

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390539

研究課題名（和文）口腔癌における癌幹細胞およびニッチ機構の同定とそれを標的とした診断・治療法の開発

研究課題名（英文） Identification of Cancer Stem Cell and its niche system in Oral Cancer

## 研究代表者

岡本 哲治（OKAMOTO TETSUJI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00169153

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌細胞において、CD133 陽性細胞が sphere 形成においては重要な機能を持っていること、また side population(SP)細胞群が腫瘍形成能や薬剤耐性能には重要な機能を果たしていることを明らかにし、また、sphere 形成には細胞由来の増殖因子である、EGF, sonic hedgehog, インターロイキン6等が関与していることも明らかにし、これら因子のシグナルが niche に重要であることも明らかにした。したがって、これら細胞が癌幹細胞としての性質を有している可能性が強く考えられた。これら細胞を標的とした治療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have revealed that CD133-positive cells in oral squamous cell carcinoma cells has an important role for the sphere formation and side population cells also function for tumorigenicity and drug-resistance activity. In addition, epidermal growth factor, sonic hedgehog, interleukin-6 derived from the OSCC work as niche for the maintenance and property of CD133 cells. These results strongly suggested the possibility that CD133 and/or Sp cells function as a cancer stem cell in oral squamous cell carcinomas. Thus, targeted therapy against the CD133 and/or Sp cell might be useful for the OSCC therapy.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：口腔外科学

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、無血清培地、CD133、Sp細胞、低酸素、sphere形成、造腫瘍性、

## 1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞研究の進展により、自己複製と限定された分化により腫瘍構成細胞を供給し続ける癌幹細胞の存在が明らかとなってきた。脳腫瘍や大腸癌においては、CD133陽性細胞（CD133+）が癌幹細胞の有力候補と考えられている。一方、口腔がんの大部分を占める口腔扁平上皮癌細胞ではいまだその候

補細胞は明らかにされていない。癌幹細胞を明らかにすることで、同細胞を標的とした新しい診断・治療法の開発につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

本研究においては、ヒト口腔扁平上皮癌（OSCC）の癌幹細胞を標的とした新しい診

断・治療法を開発することを目指して、OSCC細胞株由来CD133+およびside population (Sp) 細胞の癌幹細胞としての細胞・分子生物学的特性について検討を行った。

### 3. 研究の方法

OSCC 細胞株として当科で樹立した口腔癌細胞株(OSCC)株、KO、NA、UE、KA 細胞を用いた。これら細胞をそれぞれCD133抗体にて標識し、マグネティックビーズ付き抗体で処理後、auto MACS (miltenyi)を用いてCD133+を分離した。続いて、CD133+とCD133-の単層培養系での増殖能および浮遊培養系でのsphere形成能を、我々が開発した無血清培地を用いて検討した。また、各細胞株にGFP遺伝子を導入し、sphere形成細胞群におけるCD133+およびCD133-の局在とその経時的变化をコンフォーカル顕微鏡を用いて比較検討した。次に様々な増殖因子とその阻害剤、抗癌剤(doxorubicin : DXRおよび低酸素培養(1%酸素下)の、各親細胞株に対するsphere形成能およびCD133発現に及ぼす影響を、無血清浮遊培養法およびフローサイトメトリー(FACS)にてそれぞれ比較検討した。さらに、免疫不全マウス背部皮下での腫瘍形成能の比較検討を行った。

Sp細胞は、細胞をDNA結合色素hoechst33342にて処理後、FACSにて解析後、非染色性細胞群をSp細胞群、染色性細胞群をmain population (Mp)としてセルソーティングで分離した。続いて、Sp細胞とMp細胞の単層培養系における増殖能と浮遊培養系におけるsphere形成能、免疫不全マウス背部皮下での腫瘍形成能の比較検討を行った。また、SP細胞を低酸素下(1%)で培養することで、SP細胞群の濃縮を行った。さらに、Hif-1 $\alpha$ 遺伝子導入の、SP細胞群に及ぼす影響について検討した。SPとMPにおける遺伝子発現の差異をDNAマイクロアレイ法にて検討した。次いで、マイクロアレイにて5倍以上の発現差を認めた遺伝子についてpathway解析を行いpathwayの中核を担う候補因子のSp、Mp、CD133細胞の無血清単層および浮遊培養系での増殖能に及ぼす影響について検討を行った。

### 4. 研究成果

各細胞株において、CD133+の全細胞における細胞数の比率は約0.5%を示した。無血清単層培養系では、CD133+の増殖能はCD133-と比較し低下していた。一方、無血清浮遊培養系では、各親細胞株および各CD133+はsphereを形成したが、CD133-は形成能を失っていた。しかし培養開始時に、CD133-にCD133+を加えることでsphere形成能を獲得し、その大きさや数は、CD133+の割合が0.5%でほぼプラ

トーに達した。GFP発現細胞を用いて検討した結果、sphere形成細胞の大部分はCD133-由来であり、CD133+が、sphere形成過程でCD133-に変化した細胞や、CD133-がCD133+に変化した細胞が認められた。また、各sphere内には最低1個のCD133+が存在していた。さらにCD133-およびCD133+のsphere形成能に及ぼす種々の細胞増殖因子および増殖因子シグナル阻害剤、DXRおよび低酸素環境の影響を検討した結果、epidermal growth factor (EGF), sonic hedgehog (SHH), interleukin-6 (IL-6)はsphere 形成能を持たないCD133-細胞のsphere 形成を誘導し、またCD133+細胞はDXRに対してCD133-細胞と比較して耐性を示した。低酸素培養下では、CD133+細胞群の比率は著しく増加した。

Sp 細胞群の全細胞に占める割合は0.6~1.5%であった。無血清単層培養系では、Sp と Mp 間で増殖能に差は認めなかったが、無血清浮遊培養系においては、Mp に比べてSpは高いsphere 形成を示した。免疫不全マウス移植実験にて、Sp は、 $5.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^5$ の細胞数で腫瘍を形成したが、Mp は、いずれの細胞数およびさらに  $10^6$ の細胞数でも腫瘍は形成しなかった。Sp を継代するごとにFACS 解析にて再度 Sp 群のソーティングを繰り返し継代培養することで、全細胞の50%程度まで Sp の比率を濃縮する事が出来た。さらに、HIF-1 $\alpha$  遺伝子導入により Sp の増加を認めた。HIF-1 $\alpha$  の発現量に比例して薬剤耐性遺伝子群の発現上昇を認めた。Sp および Mp に対する DXR の影響を、単層培養系での増殖能および sphere 形成能を指標に検討すると Sp は Mp と比較して約5倍のDXR耐性を示した。マイクロアレイの結果、Sp においては血管新生関連遺伝子群、骨増殖遺伝子群、ケモカイン遺伝子群等が、Mp の5倍以上高発現していた。Pathway 解析の結果、pathway center として機能していると考えられた細胞増殖因子やケモカインは、親株の無血清単層細胞増殖能および sphere 形成能を促進した。

各細胞株をドキシソルピシン塩酸塩(DXR)存在下で継代培養を重ねる事により Sp 細胞群の比率は増加した。Sp 細胞群は各親株細胞および各 non-Sp 細胞群と比較して高い増殖能と sphere 形成能を示した。

以上の結果から、OSCC 由来 CD133 陽性細胞は、sphere 形成においては重要な機能を持っていること、また side population 細胞群が腫瘍形成能や薬剤耐性能には重要な機能を果たしていることを明らかにした。また、sphere 形成には細胞由来の増殖因子である、EGF, SHH, IL-6 等が関与していることが判明し、これら因子のシグナルが niche に重要であることも明らかにした。したがって、CD133 陽性細胞および Sp 細胞は、高い

sphere 形成能、造腫瘍形成能、低酸素耐性能および抗がん剤耐性能を示したことから、OSCC の癌幹細胞として機能している事が強く考えられ、これら細胞を標的とした診断・治療法の有用性が示唆された。

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 12 件)

1. Novel cytotoxic polyoxygenated steroids from an Okinawan Sponge, *Dysidea* sp. Sudhakar, V.S., Yukio Yoshioka, Tetsuji Okamoto, Makoto Ojika, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (5), 999-1002, 2012.
2. Cyclolobatriene, a Novel Prenylated Germacrene Diterpene, from the Soft Coral *Lobophytum pauciflorum*, Sudhakar V. S. Govindam, Yukio Yoshioka, Akihiko Kanamoto, Takeshi Fujiwara, Tetsuji Okamoto, Makoto Ojika, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Jan 査読有 15;20(2):687-92.2012.
3. ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/岡本哲治、日本口腔組織培養学会誌第 21 巻第 1 号 31-32 頁
4. Prospect of mouse embryonic stem cell-derived neural crest cells to in vitro assay for developmental toxicology, Mimura, S., Okamoto, T., Furue-Kusuda, M., et al., *Tissue Culture Research Communications*, Vol.30, No.2-4, 159-168, 2011
5. FGFR1 abrogates inhibitory effect of androgen receptor concurrent with induction of androgen-receptor variants in androgen receptor-negative prostate tumor epithelial cells., Kobayashi M, Okamoto, T., McKeehan WL. et al., *Prostate*, 査読有 Nov;71(15):1691-1700, 2011.
6. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells., Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. *Int J Dev Biol.* 55(2): 181-187: 2011. 査読有
7. Tissue culture: the unlimited potential., Sato GH, Sato JD, Okamoto T, McKeehan WL, Barnes DW., *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010 Jul;46(7):590-4. Epub 2010 May 29. 査読有
8. Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium. Furue MK, Na J, Okamoto T, Sato JD. et al., *In*

*Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010 Jul; 46(7):573-6.

9. Binding of APC and disheveled mediated Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A. *EMBO J.* 2010 Apr 7; 29(7): 1192-204.
10. B-Catenin-independent Wnt signaling regulates cell migration, polarity, and morphogenesis, Matsumoto, S., et al.: *Tissue Culture Research Communications* Vol.28. 117-128 (2009), 1
11. Zhumadilov K, et al.: "ESR dosimetry study on population of settlements nearby Ust-Kamenogorsk city, Kazakhstan" *Radiat Environ Biophys.* Nov:48(4). 419-425 (2009),
12. マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、山崎鍋島巧、木村直大、古江美保、岡本哲治、日本口腔組織培養学会誌第 20 巻第 1 号 39-40 頁

[学会発表] (計 17 件)

1. T.Okamoto, Long term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum free- and feeder-free growth factor defined culture. Annual Meeting of Association for Dental Science of the Republic of China, Taichung, Aug 27-29, 2011.
2. ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/岡本哲治、第 48 回日本口腔組織培養学会、日本口腔組織培養学会誌第 21 巻第 1 号 31-32 頁, 2011. 11. 19
3. 2011 In Vitro Biology Meeting, Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem(iPS) cells in serum-free and feeder-free defined medium. Sachiko Yamasaki, Miho Furue, J.DenrySato, Tetsuji Okamoto, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* Volume 47, Supplement1, 41-46, June 4-8, 2011, USA
4. 口腔扁平上皮癌における S P 細胞群の癌幹細胞としての分子・生物学的特性の検討 伊藤翼, 藤井良典, 石田康隆, Choon Yee Fan, 岡本哲治 第65回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会 (平成23年4月21日、東京都、タワーホール船堀)
5. 第 65 回 NP0 法人日本口腔科学会学術集会、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/古江美保/岡本哲治、日本口腔科学会雑誌、巻:61 号: 1 頁:119、H23. 4. 21-22

6. 無血清浮遊培養系を用いたCD133陽性口腔扁平上皮癌細胞のsphere形成能とその癌幹細胞としての細胞・分子生物学的特性の検討、藤井良典、伊藤翼、石田康隆、Choon Yee Fan、岡本哲治、第65回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会（平成23年4月21日、東京都、タワーホール船堀）
7. Effect of Medium Conditioned by hMSCs on Biological Property of CSCs from OSCC Cell Lines in Serum-free Culture、Choon Yee Fan、石田康隆、藤井良典、木村直大、岡本哲治、第65回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会（平成23年4月21日、東京都、タワーホール船堀）
8. マウス人工多能性幹(iPS)細胞を用いた頭部神経系の分化誘導、第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会、江戸川区、タワーホール船堀、鍋島巧 山崎佐知子 木村直大 楠田美保 岡本哲治、H23. 4. 21
9. 無血清培養系を用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株由来CD133陽性細胞群の細胞生物学的特性の検討、藤井良典、伊藤翼、石田康隆、松本真司、Choon Yee Fan、岡本哲治、日本口腔組織培養学会学術大会（平成22年11月13日、高知市、高知県教育会館高知城ホール4F多目的ホール）
10. 無血清培養系を用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株由来CD133陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性の検討、藤井良典、石田康隆、松本真司、Choon Yee Fan、岡本哲治、第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会（平成22年6月24日、札幌市、札幌プリンスホテル国際館パミール）
11. Effect of Medium Conditioned by hMSCs on growth, motility and sphere formation of SCC cell lines in Serum-free Culture、Choon Yee Fan、石田康隆、藤井良典、岡本哲治、第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会（平成22年6月24日、札幌市、札幌プリンスホテル国際館パミール）
12. Cellular and molecular characteristics of CD133-positive cells derived from oral squamous cell carcinoma cell line in serum-free defined culture] Fujii Y, Ishida Y, Matsumoto S, Choon Y, Okamoto, T. The International Workshop on BioDental Education and Research2010（平成22年2月12日、広島市、アステールプラザ広島）
13. マウス人工多能性幹細胞(iPS)細胞の未分化性と多分化能を維持した単層無血清培養系の確立、第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会、札幌市、札幌プリンスホテル国際館パミール、鍋島巧 木村直大 楠田美保 岡本哲治 H22. 6. 24
14. Neuroectodermal Differentiation from embryonic stem cells in Xenopus, Mouse, and Human in serum-free defined culture,

Okamoto, T. The 32nd Annual Scientific Meeting of Association for Dental Sciences of the Republic of China (ADS-ROC). (20091128). Kaohsiung, Taiwan

15. 無血清浮遊培養系を用いた口腔扁平上皮癌細胞のsphere形成とその癌幹細胞としての細胞・分子生物学的特性、藤井良典、石田康隆、松本真司、岡本哲治、第63回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会（平成21年4月17日、浜松市、アクトシティ浜松）
16. 第47回日本口腔組織培養学会、マウス人工多能性幹(iPS)細胞の単層無血清培養系の確立、高知、高知城ホール、山崎鍋島巧/木村直大/古江美保/岡本哲治、日本口腔組織培養学会誌第20巻第1号39-40頁 2010. 11. 13-16
17. ヒト人工多能性幹(iPS)細胞の単層無血清培養系の確立、嶋本顕/木村直大/田原栄俊/岡本哲治、第48回日本口腔組織培養学会、日本口腔組織培養学会誌第21巻第1号31-32頁 2011. 11. 19

〔図書〕(計1件)  
白砂兼光, 古郷幹彦, 他: 口腔外科学、医歯薬出版. 815 (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

1. 発明の名称: Defined Medium for Human ES Cell Culture、  
出願人: 岡本哲治、楠田美保、デンリー・サト、ピーター・アンドリュース、  
出願番号 特願2009-518958  
(P2009-518958)、  
国際出願番号: PCT/GB2007/002584

○取得状況(計4件)

1. 発明の名称: BASAL MEDIUM FOR ES CELL CULTURING、  
European Patent No 1,698,690 (Previous Application No 04808168.1)、  
Proprietor of the Patent: OKAMOTO, Tetsuji, ASASHIMA, Makoto, FURUE, Miho,  
ヨーロッパ特許取得日: 2010年4月28日
2. 発明の名称: ES細胞培養用基礎培地、  
出願人: 岡本哲治、古江美保、浅島誠、  
出願番号: 特願2005-516741、  
登録日: 2011年1月7日、  
登録番号: 特許第4657108号
3. 発明の名称: アシルスペルミジン誘導体及び抗腫瘍用剤、  
出願人: 岡本哲治、小鹿 一、  
出願番号: 特願2006-168926、  
登録日: 2011年2月25日、  
登録番号: 特許第4686722号
4. 発明の名称: Basal Medium for ES culturing、  
出願人: Okamoto, Tetsuji, Furue Miho,

Kusuda, Asashima Makoto,  
US Patent, No. 7,923,245,  
特許登録日:2011年4月12日、  
米国出願番号:10/584,371,  
国際出願番号:PCT/JP04/19818.

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 哲治 ( OKAMOTO TETSUJI )  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 00169153

### (2) 研究分担者

虎谷 茂昭 ( TORATANI SHIGEAKI )  
広島大学・病院・講師  
研究者番号: 90172220

#### 研究分担者

林堂 安貴 ( HAYASHIDOU YASUTAKA )  
広島大学・病院・講師  
研究者番号: 70243251

#### 研究分担者

新谷 智章 ( SHINTANI TOMOAKI )  
広島大学・病院・助教  
研究者番号: 90403518

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: