

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008 年
 課題番号：19890143
 研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌幹細胞の同定とその表現形質の解析
 研究課題名（英文） Analyzing the characteristics and the isolation of cancer stem cell of oral squamous cell carcinoma
 研究代表者 尾上 富太郎 (ONOUE TOMITARO)
 徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：90452648

研究成果の概要：

口腔扁平上皮癌細胞株に含まれる癌幹細胞の同定と、その表現形質の解析を主たる研究目標とした。実験には造腫瘍能の異なる口腔扁平上皮癌細胞株を用い、これらの細胞に存在する癌幹細胞を、既知のマーカーである①CD133 陽性、②CD44 陽性、③CD44 陽性/CD24 陰性を指標に flow cytometry を用いて確認した。その結果、各種マーカーの割合は癌細胞株の造腫瘍能を反映しており、口腔扁平上皮癌細胞における癌幹細胞は CD44 陽性細胞群を指標に分離できる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,310,000	0	1,310,000
2008 年度	1,310,000	393,000	1,703,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,620,000	393,000	3,013,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：癌、幹細胞、歯学、扁平上皮

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の発症率は、全世界のヒト悪性新生物の中で約 2.65%であると累計されるが (Int J Cancer 94, 153-156, 2001)、そのほとんどは病理組織学的に扁平上皮

癌である。その治療法は、放射線治療、手術療法、化学療法に大別されるが、各々がこの 10 年間で目覚ましい進歩を遂げ、進展症例においても原発巣の制御が可能になった。

しかしながら、1990 年と 2000 年におけ

る口腔癌の治療成績(致死率/発症率×100)を算出すると、1990年で45.6%、2000年で47.9%と治療法の進歩にも関わらず、治療成績はこの10年間でほとんど向上していない(Int J Cancer 83: 18-29, 1999. Int J Cancer 80: 827-841, 1999)。この結果の一因として、口腔癌の特色である高頻度に生じる頸部リンパ節転移や、放射線治療や化学療法に対する癌細胞の耐性などが挙げられる。

近年、急性骨髄性白血病において、このような高転移能を有し、抗癌剤耐性を示す腫瘍細胞を分離したところ、それらの細胞集団が、白血病細胞への分化能力と自己複製能力を有しており、永久的に腫瘍細胞を供給することができる、幹細胞の表現形質を呈していることが明らかにされた(Nat Med 3:730-737, 1997)。その後、多くの固形癌においても、癌幹細胞の存在が明らかにされ(Nature 445:106-110, 2007, Nature 445:111-115, 2007, PNAS 104:973-978, 2007, Science 307:1904-1909, 2005, Int J Cancer 120:1444-1450, 2007)、現在では、すべての癌にはごく少数の癌幹細胞が存在し、それらの細胞が非常に遅い速度で増殖後、様々なタイプの細胞へと分化し、癌細胞集団の段階的構造を形成すると考えられるようになった。

この理論を臨床上の経験に当てはめると、時折経験する癌治療後の原発巣の晩期再発や、リンパ節、遠隔臓器への後発転移などは、治療によってあたかも消失したかのように見えた部位にこの癌幹細胞が残存し、それが数ヶ月あるいは数年の期間に緩徐に増殖してきたものであるとも考えられる。従って、癌細胞を根絶するためには、各種癌幹細胞を標的とした治療法の開発が癌治療成績の向上につながると推察し、今回の研究内容を開始するに至った。

2. 研究の目的

現在、固形癌における癌幹細胞の分離マーカーとして、糖蛋白であるCD133の発現や細胞接着分子であるCD44陽性/CD24陰性発現などの報告が散見されるが、CD133陽性細胞を癌幹細胞マーカーとして検討している報告が多い。そこで、本研究ではCD133を分離マーカーとすることにより、口腔癌細胞における癌幹細胞を同定し、同細胞における造腫瘍性、転移能、抗癌剤感受性を確認後、発現遺伝子解析を行い、治療標的分子を同定することを目的とした。なお、癌幹細胞マーカーとして、CD44やCD44陽性/CD24陰

性細胞群についても検討を行った。

3. 研究の方法

本研究は当研究室にて保有している口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, HSC-3, BHY, Hnt, IH, B88)に含まれる癌幹細胞の同定と、その表現形質の解析を主たる研究目標とした。

(1) CD133を標的とした口腔扁平上皮癌幹細胞の同定

phycoerythrin(PE)標識抗CD133抗体を用いたflow cytometryにより、各種口腔扁平上皮癌細胞中のCD133陽性細胞の存在を確認した。CD133陽性細胞の存在が確認できれば、Magnetic cell sorting (MACS) systemを利用する。本システムは直接標識超常磁性マイクロビーズで標識されたCD133に対するモノクローナル抗体を用いることで、特異性が高く、生物活性の高いCD133陽性細胞を分離することが可能である。

(2) RNA抽出と定量性RT-PCR法

① Total RNA抽出

TRIZOL® Reagentを用いてtotal RNAを抽出した。1 mlのTRIZOL®にて細胞を溶解したのち、遠心し上清を回収した。その上清を0.2 mlクロロホルムで処理した後、混在する蛋白の除去を行った。得られた上清に0.5 mlイソプロピルアルコールを加え遠心した後、沈渣70%エタノールにて洗浄、乾燥し、0.1%ジエチルピロカルボネート水溶液に溶解した。

② 定量性RT-PCR法

5 µgのtotal RNAに5 x first strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]を加え、65 °C、5分間加熱した後、氷中に5分間静置し、これに最終濃度がそれぞれ5 µMのランダムプライマー、10 µMのdithiothreitol、500 µMのdeoxyribonucleoside 5'-triphosphates、10 U/µlのMoloney Murine Leukemia Virus逆転写酵素を加え、42 °C、60分間反応させた後、95 °C、5分間加熱し反応を停止させcDNAを得た。得られたcDNAのうち2 µlを鋳型とし、CD133、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現をTaqman® gene expression assayとABI PRISM 7000 sequence detection systemを用いて検索した。

(3) CD44陽性、CD44陽性/CD24陰性を標的とした口腔扁平上皮癌幹細胞の同定

Fluorecein isotiocyanate (FITC)標識抗CD44抗体と、phycoerythrin(PE)標識抗CD24抗体を用いたflow cytometryにより、

(1)と同様に各種口腔扁平上皮癌細胞中のCD44陽性細胞およびCD44陽性/CD24陰性細胞の存在を確認した。上記細胞群の存在を確認した後に、各種細胞群の分離のためMACS systemを利用した。

(4)同定された細胞における培養条件の検索

以上の方法で分離したCD44陽性細胞とCD44陽性/CD24陰性細胞について、培養前と、培養後(1日後、3日後、7日後、14日後、28日後)におけるCD44、CD24の発現率を確認する。牛胎児血清(FCS)、100 µg/mlストレプトマイシン、100 U/mlペニシリン、0.25 µg/mlアンホテリシンBを含むダルベッコ改良イーグル最小必須培地を培養液として用い、空气中に5%の割合で炭酸ガスを含む培養器内で37℃にて培養を行った。培養液中に添加するFCSは、10%、5%、2.5%、1.25%の条件下で調整し検討した。

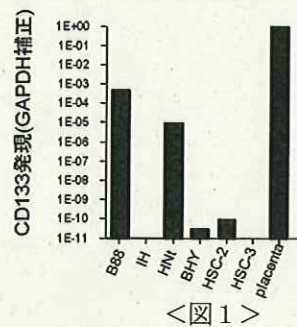
(5)同定された細胞における腫瘍形成能の検索

(3)で同定分離されたCD44陽性、CD44陽性/CD24陰性細胞及び陰性細胞群であるCD44陰性細胞を 5×10^2 、 5×10^3 、 5×10^4 の細胞濃度に分け、各々を当教室で確立された同所性移植法を用い(Int J Cancer, 70, 120-127, 1997)、ヌードマウス(生後8週齢)咬筋内に移植した。その後、移植部位における腫瘍形成能およびリンパ節転移の有無、遠隔転移の有無を病理組織学的に検索する。その際、採取した組織を用いて、確認の為に抗CD44抗体による免疫組織化学染色を用いてCD44発現細胞の有無と局在性を検索する。

4. 研究成果

本研究は当研究室にて保有している口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2、HSC-3、Hnt、IH、B88)に含まれる癌幹細胞の同定と、その表現形質の解析を主たる研究目標とした。実験には造腫瘍能の異なる口腔扁平上皮癌細胞株を用いた。これらの細胞に存在する癌幹細胞を、既知のマーカである①CD133陽性、②CD44陽性、③CD44陽性/CD24陰性を指標にflow cytometryを用いて確認し、癌幹細胞数の割合とヌードマウス背部皮下における造腫瘍能との関連性を検討した。CD133陽性細胞は、検討したすべての細胞でごく少数(0.1~3.9%)しか存在しておらず、造腫瘍能との関連性も認められなかった。Real-time PCRによるmRNA発現について検討したところ、CD133のmRNA発現も極わずかであった(図1)。

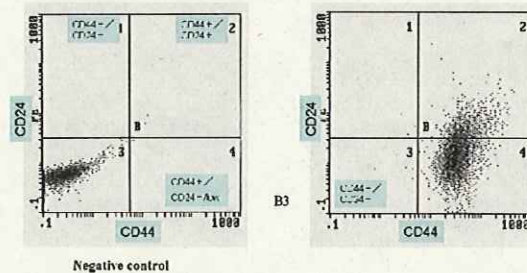
扁平上皮癌細胞株におけるCD133 mRNAの発現



<図1>

このことから分離培養や今後の解析が困難であることが予想されたため、乳癌、膵臓癌などの他の固形癌において癌幹細胞の細胞表面マーカーとしてすでに用いられているCD44陽性細胞(またはCD44陽性/CD24陰性細胞)の割合について検討したところ、ヌードマウス背部皮下で造腫瘍能の高いB88細胞では100% (82%)と高値を示した(図2)が、造腫瘍能が中等度であるHSC-2とHSC-3細胞ではそれぞれ37.3% (35.2%)と31.3% (23%)、造腫瘍能の低いHntとIH細胞ではそれぞれ13.1% (12%)と19% (10.8%)であり、癌細胞株の造腫瘍能を反映していた。

【CD44,CD24多色染色(B88細胞)】



<図2>

以上の結果より、我々が保有する口腔扁平上皮癌細胞株から癌幹細胞を分離培養し、表現形質を解析するには、CD44陽性/CD24陰性細胞群の使用が適切である可能性が示唆された(図3)。

各種癌細胞における各種表面マーカーの発現

	CD133 (%)	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ (%)	CD44 ⁺ (%)	腫瘍原生成
HSC2	3.58	35.2	37.3	有
HSC3	0.28	23	31.3	有
B88	0.1	82	99.9	有
IH	0.4	10.8	19	無
Hnt	3.9	12	13.8	無
CAL27	0.22	53.1	97.9	有
BHY	0.55	49.3	73.4	無

そこで、分離された細胞群についての培養条件を検討したが、癌幹細胞様のphenotypeを維持させる至適培養条件が得られなかったため、in vivo解析を行っている。つまり、各種癌細胞株からMACSにて分離されたCD44陽性/CD24陰性細胞群を、ヌードマウス（生後8週齢）咬筋内に移植し、移植部位における腫瘍形成能およびリンパ節転移能の有無、遠隔転移の有無を病理組織学的に解析中である。また、in vitro解析に必要である、培養条件についての検討も進めているところで、分離された細胞群における表現形質（細胞増殖能、腫瘍形成能、抗癌剤・放射線感受性）については、様々なデバイスのなかで、許容できる範囲内で解析を行っている。

5. 主な発表論文等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾上 富太郎 (ONOUE TOMITARO)
徳島大学・医学部・歯学部附属
病院 ・助教
研究者番号：90452648

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし