

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792028

研究課題名（和文）

口腔扁平上皮癌幹細胞の同定と癌血管新生機序の解明

研究課題名（英文）

Identification of stem cell in oral squamous cell carcinoma and clarification of the tumor angiogenesis mechanism.

研究代表者

森川 暁 (MORIKAWA SATORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00424169

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌においてCD44の発現が単なる癌幹細胞表面マーカーのみならず、機能的に重要であることを明らかにした。特にvariantの発現が転移に関わる癌幹細胞マーカーとして有用であることが示唆された。また、ヒトの口腔癌においても、マウスのリンパ節転移巣に見られたように周囲の環境に由来する分化刺激に対し抵抗性を持ち、静止期に留まり維持されるCD44陽性の癌細胞が存在することが、再発や治療抵抗性にも関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We clarified that the appearance of CD44 was not only a cancer stem cell surface marker but also functionally important in the oral squamous cell carcinoma. Especially, we thought to be useful as the cancer stem cell marker that the expression of variant is related to the metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口腔扁平上皮癌・CD44

1. 研究開始当初の背景

癌組織は実質、間質からなり、多様な細胞によって構成されているが、一部の癌組織のなかには正常組織幹細胞と同様に自己複製能と多分化能といった特徴を有する細胞の存在が明らかとなりつつあり、これは癌幹細胞

(Cancer stem cells; CSCs)と定義されている。

口腔癌を患者の体内から除去する方法として、外科手術・放射線療法・化学療法の3つがすでに確立している。摘出することで物理的に腫瘍塊をすべて除去するのが外科手術であるのに対し、放射線療法や化学療法は癌細胞

を直接確認して除去するのではなく、癌病変全体を（大部分が非癌幹細胞）電離放射線や細胞毒性を有する化学物質に作用させ、病巣の縮小効果や延命効果でその有効性を評価してきた。しかし、ここにCSCsの概念を導入すると問題が生じてくる。これまでの抗癌剤は主に細胞周期が活発に進行している細胞に対して最も有効であり、静止期にある細胞には効果を示さないとされている。近年、乳癌(Yu, F.; Cell, 131, 2007)、大腸癌(Ricci-Vitiani, L. et al.; Nature 445, 2007, O'Brien, C. A. et al.; Nature, 445, 2007, Todaro, M. et al.; Cell Stem Cell 1, 2007)、メラノーマ(Schatton, T. et al.; Nature, 451, 2008)などの固形癌でもCSCsが同定され、その存在が明らかとなってきた。さらに最新の知見では皮膚癌におけるCSCsも確認されたことから(Malanchi, I. et al., Nature, 452, 2008)、組織的に同様である口腔扁平上皮癌にもCSCsが存在するとが強く示唆される。

癌幹細胞は腫瘍実質・間質細胞・炎症細胞・血管内皮細胞・線維芽細胞などさまざまな細胞集団から構成されている癌組織のなかで、組織幹細胞様の動態、つまりG₀/G₁期の静止状態で存在していることが予想され、既存の抗癌剤でたとえ病巣が縮小しても癌幹細胞が選択的に生き残る確率は高く、条件さえ整えば再発してくることは想像に難しくない。このことから口腔扁平上皮癌での癌幹細胞をこれまで組織幹細胞分離法によって培われてきた技術を応用し、非常に純度の高い状態で口腔扁平上皮癌組織から直接分離することができるようになれば、これまで見過ごされてきたかもしれない非常にdormantかつrareな癌幹細胞を標的とした新たな化学療法の開発につながると考えた。

申請者はこれまでに、300種類もの細胞表面抗原をスクリーニングし、マウス骨髄由来間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)に対して特異的な抗原の組み合わせを見つけ出すことに成功した。さらに、これらを指標にフローサイトメトリーを用いて、MSCsを一切培養操作を経ずに、従来法に比べ約120,000倍の効率で直接精製する方法を世界に先駆けて確立した。

頭頸部領域においては唯一CD44⁺細胞が頭頸部扁平上皮癌におけるCSCsと報告されている(Prince M. E. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 2007)。このCD44⁺細胞の機能を解析し、さらにはCD44よりさらに純化したCSCsを同定することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究は、口腔癌原発巣に対して、癌幹細胞を分離・同定し、口腔扁平上皮癌発生や進展における癌幹細胞の役割を明らかにし、最終的には癌幹細胞をターゲットとした新たな分子標的による癌治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

まずは頭頸部領域にて唯一癌幹細胞マーカーと報告されているCD44の発現意義と機能の解析から行う。

(1) 口腔扁平上皮癌におけるCD44 variantの発現を細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19)にてフローサイトメトリーで解析した。

(2) ヒトの口腔扁平上皮癌検体を用いて、免疫染色をすることでCD44 variantの発現部位を解析した。

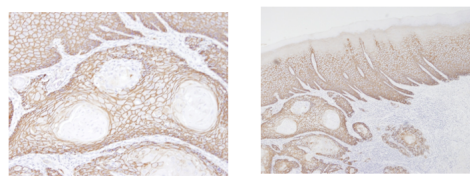
(3) CD44発現抑制株を作成し、Colony forming cell assayを行った。

(4) 口腔扁平上皮癌細胞(HSC-3, OSC-19)を免疫不全マウスに同所移植し、舌癌マウスを作成し、できた腫瘍の解析を行った。

4. 研究成果

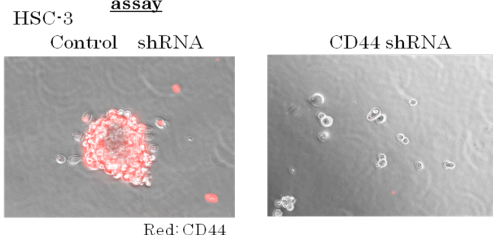
(1) どの細胞(HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19)においてもCD44 variantは高発現しており、CD44のhigh/lowで分けてくることはできなかった。

(2) ヒトの口腔扁平上皮癌(高分化型舌癌)の検体をCD44 v9抗体にて免疫染色を行った。

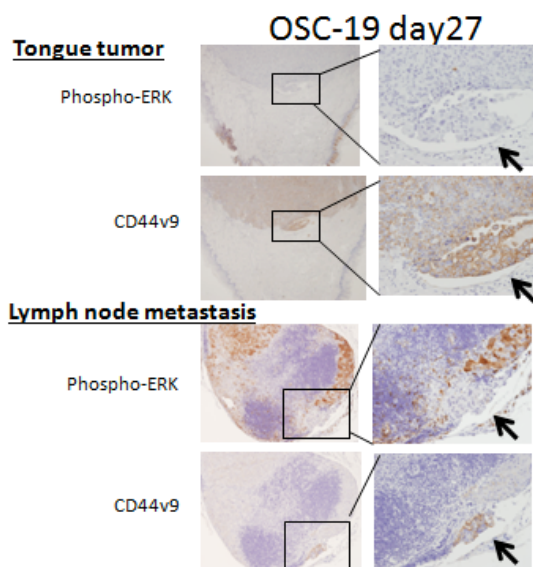


(3) CD44shによる発現抑制株を作成したところ、Colony forming cell assayにおいて有意にColony forming能力がCD44高発現に比べて低下したことから、CD44高発現細胞の幹細胞としての性質が示唆された。

Single cell spheroid formation assay



(4) ヒト口腔扁平上皮癌の細胞株HSC-2、HSC-3、HSC-4、OSC-19を免疫不全マウスの舌に同所移植を行い、頸部リンパ節転移モデルを確立した。また、舌原発巣とリンパ節転移巣において、免疫染色を行った結果、興味深いことにリンパ節転移巣においては原発巣とは異なるパターンを示すことが分かった。すなわち、口腔癌幹細胞マーカーであるCD44が陽性である細胞集団に加え、CD44陰性の細胞が出現することが認められた。このCD44陰性細胞は陽性細胞と比較して、リン酸化型ERKおよび増殖マーカーKi-67が強く検出され、MAPKシグナル活性および増殖性が高いことが分かった。つまり、転移巣におけるCD44陰性細胞において活発に増殖・分化が起きていることが考えられる。一方で、転移巣におけるCD44陽性細胞はリン酸化型ERKが認められず、増殖マーカーKi-67の発現も弱いことから、静止期にあり、幹細胞様の性質を有するのではないかと考えられた。このことから、ヒトの口腔癌においても、マウスのリンパ節転移巣に見られたように周囲の環境に由来する分化刺激に対し抵抗性を持ち、静止期に留まり維持されるCD44陽性の癌細胞が存在することが、再発や治療抵抗性にも関与していることが示唆された。



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4件)

(1) Lawrence Lein, Yasuo Nagai, Yo Mabuchi, Sadafumi Suzuki, Satoru Morikawa and Yumi Matsuzaki.: Inhibition of Abcg2 transporter on primitive hematopoietic stem cells by All-trans retinoic acid increases sensitivity to anthracycline. *Inflammation and Regeneration*, (査読あり) 30(2): 55-62, 2010.

(2) Satoru Morikawa, Yo Mabuchi, Yoshiaki Kubota, Yasuo Nagai, Kunimichi Niibe, Emi Hiratsu, Sadafumi Suzuki, Chikako Miyauchi-Hara, Narihito Nagoshi, Takehiko Sunabori, Shigeto Shimmura, Atsushi Miyawaki, Taneaki Nakagawa, Toshio Suda, Hideyuki Okano, and Yumi Matsuzaki.: Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, (査読あり) 206(11): 2483-2496, 2009.

(3) Satoru Morikawa Yo Mabuchi, Kunimichi Niibe, Sadafumi Suzuki, Narihito Nagoshi, Takehiko Sunabori, Shigeto Shimmura, Yasuo Nagai, Taneaki Nakagawa, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki.: Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*, (査読あり) 379(4): 1114-1119, 2009.

(4) Yo Mabuchi, Satoru Morikawa, Sadafumi Suzuki, Takehiko Sunabori, Hideyuki Okano and Yumi Matsuzaki.: Prospective

isolation and identification of human mesenchymal stem cells by flow cytometry. *Inflammation and Regeneration*, (査読あり) 29(1): 73-78, 2009.

[学会発表] (計5件)

(1) 森川暁、新部邦透、深谷千絵、穂坂康朗、中川種昭: ヒト間葉系幹細胞の予期的分離とClonal解析. 第53回春季日本歯周病学会学術大会, 盛岡, 2010, 5/14, 15 (口頭)

(2) Yo Mabuchi, Satoru Morikawa, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki:
Flow cytometric isolation and clonal identification of mesenchymal stem cells in human bone marrow. *International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 7th ANNUAL MEETING*
July 8-11, 2009, Barcelona (ポスター)

(3) 森川暁、深谷千絵、穂坂康朗、中川種昭: 間葉系幹細胞の一部は神経堤から発生する. 第52回日本歯周病学会春季学術大会, 岡山, 2009, 5/15, 16 (口頭)

(4) 馬淵洋、森川暁、岡野栄之、松崎有未:
Isolation and Identification of Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow. 第7回幹細胞シンポジウム, 東京, 2009, 5/15, 16. (ポスター)

(5) S. MORIKAWA, C. FUKAYA, and T. NAKAGAWA:
Prospective Isolation of Mesenchymal Stem Cells. 87th General Session and Exhibition of the IADR (International Association for Dental Research), Miami, Florida, USA, April 1-4, 2009. (ポスター)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 暁 (MORIKAWA SATORU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 00424169

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし