

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592013

研究課題名（和文） 頭頸部癌における癌幹細胞の免疫学的解析と治療への応用

研究課題名（英文） Immunological properties of cancer stem cells in squamous cell carcinoma of the head and neck

研究代表者

近松 一郎 (CHIKAMATSU KAZUAKI)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30301378

研究成果の概要（和文）：癌の中に、自己複製能と発現能力を有するユニークな集団（癌幹細胞）が少数存在することがわかってきた。頭頸部扁平上皮癌においても CD44+ の細胞が癌幹細胞様の形質をもつことが報告されている。今回の研究では、この CD44+ 細胞が免疫学的にどのような特徴を有するか検討した。CD44+ 細胞は CD44- 細胞に比べて、免疫応答をより抑制するような性質を有することがわかった。また、様々なアポトーシス誘導刺激に対しても抵抗性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Recent progress in the understanding of stem cell biology has greatly facilitated the identification and characterization of cancer stem cells (CSCs). In squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN), CD44+ population has been demonstrated to possess the properties of CSCs. In this study, I compared the immunological properties of CD44+ cancer stem-like cells with CD44- cells. CD44+ cells have higher malignant potential with numerous escape strategies from immune attack. Moreover, CD44+ cells were also resistant to various apoptosis-inducing stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
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：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：癌、免疫学

1. 研究開始当初の背景

癌は正常組織から遺伝子変異を繰り返し、悪性形質を獲得することにより発生すると言われている。癌原遺伝子や癌抑制遺伝子といった癌化及び癌の進行に関わる様々な遺伝子が同定されているが、このような遺伝子変異に伴う形質転換は癌の大部分に及ぶことなのかどうかはいまだ不明である。最近、自己複製能と発癌能力を有するユニークなポピュレーション、すなわち癌幹細胞 (Cancer

stem cell) の存在が注目されている。これまでに多くの癌腫において癌幹細胞が同定され、その細胞生物学的特性に関しての解析が進んできた。このような細胞の存在は癌化のメカニズムの解明や新しい治療法の開発を期待させる。これまでの報告から (1) 癌幹細胞が様々な癌細胞に存在すること、(2) これらの癌幹細胞はマウスにおける腫瘍形成能が高いこと、(3) 癌幹細胞が転移能を有すること、(4) 腫瘍の血管新生を促進すること

などがわかってきている。このように、癌幹細胞は、より悪性度の高い細胞であると言える。

一方、癌患者の体内では抗腫瘍免疫応答が起こっていることが明らかとなっている。in vitro において、自己癌を特異的に認識しこれを傷害する癌特異的 T 細胞が存在するが、実際に癌患者の体内では腫瘍の排除に有効に働いてはいない。近年、癌ワクチンの臨床試験が開始され末梢血中に投与された癌抗原に特異的な T 細胞の比率の増加が認められるが、実際に腫瘍縮小効果を認めるのは一部である。これはおそらく腫瘍局所の免疫抑制状態のために、体内で誘導された癌抗原特異的 T 細胞が、有効に働いてないことが考えられる。これまで、癌細胞は様々な免疫抑制機構によって抗腫瘍免疫応答から逃れていることがわかっている。癌幹細胞が、癌の発生・維持に重要な働きをしている悪性度の高い細胞であることより、免疫抑制における癌幹細胞の果たす役割は大きいことが予想される。それゆえ癌幹細胞による免疫抑制機序の解明はより効果的な新しい免疫療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌における、癌幹細胞の存在とその細胞学的特質を免疫学的側面から解析することにより、癌幹細胞が抗腫瘍免疫応答に及ぼす影響を調べ、その克服を目指す。

3. 研究の方法

以下の項目について解析を進めた。

(1) 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞の存在とその細胞学的特質の解析；頭頸部扁平上皮癌の細胞株を用いて、実験を進めた。Serum free medium にて培養することにより CD44+細胞のポピュレーションの増加を確認した。マグネットによるソーティングにて CD44+細胞が癌幹細胞様形質を有するか以下のことを調べた。

- ①他の癌幹細胞マーカーの発現
- ②増殖能
- ③遊走能、浸潤能
- ④抗がん剤感受性
- ⑤stemness gene の発現

(2) 癌幹細胞の免疫原性；HLA 分子及び APM 分子の発現

(3) 癌幹細胞のサイトカイン分泌能；IL-2, 4, 6, 8, 10, TNF- α , G-CSF, TGF- β の産生

(4) 癌幹細胞と T 細胞との関係；anti-CD3 /CD28 の刺激による T 細胞増殖能への抑制効果

(5) 癌幹細胞と免疫抑制細胞との関係；癌細胞との共培養による制御性 T 細胞や myeloid-derived suppressor cell の誘導

(6) 癌幹細胞とアポトーシス；TNF- α ,

anti-Fas, TRAIL, irradiation によるアポトーシス誘導刺激に対する感受性

4. 研究成果

(1) 下咽頭扁平上皮癌細胞株を無血清培地にて長期に培養すると CD44+細胞の比率が上昇した。この培養細胞から CD44+細胞をマグネットで純化したのちに CD44-細胞と比較した。CD44+細胞は、tumor sphere を形成し、CD44-細胞より増殖能、遊走能、浸潤能の亢進を認めた。また、CD44 以外に癌幹細胞のマーカーと言われている CD133, ABCG2 の発現も増強していた。さらに、カルボプラチン、ドセタキセル、パクリタキセル、5-FU、シスプラチンといった抗がん剤に対する感受性の低下を認めた。

Stem cell related genes 及び cancer drug resistance genes の発現を調べたところ、いくつかの遺伝子発現の亢進を認めた。この実験系を用いて、(2) 以下の実験を進めていった。

(2) 下咽頭扁平上皮癌細胞株を使った上記の実験系にて CD44+細胞と CD44-細胞の HLA 分子の発現を比較したところ、CD44+細胞では A2 分子の欠失が回復していたと同時に HLA class II 分子の発現を認めた。また、antigen processing machinery components のうち、TAP2 分子の発現低下を認めた (図 1)。これらの分子の変化は、癌幹細胞の免疫原性の違いを示唆するものかもしれない。

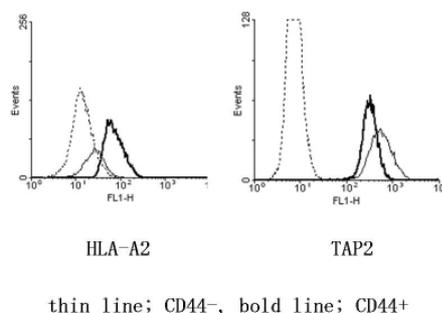


図 1.

(3) CD44+細胞は、CD44-細胞に比べて、IL-8, G-CSF, TNF- β のサイトカイン産生が亢進していた (表 1)。いずれも免疫抑制や腫瘍の増殖、血管新生、浸潤、転移に関わるサイトカインであり、癌幹細胞の高悪性度を示唆する結果となった。

Cytokine (pg/ml)	CD44+細胞	CD44-細胞
IL-8	3686.8	2604.1
G-CSF	1073.5	618.9
TGF- β	642.8	195.7

表 1.

(4) 免疫担当細胞である T 細胞の増殖能に対する抑制効果を調べたところ、CD44+細胞は、CD44-細胞に比べて有意に anti-CD3/CD28 刺激による T 細胞増殖能を抑制できた。

(5) 癌細胞と末梢血単核球との共培養によって、CD44+細胞は CD44-細胞に比べて有意に制御性 T 細胞 (CD4+CD25+FOXP3+) 及び myeloid-derived suppressor cell (Lin-HLA-DR-CD33+) の両者を誘導できた。一方、癌細胞存在下での mitogen-activated PBMC からのサイトカイン産生を調べてみると CD44+細胞との共培養では IFN- γ と IL-2 といった Th1 タイプのサイトカイン産生が有意に抑制され、IL-10 の産生は増強した (表 2)。このように CD44+細胞は、Th1 タイプの免疫応答を抑制し、制御性 T 細胞応答を誘導すると思われる。

PHA-activated PBMC からのサイトカイン産生

Cocultured with	IFN- γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
CD44+ cells	1003.8	603.4
CD44- cells	1205.1	533.2
No tumor cells	1269.3	506.1

表 2.

(6) (1) ~ (5) の実験系は下咽頭扁平上皮癌細胞 1 種類を用いて施行したが、この細胞株に特異的な可能性もあるので、口腔扁平上皮癌細胞株も使用して、アポトーシス抵抗性について検討した。口腔扁平上皮癌細胞株も無血清培地での培養で CD44+細胞比率の増加を認めた。下咽頭扁平上皮癌細胞株と口腔扁平上皮癌とも CD44+細胞は stemness genes である Nanog, Bmi-1, Notch, Oct-4 の遺伝子発現の増強を確認した。この 2 つの細胞株を用いて、様々なアポトーシス誘導刺激に対する感受性を比較検討した。アポトーシスの評価は MTT assay と flow cytometry によって行った。TNF- α , anti-Fas, TRAIL, irradiation (図 2) のいずれのアポトーシス誘導刺激に対して CD44+細胞は CD44-細胞に比べて抵抗性を示した。

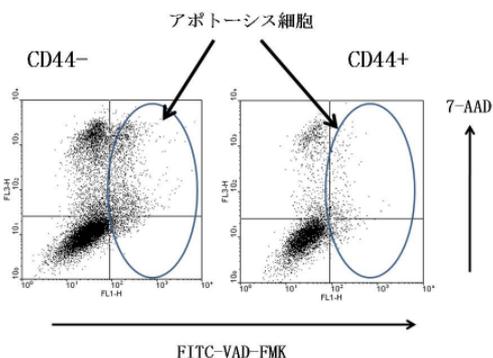


図 2.

この抵抗性のメカニズムを調べるために、細胞周期と anti-apoptosis related genes の発現を比較した。2つの細胞株とも CD44+細胞は CD44-細胞より、G2/M phase の細胞の比率が上昇していた。Check point protein である Chk1 や Chk2 などの活性化により G2 phase の細胞が増加することにより、DNA damage を効率よく修復できる可能性が示唆されたが、Chk1/Chk2 などについての詳細な検討が必要と思われる。

また、anti-apoptosis-related genes の発現を検討したところ、アポトーシスの制御分子である Bcl-2 と IAP family 分子の発現が亢進していた (表 3)。

CD44+細胞で発現亢進を認めた遺伝子

Anti-apoptosis genes	下咽頭癌細胞株	口腔癌細胞株
Bcl-2 family	BCL2	BCL2L1
	BCL2A1	
	BCL2L1	
	BNIP1	
IAP family	NAIP	BIRC3

表 3.

以上の結果から、頭頸部扁平上皮癌においても癌幹細胞が存在し、この細胞は様々なメカニズムによって治療抵抗性や免疫抑制能を獲得していることが分かった。癌幹細胞をターゲットとした治療戦略の開発が必要であると思われるが、そのためには更に詳細な癌幹細胞の特性の解析が必要と思われる。また、臨床検体における癌幹細胞の存在やその動態の把握が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

① Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi, G, Okamoto A, Moriyama M, Sakakura K, Masuyama K. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. Head Neck (査読有) (in press), 2011.

② Yamanishi T, Chikamatsu K, Takahashi G, Endo S, Masuyama K. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Japanese cedar pollinosis. Int Arch Allergy Immunol. (査読有) (in press), 2011.

③ Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells

in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* (査読有) 33:208-215, 2011.

④ Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* (査読有) 46:373-378, 2010.

⑤ Chikamatsu K, Sakakura K, Takahashi G, Okamoto A, Furuya N, Whiteside TL, DeLeo AB, Masuyama K. CD4+ T-cell responses to HLA-DP5-restricted wild-type sequence p53 peptides in patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* (査読有) 58:1441-1448, 2009.

⑥ Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* (査読有) 45:633-639, 2009.

⑦ Masuyama K, Chikamatsu K, Ikagawa S, Matsuoka T, Takahashi G, Yamamoto T, Endo S. Analysis of helper T cell responses to Cry j 1-derived peptides in patients with nasal allergy: candidate for peptide-based immunotherapy of Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int.* (査読有) 58:63-70, 2009.

⑧ Chikamatsu K, Sakakura K, Matsuoka T, Endo S, Takahashi G, Matsuzaki Z, Masuyama K. Analysis of T helper responses and FOXP3 gene expression in patients with Japanese cedar pollinosis. *Am J Rhinol.* (査読有) 22:582-588, 2008.

⑨ Sakakura K, Chikamatsu K, Toyoda M, Kaai M, Yasuoka Y, Furuya N. Congenital laryngeal anomalies presenting as chronic

stridor: A retrospective study of 55 patients. *Auris Nasus Larynx.* (査読有) 35:527-533, 2008.

⑩ Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, Furuya N, Whiteside TL, Masuyama K. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* (査読有) 44:870-877, 2008.

[学会発表] (計 19 件)

① 近松一朗, 坂倉浩一, 山本卓典, 森山元大, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌患者の免疫抑制に及ぼす myeloid-derived suppressor cell の役割. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (大分) 平成 23 年 2 月 10-12 日

② 坂倉浩一, 近松一朗. 頭頸部扁平上皮癌における癌抗原 CSPG4 の発現と抗原特異的免疫応答の誘導. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (大分) 平成 23 年 2 月 10-12 日

③ Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunosuppressive properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 4th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies. Seoul, Korea, June 15-19, 2010.

④ Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. 4th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies. Seoul, Korea, June 15-19, 2010.

⑤ 近松一朗, 石井裕貴, 宮田政則, 坂倉浩一, 古屋信彦, 増山敬祐. 口腔癌における

リンパ節転移メカニズムの検討：原発巣とセンチネルリンパ節におけるリンパ管増生の関係。第111回日本耳鼻咽喉科学会総会（仙台）平成22年5月20-22日

⑥ Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, Miyata M, Furuya N, Masuyama K. Expression of VEGF-C in oral squamous cell carcinoma correlates with sentinel lymph node lymphangiogenesis. American Head and Neck Society 2010 Annual Meeting. Las Vegas, USA. April 28-29, 2010.

⑦ Chikamatsu K, Ishii H, Okamoto A, Takahashi G, Sakakura K, Masuyama K. CD44+ cancer stem-like cells are responsible for treatment resistance in squamous cell carcinoma of the head and neck. American Head and Neck Society 2010 Annual Meeting. Las Vegas, USA. April 28-29, 2010.

⑧ Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 101st Annual Meeting American Association for Cancer Research. Washington DC, USA, April 17-21, 2010.

⑨ 近松一朗, 石井裕貴, 高橋吾郎, 坂倉浩一, 増山敬祐. Tumor microenvironmentにおけるCD44+ cancer stem cellの免疫抑制機構に果たす役割。第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(福井)平成22年2月18-20日

⑩ 石井裕貴, 近松一朗, 高橋吾郎, 坂倉浩一, 増山敬祐. CD44+ cancer stem cellは様々なアポトーシス誘導刺激に対して抵抗性を示す。第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(福井)平成22年2月18-20日

⑪ Chikamatsu K, Okamoto A, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K.

Immunological properties of CD44+ cancer stem cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 2nd World Congress of the International Academy of Oral Oncology. Toronto, Canada, July 8-11, 2009.

⑫ Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in squamous cell carcinoma of the head and neck. 2nd World Congress of the International Academy of Oral Oncology. Toronto, Canada, July 8-11, 2009.

⑬ 近松一朗, 坂倉浩一, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞の免疫抑制機構に果たす役割。第13回日本がん免疫学会(北九州)平成21年6月24-25日

⑭ 近松一朗, 高橋吾郎, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌における治療抵抗性細胞としての癌幹細胞の解析。第33回日本頭頸部癌学会(札幌)平成21年6月11-12日

⑮ Chikamatsu K, Okamoto A, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 100th Annual Meeting American Association for Cancer Research. Denver, USA, April 18-22, 2009.

⑯ 近松一朗, 岡本篤司, 初鹿恭介, 高橋吾郎, 増山敬祐. 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞の同定とその免疫学的解析。第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(千葉)平成21年2月13-14日

⑰ Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Masuyama K. Isolation and characterization of cancer stem cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. 7th International Conference on Head

and Neck Cancer. San Francisco, USA, July 19-23, 2008

⑱ Chikamatsu K, Sakakura K, Okamoto A, Whiteside TL, DeLeo AB, Masuyama K. Th1/Th2 CD4+ T helper responses against wild-type sequence p53 peptides in HLA-DP5 patients with head and neck cancer. 7th International Conference on Head and Neck Cancer. San Francisco, USA, July 19-23, 2008

⑲ Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, Whiteside TL, DeLeo AB, Masuyama K. CD4+ Th responses to HLA-DP5-restricted wild-type sequence p53 peptides in patients with head and neck cancer. 99th Annual Meeting American Association for Cancer Research. San Diego, USA, April 12-16, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近松 一朗 (CHIKAMATSU KAZUAKI)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30301378

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし