

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19592306

研究課題名（和文） 唾液腺癌における“がん幹細胞”の分離と特性解析

研究課題名（英文） Isolation and analysis of salivary gland cancer stem/progenitor cell.

研究代表者

廣田 誠

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20347305

研究成果の概要：

放射線照射を受けたヒト唾液腺を用い、血清含有培地を用いた後に無血清培地に培地交換を行う手法で、低密度培養からのコロニー形成が観察できる幹／前駆細胞培養系を樹立した。分離された細胞は RT-PCR 及び免疫組織学的染色により腺房・導管・筋上皮細胞への分化を示した。また、得られたコロニーを再び分離・培養したところ、高頻度のコロニー形成を認めた。以上より、唾液腺幹／前駆細胞の存在が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：唾液腺、癌幹細胞、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

歯科・口腔外科領域において唾液腺癌は治療の困難な悪性疾患である。従来、癌は均一な細胞集団であると考えられていたが、最近になって癌組織においても少数の幹細胞、すなわち、“がん幹細胞 (cancer stem cell)” が存在し、腫瘍組織における階層的な細胞社会の起点となっている可能性が認識されつつある。本研究では、正常組織における幹細胞分離に駆使されている

FACS (Fluorescence activated cell sorting) を用いた手法を唾液腺癌に応用することにより、唾液腺癌における“がん幹細胞”の分離・同定・特性解析を行い、幹細胞システムの理解という視点から唾液腺癌における再発・転移機構の解明を試みる。

2. 研究の目的

幹細胞分離に駆使されているコロニーアッセイを用いた手法を障害唾液腺組織および唾液腺癌細胞に応用することにより、唾

液腺癌における“がん幹細胞”の分離・同定・特性解析を行い、幹細胞システムの理解という視点から唾液腺癌における再発・転移機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 培養条件の検討

①血清添加培地を用いた検討

ヒト唾液腺臨床検体より細胞を分離し、10%ウシ胎児血清添加のDMEM/F12培地及び35mm培養ディッシュ(CELLSTAR)を用いて培養条件の検討を行った。細胞播種密度については高密度(1.0×10^4 cells/cm²)と低密度(300cells/cm²)の条件で常時温度37°C、CO₂濃度5%、湿度100%に設定した培養器で検討を行った。細胞培養には、独自に配合した培地を用いた。すなわち、DMEM/F-12 1:1 mixture (SIGMA)に、10%FBS (Lot: 32300103, MOREGATE)、insulin (0.1µg/ml) (Wako)、dexamethasone (1×10^{-7} M) (SIGMA)、nicotinamide (10mM) (SIGMA)、L-glutamine (2mM) (GIBCO)、β-mercaptoethanol (50µM) (SIGMA)、HEPES (5mM) (Wako)、ANTIBIOTIC ANTIMYCOTIC SOLUTION (10µl/ml) (SIGMA)、NaHCO₃ (44mM) (Wako)を添加した。RPMIについてもDMEM/F12同様に10%FBS、insulin(0.1µg/ml)、dexamethasone (1×10^{-7} M)、nicotinamide (10mM)、L-glutamine (2mM)、β-mercaptoethanol (50µM)、HEPES (5mM)、ANTIBIOTIC ANTIMYCOTIC SOLUTION (10µl/ml)、NaHCO₃ (44mM)を添加した。培地交換は4日毎に行った。

②無血清培地を用いた検討

臨床検体より細胞を分離し、無血清培地CnT-24 (CELL n TEK Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland) 及び35mm培養ディッシュを用いて、細胞の播種密度を高密度(1.0×10^4 cells/cm²)と低密度(300cells/cm²)と設定し、2週間培養を行い培養条件の検討を行った。

③血清添加培地と無血清培地を組み合わせ併用した場合

ヒト唾液腺臨床検体由来の細胞を35mm培養ディッシュを用い300cells/cm²の低密度にて、血清添加培地(10%ウシ胎児血清添加のDMEM/F12培地)中に播種し、2日間培養を行った。2日後に培地を無血清培地(CnT-24)へ交換を行い、培養を継続した。

(2) 放射線照射後ヒト唾液腺臨床検体の検

討及び細胞培養

①唾液腺臨床検体の組織切片の作成

ヒト唾液腺臨床検体は、頭頸部癌患者で頸部郭清術を施行する症例で患者の同意が得られたものについて、頸部リンパ節の切除に付随して切除される病理診断には不必要な部位の唾液腺について検体とした。検体を提供していただくにあたり、対象となる患者には十分なインフォームドコンセントを行い、同意が得られた症例のみを検体とした。本研究は横浜市立大学医学部倫理委員会の承認済みである。全ての検体についてB型肝炎やC型肝炎、HIVや成人T型白血病ウイルスに陰性であることを確認した。

ヒト顎下腺臨床検体で、術前に放射線治療を先行して行っている症例についても本研究における臨床検体として扱い解析を行った。当初は細胞分離及び培養系の検討・確立及び実験アウトラインの設定に臨床検体を用いた。コロニーアッセイ系を確立した後に培養系における多分化能や増殖能の評価を行った検体は、放射線未照射の症例由来の顎下腺臨床検体1症例(sample 1; 66歳男性)と、3症例分の放射線照射後の唾液腺臨床検体(sample 2; 55歳女性、sample 3; 39歳男性、sample 4; 75歳男性)であった。放射線照射後唾液腺の照射量はそれぞれsample 2; 40Gy、sample 3; 60Gy、sample 4; 60Gyであった。RT-PCRと免疫組織学的染色のポジティブコントロールとして、放射線未照射のヒト口唇腺が用いられた。

ヒト唾液腺臨床検体の組織学的解析について、まずは凍結切片を作成した。顎下腺を1cm³程度に切り出し、2%パラホルムアルデヒド(PFA) (Wako)/リン酸緩衝食塩液(PBS) (pH7.4)で4°C、2時間固定した。次に、100mM塩化アンモニウム(Wako)/PBSで4°C、10分間、3回洗浄した。そして、15%スクロース(Wako)/PBSに4°C、1時間浸した後、30%スクロース/PBSで4°C、over nightで静置した。O.C.T. Compound (SAKURA) (30ml)と9%スクロース/PBS (10ml)を混合した包埋剤に組織を包埋した。4°C、3時間静置した後、液体窒素で急速凍結し、凍結ブロックを作製した。凍結ブロックをクリオスタットHM 500 O (Carl Zeiss, Germany)で5µmの厚さに薄切し、組織切片を作製した。ヘマトキシリンエオジン染色に関して、組織切片を流水水洗した後、イオン交換水を通し、マイヤー・ヘマトキシリン液(武藤化学)に8分間静置した。再び、流水水洗した後、飽和炭酸リチウム溶液(Wako)を通して色出しをして流水水洗した。イオン交換水を通し、エオジン液

に4分間静置した。再び、イオン交換水を通し、エタノール (Wako) (6槽) で脱水、キシレン (Wako) (6槽) で透徹した後、マリノール (武藤化学) で封入した。エオジン液は、エオジン Y (SIGMA) 2.5g をイオン交換水 250ml に溶解し、酢酸 (Wako) 1.25ml を添加した後、80%エタノール (Wako) /イオン交換水を加えて作製した。

②ヒト唾液腺組織由来の細胞分離

ヒト唾液腺臨床検体を、手術室より氷上にて10%DMEM/F12に浸しながら搬送し、研究室にて組織を細切した。その後組織片をMillex(0.22 μ) (MILLIPORE) でろ過滅菌したコラゲナーゼ (新田ゼラチン) 0.07%/0.05%trypsin-EDTA(GIBCO)に移し、ピペティングを行った後、37°Cで90分消化を行った。その後セルストレイナー (40 μ m) (BDFalcon) でろ過した細胞懸濁液を遠心 (1300rpm, 4°C, 3分間) し、上澄を取り除いた後、顎下腺細胞を回収した。回収した細胞は10%血清含有DMEM/F12にて洗浄し、再度遠心した。洗浄は2回行った。トリパンブルー染色によって、細胞の生存率が85%以上であることを確認した後、培養を行った。

③コロニーアッセイ系における検討

ヒト唾液腺臨床検体由来の細胞を35mmディッシュに播種し、300cells/cm²の播種密度にて血清含有培地にて2日間培養を行った。培養2日目に培地を無血清培地に交換し、その後も培養を継続した。無血清培地は4日毎に培地交換を行った。

④RT-PCR 解析

コロニー上にクローニングリングを置き、QIAGEN micro kit (QIAGEN GmbH, Hilden Germany)を用いてRNA抽出を行った。0.8 μ Lのoligo-dt primerをRNA水溶液に加え75°C5分間加熱し、42°C5分間ハイブリダイゼーションを行った。1 \times first-strand buffer, 0.5mmol/L dNTP, 5mmol/L dithiothreitol, and 200units of Super ScriptIII (Gibco BRL)を含んだ20 μ lの反応液にRNAを加えてcDNAを合成した。PCRは25 μ lの反応液 (1 \times PCR buffer, Taq DNA polymerase) を用いて行い、ヒト唾液腺特異的なプライマーを用いた。プライマーの塩基配列は以下の通りである。amylase (Amy) (5'-TTG TCG TCT GTC TGG TCT TCT C-3' and 5'-AGC AAG CAT AAA TCC AAC TGC-3'), aquaporin3 (AQP3) (5'-CCT GGT GAT GTT TGG CTG T-3' and 5'-ACA CGA TAA GGG AGG CTG TG-3'), Na⁺/K⁺ ATPase (5'-TCC TGA AGG GTT CCA GTT

TG-3' and 5'-AGT CAT TCA CAC CGT CAC CA-3'), cytokeratin 7 (CK7) (5'-CAG GAT GTG GTG GAG GAC TT-3' and 5'-AAC TTG GCA CGC TGG TTC T-3'), cytokeratin 14 (CK14) (5'-GGC CTG TCT GTC TCA TCC TC-3' and 5'-GGC TCT CAA TCT GCA TCT CC-3'), cytokeratin 18 (CK18) (5'-GGA GCA CTT GGA GAG AAG G-3' and 5'-TGG CAA TCT GGG CTT GTA G-3'), alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (5'-GTG ACG AAG CAC AGA GCA AA-3' and 5'-GAT GAA GGA TGG CTG GAA CA-3'), vimentin (Vim) (5'-TCA GAG AGA GGA AGC CGA AA-3' and 5'-GCT TCA ACG GCA AAG TTC TC-3'), and GAPDH (5'-CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC-3' and 5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3').

PCRサイクルはDenaturationを95°C4分間行い、94°Cを40秒間、58°C - 60°Cを40秒間、72°C40秒間を35サイクル、最後にExtensionを72°C7分間で行った。PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動を行った。

⑤免疫組織染色と免疫細胞染色

顎下腺組織は2%パラホルムアルデヒド (PFA) (Wako) /リン酸緩衝食塩液 (PBS) (pH7.4) で4°C、2時間固定した。30%スクロース/PBSで4°C、over nightで静置した。O.C.T. Compound (SAKURA) に組織を包埋した凍結させた。5 μ mの厚みに薄切し4°Cのasetoneに10分間固定し、TBS-Caで3回洗浄した。培養細胞はmethanolにて-30°C10分間固定し、0.05%Tween20を含んだPBSで3回洗浄した。その後Block Ace(Dainihon seiyaku)でブロッキングを行い、固定された切片と細胞を一次抗体4°Cで16時間反応させた。用いた一次抗体はanti-Human Cytokeratin (DAKO Cytomation, Glostrup Denmark)、anti-cytokeratin14 (Abcam, Cambridge, UK)、anti-cytokeratin 7 (DAKO Cytomation, Glostrup Denmark)、anti-Amylase (Sigma Aldrich)、anti-AQP3 (Chemicon, TemelUCA, CA, USA)、anti- α -SMA (Lab Vision, CA, USA)。PBS-Tween20で洗浄しAlexa488標識ロバ抗ウサギIgG抗体(Molecular Probes, Eugene, OR USA)、Cy3標識ロバ抗マウスIgG抗体 (Sigma)と室温で1時間反応させた。TBS-Caで10分、3回洗浄した後、4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)が添加されている封入剤 VECTASHIELD (VECTOR) で封入し、正立型システム顕微鏡で観察し、冷却 CCD 顕微鏡 デジタルカメラ Zeiss Axio ImagerM1 (Carl Zeiss, Germany) で撮影した。

⑥コロニーの再播種による自己複製能の検討

クローニングリングをコロニーの上に静置し、リング内面に0.05%trypsin-EDTAを滴下した。10分間37°Cにて加温し、細胞の浮遊を確認した後に懸濁液を回収し、遠心・洗浄し、無血清培地中に細胞を入れ、24well culture plate (CELLSTAR)に播種を行った。

(3) 唾液腺細胞株への抗癌剤試験と再増殖の検討

ヒト唾液腺粘表皮癌細胞株 (HTB41) を用いて、10%ウシ胎児血清添加の DMEM/F12 培地及び 35mm 培養ディッシュ (CELLSTAR) を用いて培養条件の検討を行った。細胞播種密度については高密度(1.0×10^4 cells/cm²) と低密度 (300cells/cm²) の条件で常時温度 37°C、CO₂ 濃度 5%、湿度 100%に設定した培養器で検討を行った。培養液に抗癌剤 (シスプラチン) を添加し、細胞の状態を実体顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養系の検討

①血清添加培地を用いた検討

ヒト唾液腺臨床検体由来の細胞を 10%ウシ胎児血清添加 DMEM/F12 及び 10%ウシ胎児血清添加の RPMI1640 培地を用いて常時温度 37°C、CO₂ 濃度 5%、湿度 100%に設定した培養器で培養を行った。細胞の播種密度を高密度に設定した場合においても低密度で行った場合においても同様に、細胞は培養開始から 24 時間~48 時間後には生着し、数日間は細胞の増殖が認められた。しかしその後細胞の増殖は停止、細胞は平坦な形態を示しセネッセンス状態となり、中には培養ディッシュ表面から剥離してしまうものもあった。血清培地を単独で用いて唾液腺細胞の長期培養は不可能であった。

②無血清培地を用いた検討

ヒト唾液腺臨床検体由来の細胞を無血清培地 Cnt-24 を用いて培養した場合、播種密度を高く設定した場合唾液腺細胞はディッシュに生着し、増殖を示した。敷石状の形態を有した細胞が多く出現、その後多角形の外形を示す細胞も出現し、類円形を保ったコロニーが多数認められ、これらの細胞はコンフルエントに達するまで増殖し続けた。しかしヒト唾液腺細胞を低密度で培養し場合は、細胞はディッシュに生着せず培養は不可能であった。

③血清添加培地と無血清培地を組み合わせる低密度培養を行った検討

ヒト唾液腺細胞を細胞分離後に 300cells/cm² の低密度で播種、最初の 48 時間は血清添加の培地で培養を行い、48 時間後に培地を無血清培地に交換を行った。この培養条件では細胞は培養ディッシュに生着し、コロニーの形成が認められた。

(2) 放射線照射後ヒト唾液腺臨床検体の検討及び細胞培養

①唾液腺臨床検体の組織像

唾液腺臨床検体の組織学的解析を行うため、凍結切片作成後ヘマトキシリン-エオシン染色を行った。Sample 1 の唾液腺は放射線照射を過去に行っていない患者から得られたものであった。また、Sample 2, 3 及び 4 に関しては頭頸部癌の患者で頸部郭清術を施行する以前に放射線治療を先行して行った症例から得られたものであった。放射線治療を術前に行った検体即ち Sample 2, 3 及び 4 において腺房細胞の萎縮及び導管構造の拡張も認められた。さらに、検体 4 の顎下腺の組織像において、著しい導管構造の破壊が認められた。

②顎下腺細胞の細胞調整及び細胞培養

顎下腺組織を分離し、35-mm 培養ディッシュ及び 10%ウシ胎児血清含有 DMEM/F12 培地を用いて 300cells/cm² の播種密度にて細胞播種を行い、2 日間培養を行った。その後培地を Cnt-24 無血清培地に培地交換を行った。培養 14 日後には大型のコロニーが形成された。

③顎下腺組織由来細胞のコロニーアッセイ系

コロニーカウントを培養 3 日目、7 日目及び 14 日目に行った。Sample 1, 2 及び 3 より得られた細胞 に関してはコロニーアッセイ系を用いた解析が可能であったが、Sample 4 に関しては培養が不可能であった。培養可能であった 3 検体について、培養 3 日目においては放射線被曝後顎下腺検体から得られた Sample のほうが放射線未被曝のものに比べコロニー形成数が多かったが、培養 7 日目には放射線未被曝の検体の方が放射線被曝群よりコロニー形成数が多かった。培養 14 日目においては、全てのサンプルがほぼ同等なコロニー形成能を示した。

④クローナルなコロニーにおける蛍光標識

免疫組織学的染色を用いた多分化能の検討

ヒト唾液腺コロニーアッセイ系により生じたコロニーを培養3日目及び7日目において、唾液腺細胞分化マーカーに対する免疫組織学的染色を行い、タンパク質の免疫学的な検出により細胞の分化能・多分化能を評価した。導管上皮細胞のマーカーであるCKs、CK14、CK7、腺房のマーカーであるAmylase、AQP3、筋上皮細胞のマーカーである α -SMAを用いて、Amylase/CKs、AQP3/CK14、SMA/CK7の組み合わせで二重染色を行った。その結果、培養3日目のコロニーは導管のマーカーを強く発現しており腺房のマーカーは弱い発現が一部で認められたのに対し、培養7日目のコロニーにおいては導管マーカーの発現のみならずAmylase、AQP3、SMAを発現するコロニーを確認することができた。

⑤RT-PCRによるmRNAの解析

コロニーアッセイ系を用いて、唾液腺臨床検体より得られたコロニーの培養14日目における唾液腺細胞分化マーカーのmRNAレベルでの発現解析を、放射線未照射の検体(Sample 1)と放射線照射後の検体について(Sample 2, 3)について、RT-PCR法を用いて行った。放射線未照射の検体に関しては、5/9のコロニーが腺房・導管・筋上皮のマーカーの発現が認められたのに対し、放射線照射後の検体に関しては多分化能のマーカーを示すコロニーの割合が低かった。

⑥コロニーの再播種による自己複製能の検討

放射線照射後の検体由来のコロニーに対して、クローニングリング及びトリプシンを用いてコロニーをプレートより除去し、再び播種を行った。その結果、6/9のコロニー由来の細胞が高い増殖を示した。

(3) 唾液腺細胞株への抗癌剤試験と再増殖の検討

HTB41細胞は紡錘形細胞から類縁形に変形したが、再増殖が進むに連れて、形態が再び紡錘形へと変化していった。また接着性が増していった(図1、2)。

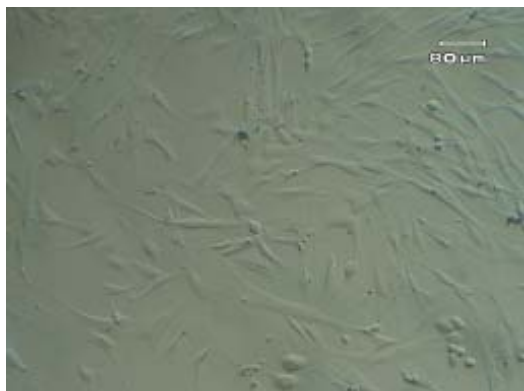


図1. 薬剤耐性細胞は紡錘形を呈していた。

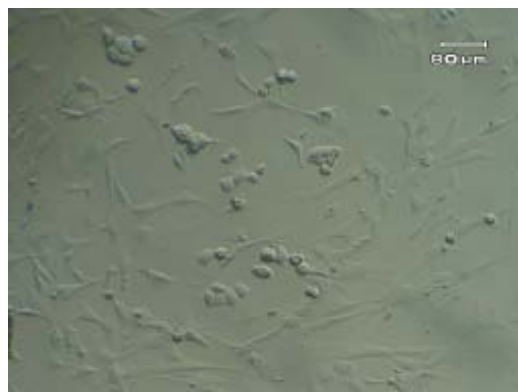


図2. 増殖した薬剤耐性細胞は類縁形に戻っていた。

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 1 件)

Tatsuishi Y, Hirota M, Kishi T, Fukui T, Mitsudo K, Aoki S, Matsui Y, Omura S, Taniguchi H, Tohnai I. Human salivary gland stem/progenitor cells remain dominant even after irradiation. International Journal of Molecular Medicine, In press. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

立石有紀、岸輝樹、廣田誠、青木伸二郎、松井義郎、藤内祝、谷口秀樹
ヒト唾液腺幹細胞における特性解析、第62回日本口腔科学会学術集会、平成20年4月19日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 誠
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：20347305

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤内 祝
横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50172127

岸 輝樹

横浜市立大学・医学研究科・特別研究員

研究者番号：70448679