

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 19 年～平成 20 年
 課題番号：19592000
 研究課題名（和文） 頭頸部がんにおける SP 細胞の同定と幹細胞としての機能に関する研究
 研究課題名（英文） Stem cell function of SP cells in head and neck cancer
 研究代表者
 藤 井 正 人

研究成果の概要：

近年、癌組織中に自己複製と多分化能をもつ幹細胞の存在が明らかとなりその機能について多くの報告がなされている。癌幹細胞は癌の再発、転移に深く関わっていることが報告されている。予後不良の頭頸部癌に対して再発や転移を抑制するために、頭頸部癌における癌幹細胞の同定とその機能を解明することをも目的に研究を行った。その結果、頭頸部癌細胞を用い癌幹細胞としての Side population(SP)の存在、Clone 形成率また幹細胞マーカーも発現を確認した。本研究によって頭頸部癌の SP 細胞の存在が確認され、それらが癌幹細胞としての機能を持つことが示唆された。今後それらの因子やマーカーを明らかにすることによって頭頸部癌の治療の進歩が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,100,000	630,000	2,730,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード： 頭頸部外科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞としての SP 細胞の同定と頭頸部癌におけるその存在について

幹細胞とは自己複製機能を持ち、状況に応じて様々な成熟した組織に分化する能力を持った細胞とされている。生体内における幹細胞は胚性幹細胞との対比で体性幹細胞と称されている。体性幹細胞はいくつかの臓器で証明

されているが主なものは造血細胞でありそのほか、脳、皮膚、乳腺や肺などがある。さらに、造血幹細胞と同様な機能を持つ細胞が白血病細胞の中に存在することが明らかとなり、さらに固形癌の中にも自己複製能力の異なる様々なタイプの細胞が混在していることが示唆されるようになって来た。いくつかの固形癌ではコロニー形成能が高い少数の腫瘍細胞集団があり、近年になって発展した細胞マー

カーの研究やフローサイトメトリーの開発によってそれらは体性幹細胞と同様に多分化能と自己複製能を併せ持つ幹細胞の特性を示す「癌幹細胞」が存在することが明らかとなってきた。この細胞群はHoechst33342で染色性の弱い細胞群として同定されることからSP (side population) 細胞と呼ばれている。SP細胞は脳腫瘍をはじめとして乳癌、膵癌、前立腺癌でその存在が明らかとなってきている。脳腫瘍では、6-20%を占める CD133陽性細胞が腫瘍化形成能力を示す幹細胞であることが証明され、乳癌では乳癌患者の腫瘍組織中から腫瘍形成能力が有意に高い細胞群であるCD44陽性かつCD24陰性でかつ分化した細胞のマーカが陰性の細胞群が分離され癌幹細胞の存在が示されている。頭頸部癌では、Chenらが、頭頸部癌細胞株でSP細胞の存在を報告している (Chen JS et al.; Laryngoscope 116, 401-406, 2006)。また、松村らは頭頸部癌細胞株10株においてSP細胞が0.25-20%存在しマイクロアレイ解析によりABC transporter geneやcalcium-transporting, NF-kappaB cascadeの活性化を報告している (第65回日本癌学会抄録p502 p-1212, 2006)

(2) 癌幹細胞と癌の増殖・転移・再発との関連正常細胞または体性幹細胞から様々な遺伝子変異をうけて発現した癌幹細胞は癌の増殖、転移、再発に深くかかわっていると考えられている。癌病巣の中には癌幹細胞が存在し放射線治療や化学療法によってアポトーシスを受けずに残存し再発をきたす。また、原発巣から離脱して血管やリンパ管内を移動し転移をきたすと考えられている。

(3) 頭頸部癌治療に与えるインパクト

頭頸部癌の治療は喉頭や咽頭の機能すなわち発声・嚥下・顔面形態などを温存するために手術・化学療法・放射線治療の集学的治療が行われている。近年では化学放射線治療が臓器機能温存治療として積極的に行われている。その一次治療成績は良好でありStageIII・IVであっても60%-90%の腫瘍消失率が得られている (Fujii M et al; Int J Cancer 9 107-112, 2004)。しかし、その後の再発率、遠隔転移率が高く3年生存率は30-40%に低下するとの報告が多い。すなわち臓器機能温存治療においては化学放射線治療の後の再発、転移の抑制が重要な課題である。そこで、頭頸部癌における癌幹細胞の同

定とその機能の解明により癌幹細胞に対する治療戦略が必要と考えられる。

2. 研究の目的

癌幹細胞の同定方法に関しては現在のところHoechst33342染色によってSP細胞の分離による方法が一般的である。Chenらは頭頸部癌細胞株にて0.69-0.91%のSP細胞を分離している。現在、頭頸部癌細胞株におけるSP細胞の存在はほぼ確実と考えられるが実際の臨床検体での検討はなされていない。さらにSP細胞の癌幹細胞としての機能評価はいまだ不十分と考えられる。われわれはまず様々な頭頸部癌細胞株についてSP細胞の比率を検討し、臨床検体でも同様の検討を加える。SP細胞の癌幹細胞としての機能をin vitro とin vivo で検討する。SP細胞は癌幹細胞として高い腫瘍形成能を持っていると考えられるが、生体内での固形癌の増殖は癌病巣を取り巻く様々な環境も関与していると考えられる。そこで、in vitro において癌幹細胞の機能発現とがん細胞周囲の繊維芽細胞や増殖因子などの様々な液性因子との関連も検討すべきと考えられる。頭頸部癌における癌幹細胞の研究は始まったばかりであるため、今回の研究の目的は以下の範囲とする。

- (1) 頭頸部癌細胞株のみならず臨床検体(頭頸部扁平上皮癌組織)においてもSP細胞を確認し、その割合をみて癌幹細胞としてのSP細胞の存在を確認し、細胞株の間での相違や様々な病態でのSP細胞発現の違いを明らかにする。
- (2) SP細胞の癌幹細胞としての機能評価を、コロニー形成能(in vitro)腫瘍形成能(in vivo)で行いSP細胞の癌幹細胞としての機能を明らかにする。
- (3) SP細胞の遺伝子解析によりSP細胞で活性化している遺伝子のsignaling pathwayを検討し頭頸部癌における癌幹細胞の遺伝子マーカーとして成り立つものを検討する。

3. 研究の方法

(1) In vitro においてさまざまな頭頸部癌細胞株におけるSPの存在を確認する。

我々が継代培養している頭頸部癌細胞HSC-4、SASを用いてHoechst33342で染色する。染色した細胞はFACSによって蛍光度の弱い細胞

群を同定することにより SP 細胞の存在を確認する。幹細胞は ABC transporter gene を発現していることが知られており (Yano et al; Stem Cells 23;834-841, 2005)、これは Hoechst33342 の染色性を低下させることから ABC transporter の Blocker である Verapamil を添加して FACS による解析を行い SP 細胞に幹細胞として ABC transporter が機能しているかを検討する。FACS で抽出した SP 細胞とその他の細胞 (nonSP 細胞) を以下の実験に使用する。

(2) SP 細胞の癌幹細胞としての機能を検討する: (in vitro での検討)

自己複製能 (Self-renewal) の検討: FACS にて分離抽出した SP 細胞を低密度 (~100Cells/3.5cm dish) で培養し、クローン形成を確認する (Clone number & Clone size (cells/clone))。また幹細胞の自己複製能に重要な hedgehog signaling に関連して Bmi-1 の関与が報告されている (Liu et al; Cancer Res 66;6063-6071, 2006) が、頭頸部癌 SP 細胞に関しても Bmi-1 gene の発現を検討する。以上の結果は、すべて nonSP 細胞と比較検討する

(3) 癌幹細胞の様々な幹細胞関連分子発現の検討: SP 細胞と nonSP 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行うことにより幹細胞に関連する分子や膜受容体の発現を検討する。癌幹細胞は Notch signalling pathway の活性化が報告されており Notch の細胞外 domain は浸潤酵素である matrix-metalloprotease によって切断される (Kondo EJC 42;1237-1242, 2006) ことから癌細胞の浸潤性に深くかかわっていると考えられ Notch1-4, MT1-MMP の発現を検討する。一方、Wnt signaling pathway も重要であり (Guo W

et al; Pediatric Research 59 ; 59-64, 2006) その receptor である Wnt1 と関連する β -catenin の発現をみる。

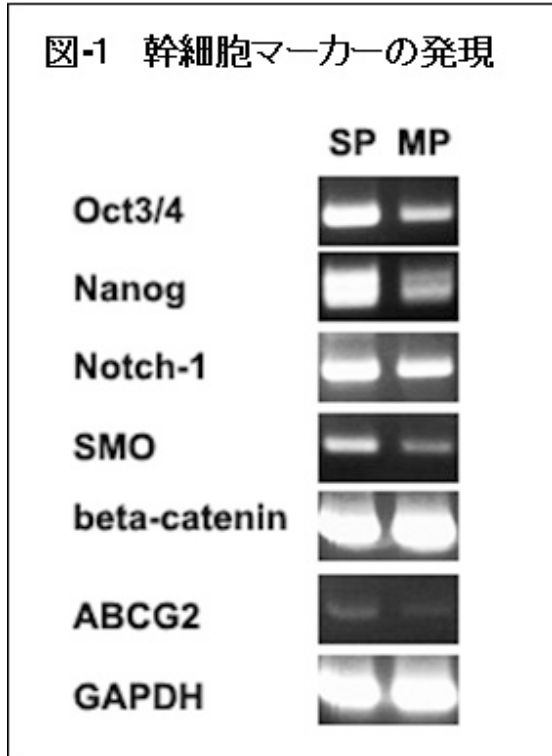
(4) Repopulation 能力の検討: 自己複製能を持つ癌幹細胞は増殖して癌幹細胞が多く存在する細胞集団を形成する (Repopulation)。そこで SP 細胞と nonSP 細胞における Repopulation 能力を検討する。おのおの、1-2 週間 静置培養した後に再度 Hoechst33342 で染色し、FACS による解析を行い SP 細胞の割合を検討する。

4. 研究成果

HSC4 に SP 細胞の存在が確認されたが (約 0.4%)、HSC3 においては SP 細胞の存在は確認されなかった。HSC4 から分離した SP 細胞と MP 細胞をさらに培養すると、SP 細胞由来の細胞には SP と No-SP (MP) 細胞が存在することが確認された。しかし、MP 由来の細胞には SP 細胞の存在は確認されなかった。SP と MP 細胞における単一細胞の Clone 形成率では、有意差が認められなかった。幹細胞のマーカーである Oct3/4, Nanog, Bim-1 の発現について検討した。その結果、Oct3/4, Nanog, Bim-1 のすべてにおいて MP 細胞と比べて SP 細胞の方が高発現していることが確認された (図 1)。

以上の結果から、頭頸部癌において SP 細胞の存在が確認され (図 2)、それらが癌幹細胞としての機能を持つことが示唆され、癌幹細胞のマーカーを発現していることが確認された。今後、この SP 細胞を利用して、癌幹細胞としての性質の維持、増殖、分化に関連する因子を解明する予定である。それらの因子やマーカーを明らかにすることによって頭頸部癌の治療の進歩が期待できる。

図-1 幹細胞マーカーの発現



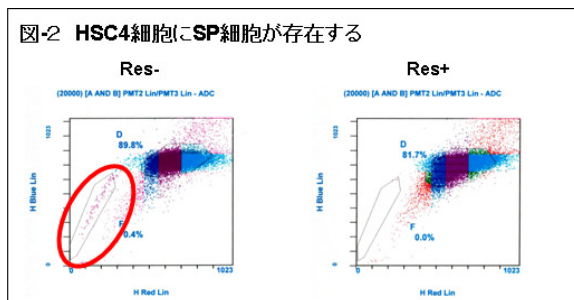
〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

図-2 HSC4細胞にSP細胞が存在する



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0件）

〔学会発表〕（計2件）

Masato Fujii, Guang wei Sun, Yutaka Tokumaru ; Identification of stem-like cells in head and neck cancer cell lines 7th International Conference on Head & Neck Cancer 2008, July, 18 San Francisco

Guangwei Sun, Masato Fujii, Yutaka Tokumaru; Differential stemness potential of head and neck cancer cell line. 第67回 日本癌学会 2008年10月29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 正人

独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター 臨床研究センター 聴覚平衡覚研究部 部長

研究者番号：70129633

(2) 研究分担者

孫 廣煒

独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター 臨床研究センター 聴覚平衡覚研究部 外部研究員

研究者番号：40425773

(3) 連携研究者