

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20177

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌幹細胞マーカーCD98の放射線耐性における役割

研究課題名(英文) CD98 is the marker of cancer stem cell and radioresistance

研究代表者

川崎 洋平 (Kawasaki, Yohei)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：00644072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌において、放射線治療における失敗はその後の生命予後不良の原因となる。頭頸部扁平上皮癌細胞株H0-1-u-1, Sa3, HSC2, HSC3, HSC4の5つを用いて60Gy放射線照射を行った。全ての細胞でCD98hcの過剰発現が確認され、Colony形成能や遊走能が亢進していた。CD98hc陽性細胞のみを抽出してみると、陰性細胞と比べて、Colony形成能や浸潤能、接着能が亢進している事がわかった。更に動物実験でも高い腫瘍形成能を有していた。CD98hcというアミノ酸トランスポーターが癌治療の標的となるであろう。

研究成果の概要(英文)：In head and neck cancer, failure in radiotherapy causes subsequent life prognosis failure. 60 Gy radiation was applied to five head and neck squamous cell carcinoma cell lines H0-1-u-1, Sa 3, HSC 2, HSC 3, HSC 4. Overexpression of CD98hc was confirmed in all cells, and Colony forming ability and migration ability were enhanced. When only CD98hc positive cells were extracted, it was found that Colony forming ability, invasion ability, and adhesion ability were enhanced as compared with the negative cells. Furthermore, it had high tumorigenicity in animal experiments. The amino acid transporter CD98hc will be a target for cancer therapy.

研究分野：癌幹細胞

キーワード：CD98hc 癌幹細胞 放射線耐性 頭頸部扁平上皮癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線化学療法は、頭頸部扁平上皮癌において重要な治療法の一つである。しかし、放射線加療に全く効果ないものや、すぐに再発してくる腫瘍にしばしば遭遇する。以前より、放射線治療の失敗は癌幹細胞に起因すると言われていたが、未だに癌幹細胞のマーカーを特定できていない。

2. 研究の目的

癌幹細胞のマーカーを同定する。その事が放射線感受性のマーカーの同定ともなり、予後不良である、頭頸部扁平上皮癌患者の予後改善につながる。

3. 研究の方法

・ Cell Culture

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株である Sa3(Gingiva), HO-1-u-1(Mouth o floor), HSC2, HSC3, HSC4(Tongue)を理研バイオリソースセンター(Ibaraki, Japan)より購入した。細胞は、10% FBS(Clonotech laboratories, Mutain View, CA)を加えた RPMI1640 培地(Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を用いて、37℃, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

・ 放射線耐性株の作成

5つの Cell Line を臨床に即する様に、2Gy/dayで合計60Gyまで放射線照射を行った(M-150WE, SOFTEX, Japan)。生存した細胞の培養を安定するまで継続した。

・ Flow Cytometry

各細胞浮遊液(1\*10<sup>6</sup>)に FITC-conjugated anti-human CD98hc mAb(eBioscience, Wien, Austria)を1:11の割合で加え、4℃, 15分インキュベートした。PBSで洗浄後にPIを加え、FACSAria (Becton, Dickinson and Company)でCD98hc陽性率の解析を行った。

・ Colony Formation Assay

96 well 上にそれぞれ 1\*10<sup>4</sup>個、無血清半流動培地上で20日間培養した。50個以上の細胞の塊を Colonyとしてカウントした。

・ Wound healing assay

6cm dish 上で培養を行い、Confluent になった段階で、200µl チップで dish 上に創を作り、無血清培地で24時間培養した。細胞の遊走能を Image Jで測定した。

・ Invasion Assay

24 well のプレートを用いて、8µm ボイデンチャンバー(Falcon USA)上を25µlでコーティングした。上層には、1\*10<sup>4</sup>個を無血清培地に入れ、下層には血清培地を入れた。48時間後にフィルターを通過してきた細胞をカウントした。

・ Plating Efficiency

FACSAria を用いて、CD98hc+細胞と、CD98hc-細胞にソーティングし、6cm Dish 上

に 1\*10<sup>3</sup>個播いて、RPMI1640 で培養。24 時間後に Colony をカウントした。

・ in vivo

Sa3 を用いて、CD98+細胞と CD98-細胞に分離し、ヌードマウスに 1\*10<sup>5</sup> 皮下注射した。

・ 4. 研究成果

**放射線耐性株は CD98hc を過剰発現する**

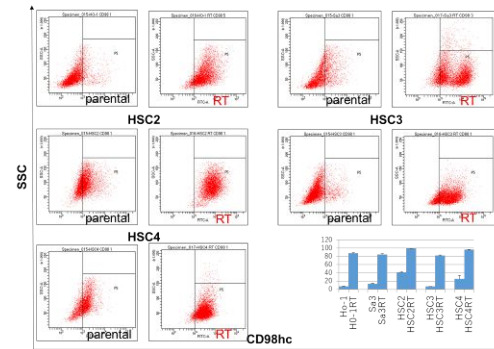


Figure1. 親株と放射線耐性株の比較  
放射線耐性株は5つの細胞株で、CD98hc が過剰発現している (p<0.01)。

**放射線耐性株は多くの Colony を形成する**

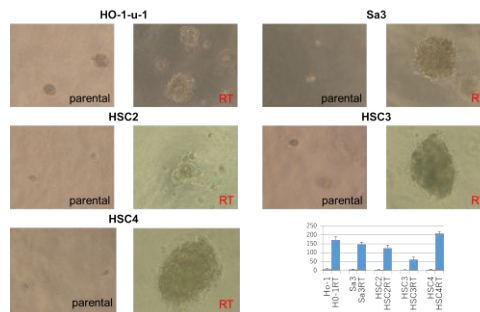


Figure2. Colony 形成能の検討  
放射線耐性株は無血清半流動培地上で多くの Colony を形成できる (p<0.05)

**放射線耐性株は遊走能が亢進している**

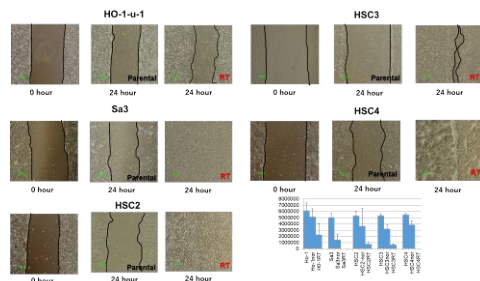
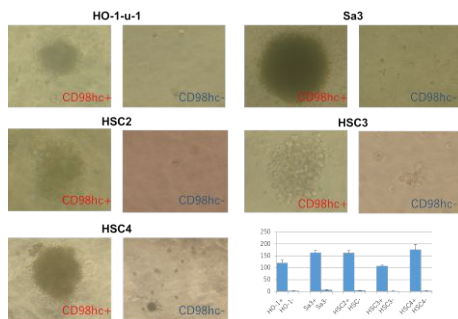


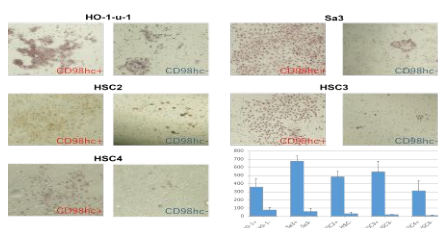
Figure3. 遊走能の検討  
放射線耐性株は遊走能が亢進している (p<0.01)。

**CD98hc 陽性細胞は多くの Colony を形成する**



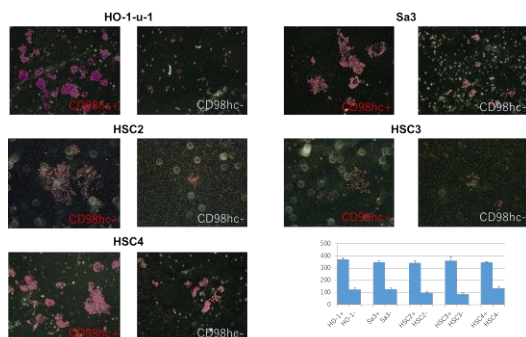
**Figure4.** CD98hc+とCD98hc-の Colony 形成能  
CD98hc 陽性細胞は無血清半流動培地地上でも  
多くの Colony を形成する(p<0.01)。

### CD98 陽性細胞は強い浸潤能を持つ



**Figure5.** CD98 陽性細胞は CD98hc 陰性細胞に  
比べて、強い浸潤能を有する (p<0.05)

### CD98 陽性細胞は PE が亢進している



**Figure6.** CD98hc 陽性細胞は多くの大きな  
Colony を形成した(P<0.05)。

### CD98hc 陽性細胞は腫瘍形成能をもつ



**Figure7.** CD98hc+を左下腿、CD98hc-を右下  
腿に  $1 \times 10^5$ 皮下注した。CD98hc+のみが腫瘍を  
形成できた。

### 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 3件)

1. Kawasaki, Y., et al. Increased Expression of CD44v9, A Cancer Stem Cell Marker, in Head And Neck Squamous Cell Carcinoma Cells after Irradiation. (2017) Int J Cancer Oncol 4(2): 225-230. 査読有 . DOI: 10.15436/2377-0902.17.1628
2. 川寄洋平., 放射線照射後中下咽頭癌症例に対する ELPS の問題点. 頭頸部外科 27 (3) : 269-275, 2017 査読有  
DOI:https://doi.org/10.5106/jjshns.27.269
3. Kawasaki, Y., et al. A subcutaneous follicular dendritic cell sarcoma occuing in the cheek: case report. Int J Clin Exp Med 2018;11(2):1115-1118 査読有.  
[http://www.ijcem.com/V11\\_No2.html](http://www.ijcem.com/V11_No2.html)

[学会発表](計 6件)

1. 第 27 回日本頭頸部外科学会 (2月 2017 東京)川寄洋平. 根治照射後中下咽頭癌再発症例に対する ELPS の問題点
2. 110th Annual Meeting for American Association for cancer research (April,2017 Washington DC, USA) Kawasaki Y. The expression of CD98hc might be a marker of radio resistance in HNSCC.
3. 第 27 回日本フローサイトメトリー学会 (6月 2017 神戸) 川寄洋平. CD98 は癌幹細胞・放射線感受性のマーカーである。
4. 第 76 回日本癌学会 (9月 2017 横浜) 川寄洋平. 頭頸部扁平上皮癌細胞は放射線照射によって CD98hc/CD44v9 の細胞集団が増加する。
5. 第 30 回日本口腔・咽頭学会 (9月 2017 金沢) 川寄洋平. Salvage ELPS の有効性の検討
6. 3<sup>rd</sup> International Multidisciplinary Medical Congress (November 2017, Tirana, Albania) Yohei Kawasaki. The problems of ELPS for recurrent oro-hypopharyngeal cancer after chemoradiotherapy.

[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 川崎 洋平 (KAWASAKI, Yohei)

秋田大学・医学部附属病院・助教  
( )

研究者番号：00644072

(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  
( )