

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791534

研究課題名（和文）口腔癌における SP 細胞をターゲットとした分子標的治療に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research of molecular targeting therapy targeted to SP cells in oral cancer

研究代表者

柳本 惣市（YANAMOTO SOUICHI）

長崎大学・病院・講師

研究者番号：10315260

研究成果の概要（和文）：ヒト口腔癌細胞 SCC25 において SP 細胞を分離するために FACS を用いて 0.23% の SP 細胞を分離し、さらに無血清培地で培養し増殖させることができた。この SP 細胞分画は癌幹細胞マーカー（ABCG2, Oct-4 および EpCAM）が、非 SP 細胞と比較して明らかに高発現していた。さらにこの SP 細胞は、非 SP 細胞と比較して抗癌薬 5-FU に抵抗性を示し、増殖能およびコロニー形成能も有意に高かった。

研究成果の概要（英文）：To determine whether human oral cancer cell lines contain a SP cell fraction, we performed flow cytometry analysis and sorting, followed by culturing in serum-free medium (SFM) using the SCC25 tongue cancer cell line. SCC25 cells contained 0.23% SP cells. The fraction of SP cells was available to grow in SFM cultures. SP cells showed higher mRNA expression of stem cell markers (ABCG2, Oct-4 and EpCAM) as compared with non-SP cells. Moreover, SP cells demonstrated more drug resistance to 5-FU, as compared with non-SP cells. The clone formation efficiency of SP cells was significantly higher than non-SP cells at an equal cell number.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌，癌幹細胞，SP 細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞集団の中にあつて細胞個々に特性が異なる背景には、その中に存在するごく少数の癌幹細胞が関与しているとされてい

る。また癌幹細胞は他の腫瘍細胞と比較して、自己複製能，多分化能と腫瘍形成，維持能が高く抗癌薬および放射線に抵抗性を有しているとされている。さらに抗癌薬や放射線治

療によって腫瘍が消失しても、治療後に再発あるいは転移を起こす原因は、組織内に取り残された癌幹細胞と考えられている。これまでも肺癌、大腸癌、乳癌をはじめとする固形癌においても癌幹細胞の存在が確認されており、その解析により治療抵抗性や標的分子の特定の有用性が期待されている。したがってこの癌幹細胞を標的とした治療の有効性が期待されている。しかしながら口腔癌における癌幹細胞の報告はまだ少なく、浸潤や転移などとの関連性は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌細胞において癌幹細胞を含む side population (SP) 細胞分画を分離し、その性質を解析することを目的とする。SP細胞とは、DNA結合蛍光色素である Hoechst 33342 で細胞を染色し、フローサイトメトリーで解析すると、蛍光強度の低い領域に“鳥のくちばし”状に分画される細胞集団のことで、Hoechst 33342 が ABC トランスポーターにより細胞外に排出されることで生じる分画とされている。したがって、この分画には ABC トランスポーターを高発現している癌幹細胞が濃縮されていると考えられている。

3. 研究の方法

用いた口腔癌細胞は、ヒト舌癌細胞 SCC25 および SAS の舌癌細胞株で、蛍光色素 Hoechst 33342 で染色した後、ABC トランスポーター

阻害剤 Verapamil を用いて細胞外排出能を FACS で解析およびソーティングし、SP細胞と非 SP 細胞に分離した。さらに SP 細胞を無血清培地に増殖因子 bFGF および EGF を添加した幹細胞培養環境で培養し、Sphere 形成を促し、増殖させた。

SP 細胞が明瞭に分離され、解析可能であった SCC25 について、SP 細胞と非 SP 細胞の各細胞集団について、RNA を抽出し癌幹細胞マーカーとされる ABC トランスポーター G2, Oct-4 および Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) の mRNA 発現を RT-PCR で解析した。

SP 細胞の抗癌薬感受性を検討するため、5-FU を IC50 で処理し、その感受性について、MTT 法で評価した。あわせて増殖能、さらにはコロニー形成能を解析した。

4. 研究成果

(1) SP 解析

SCC25 および SAS の FACS による解析により、SP 細胞に特有の細胞集団が確認され、割合は SCC25 が 0.23% で、SAS が 0.14% であった(図 1)。さらに幹細胞培養環境下の無血清培地で Sphere 形成を促した(図 2)。

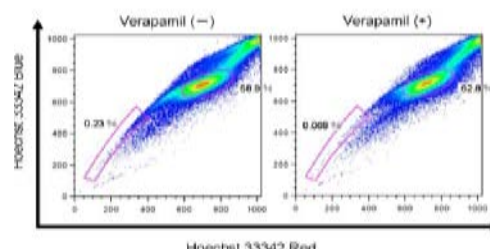


図 1

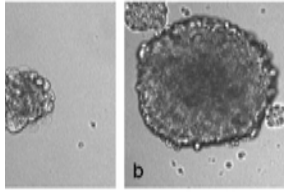


図 2 : a:培養 2 日目, b: 培養 7 日目

(2) SP 細胞における癌幹細胞マーカーの発現解析

解析可能であった SCC25 について、癌幹細胞マーカー ABCG2, Oct-4 および EpCAM の発現は、いずれも非 SP 細胞と比較して SP 細胞で有意に高いという結果が得られた (図 3)。

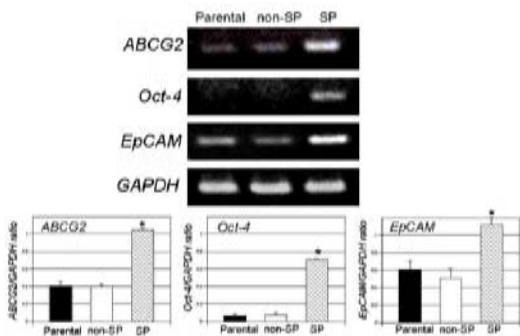


図 3

(3) 抗癌薬 5-FU 感受性の検討

IC50 での 5-FU 感受性は非 SP 細胞と比較して SP 細胞で明らかに抵抗性を示した (図 4)。

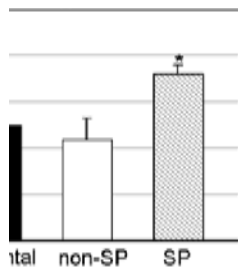


図 4

(4) SP 細胞の増殖能およびコロニー形成能の検討

増殖能に関しては、分離後 48 時間培養まで SP 細胞の方が有意に高い増殖能を示しましたが、72 時間以降は差がなかった (図 5 a)。コロニー形成能は、非 SP 細胞と比較し

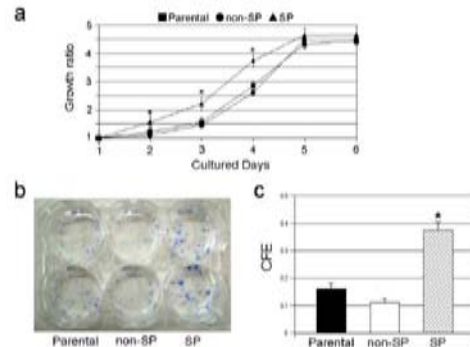


図 5

て SP 細胞で有意に高い値を示した (図 5 b, c)。

以上の結果から、分離された SP 細胞分画は、非 SP 細胞と比較して癌幹細胞マーカーの発現が有意に高く、5-FU に抵抗性を示し、高い増殖能およびコロニー形成能を示し、癌幹細胞の性質を有していた。

SP 細胞集団特有の分子を解析し、標的にすることは、効率的ながん治療に有用であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 柳本惣市, 川崎五郎, 山田慎一, 吉富泉, 水野明夫。

口腔癌における癌幹細胞様side population細胞の分離とその性質。

第27回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 宇都宮, 日本口腔腫瘍学会誌, 21, 342, 2009.

2. 柳本惣市, 川崎五郎, 山田慎一, 吉富泉, 水野明夫。

口腔癌における癌幹細胞様side population細胞の分離。

第54回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 札幌, 日本口腔外科学会誌, 55 (総会特別号), 92, 2009.

〔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

柳本 惣市 (YANAMOTO SOUICHI)
長崎大学・病院・講師
研究者番号 : 1 0 3 1 5 2 6 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :