta (Indonesia)
- 2) Epstein-Barr ウィルス関連腫瘍上咽頭癌における Sparc 発現の検討-EBV による細胞競合現象の関連性-. 近藤悟、小森岳、辻亮、遠藤一平、脇坂尚宏、室野重之、吉崎智一. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2015 年 5 月 20 日-23 日、東京国際フォーラム(東京・東京都)
- 3) Relationship between APOBEC3 expression and viral genome hypermutation and integration in HPV-related oropharyngeal cancers. 近藤悟、脇坂尚宏、吉崎智一. 第 74 回日本癌学会、2015 年 10 月 8 日-10 日、名古屋国際会議場(愛知・名古屋市)
- 4) The expression of Sparc in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and its relation with cell competition. 近藤悟、脇坂尚宏、吉崎智一. 第 73 回日本癌

- 学会、2014年9月25日-9月27日、パシ  
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- 5) Epstein-Barr Virus Latent Membrane  
Protein 1 Initiates Cancer Progenitor  
Cells in Nasopharyngeal Cell Lines.  
Kondo S, Kano M, Kobayashi E, Ueno T,  
Pagano JS, Yoshizaki T. 6th  
International Symposium on  
Nasopharyngeal Carcinoma, 2013年6月  
20日-6月22日、Istanbul (Turkey)
- 6) Epstein-Barr ウイルス関連腫瘍上咽頭  
癌における Sparc 発現の検討-EBV と細  
胞競合現象の関連性について-近藤悟、脇  
坂尚宏、遠藤一平、室野重之、吉崎智一、  
第71回日本癌学会、2012年9月20日、  
ホテルロイトン札幌(北海道・札幌市)
- 7) 上咽頭癌組織における Siah1 および低酸  
素関連因子の発現解析. 近藤悟、脇坂尚  
宏、遠藤一平、室野重之、吉崎智一、第  
36回日本頭頸部癌学会、2012年6月7  
日、島根県民会館(島根・松江市)

研究者番号：

〔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

近藤 悟 (KONDO, Satoru)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号：70436822

##### (2) 研究分担者

( )

##### (3) 連携研究者

( )