

## 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25年 6月 10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591225

研究課題名（和文） 皮膚有棘細胞癌における癌幹細胞の同定と解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of cancer stem cells in skin squamous cell carcinoma.

研究代表者

村尾 和俊 (MURAO KAZUTOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：40363171

研究成果の概要（和文）： 幹細胞候補となるマーカーを用い、腫瘍におけるその発現を検討した。CD133、smad4 を候補と考えまず免疫染色で検討したところ有棘細胞癌(SCC)の数%に陽性細胞が認められた。SCCの cell line を用いたフローサイトメトリーでの検討で SCCには side population cell が数%存在することが分かった。これらの細胞の機能解析のため担癌マウスモデルを作成した。しかし、ヒト皮膚癌細胞はマウスへの生着が悪く in vivo 解析は難しかった。

研究成果の概要（英文）： To investigate cancer stem cell in human SCC, I first examined the expression of CD133 and smad4 which were considered to be marked on stem cells. Less than 5% of cells were positive for these protein. Next, we tried to perform SP cell isolated from human SCC into nude mouse to evaluate if they had capacity to generate another tumor. However, human SCC cells were rarely grown on immune compromised mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学、癌幹細胞

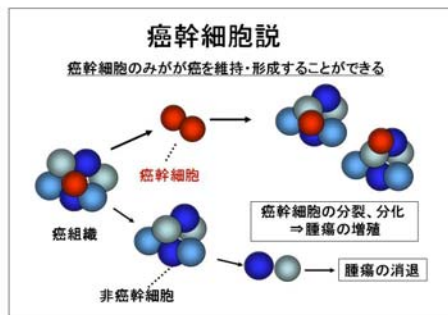
### 1. 研究開始当初の背景

有棘細胞癌は、一般の癌と同様に、正常な細胞に染色体や遺伝子の異常により、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が蓄積して発生すると考えられる。私はこれまでに SCC における多段階発癌過程の解明をめざして研究を行ってきた。そして、SCC においては、多数の症例で p53/pRb 経路もしくは p16<sup>INK4a</sup> 経路に異常があること (Kubo Y, Murao K et al. J Med Invest 2002, Murao K et al. J Invest Dermatol 2005, Br J Dermatol 2006)、子宮頸癌の原因となる human papillomavirus(HPV)が一部の症例では皮膚癌発症に関与し、p16<sup>INK4a</sup> の異常発現を伴っていること、などを報告してきた (Murao K et al. Br J Dermatol 2005, J Am

Acad Dermatol 2005, Dermatol Surg 2005)。

これまでの多くの癌研究は、どのような遺伝子異常が発癌に結び付くのか、に重点が置かれてきた。しかし、近年、癌幹細胞システムという概念が提唱され注目を浴びている。これは、癌細胞の中には、癌幹細胞(cancer stem cell)と呼ばれるごく少数の細胞があり、この癌幹細胞が限られた分化と自己複製を繰り返しながら、癌構成細胞を供給し続けるとするものである。癌幹細胞以外の癌を構成する大部分の細胞は、自己複製能はなく、最終的に増殖能を失い、癌の維持すらできない、と考えられる（下図参照）。現在、多くの癌は化学療法、放射療法により縮小させることはできても根治することは難しい。この理由として、癌幹細胞の存在が大きい。つまり、

通常 G<sub>0</sub> 期にあり、分裂を中止している癌幹



細胞は、盛んに分裂している細胞を標的とした既存のこれらの治療法には抵抗性を示すと考えられるからである。これらのことから、癌を完全に治療するには、癌を構成する大多数の癌細胞を標的にするのではなく、この癌幹細胞を標的にしなければならない。血液系の腫瘍で最初に見つかった癌幹細胞はその後多くの固形癌からも同定され、研究がすすんでいる。しかし、皮膚有棘細胞癌の癌幹細胞はまだ同定されていない。

私は米国コロラド大学で、マウスモデルを用いた研究で、皮膚 SCC の癌幹細胞の同定を試み、SP 細胞及び CD34 陽性細胞が、マウス SCC における癌幹細胞であることを世界に先駆けて報告した (Murao K et al. J Invest Dermatol 2008)。この研究では、SCC の癌幹細胞は正常表皮の幹細胞から発生する、との仮説に基づき行った。CD34 はマウスの毛包バルジ領域の幹細胞マーカーとして知られており、SP 細胞は表皮を含め、多くの組織で幹細胞を含んだ未分化な細胞集団であることが分かっている。

これらのマウスモデルで取ったアプローチを応用し、人の SCC における癌幹細胞同定に用いることができるのではないかと考えた。実際、ヒトの SCC の cell line である SCC-13 が SP 細胞を有していることを既に確認していた。急速に進展している癌幹細胞の研究であるが、いかなる皮膚腫瘍においても幹細胞研究は十分に進んでいなかった。皮膚癌における幹細胞を同定・分析することは皮膚癌治療への新たな道を開くと考えられた。

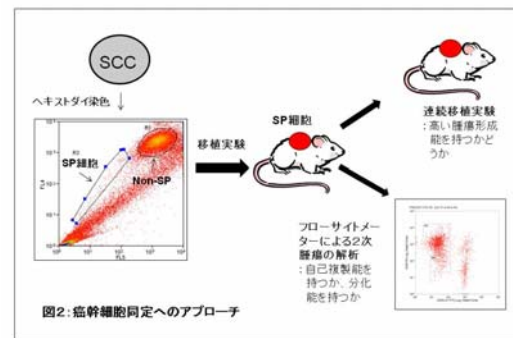
## 2. 研究の目的

前述したように、癌発症のメカニズムの解明と新たな治療法開拓には、癌幹細胞の分子機構を明らかにすることが大切である。しかし、皮膚癌ではほとんど研究がされていない。そこで本研究では SCC をはじめとする皮膚癌における癌幹細胞を同定し、癌幹細胞と非癌幹細胞との違いを分子レベルで明らかにすることを目的とした。そしてこの結果が新

規の、より効率の良い、そして副作用のない治療法開発につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

大きく分けて癌幹細胞群の同定、そして何が (分子的に) 細胞を癌細胞としているのかの解明、に分ける。まず細胞を様々な抗体などでマーキングし、フローサイトメトリーで分析、さらにセルソーターを用いて、様々な細胞群を SCC から採取する。これらの細胞を連続移植実験などを行うことにより、癌幹細胞としての性質を持つかどうかを検討する (下図参照)。すなわち自己複製能、多分



化能、長期分裂能を持つかどうかを *in vivo* で検討する。これらの連続移植実験により癌幹細胞群が同定できれば、次の段階として、癌幹細胞と非癌幹細胞の分子レベルでの違いをマイクロアレイを用いて解析する。癌幹細胞特異的な分子が同定できれば、siRNA などの手法を用いて、その分子をノックダウンし、腫瘍形成能が失われるかどうか、検討したい。

サンプルは徳島大学皮膚科での手術症例から得る。腫瘍細胞を、collagenase, trypsin で一つ一つの細胞に分解し (single cell)、これを①ヘキストダイ、②CD133 で染色する。フローサイトメトリーで検出し SP, non-SP, CD133+, CD133-細胞それぞれを sorting する。そして、それぞれの細胞で、spheroid formation assay を行う。方法は、3T3 fibroblasts、sphere forming media を用いて細胞を培養し spheroid colony の形成能を検討する。

*In vitro* での解析により癌幹細胞群と非癌幹細胞群とを同定できれば、マウスを用いた *in vivo* の実験でその結果をさらに確認する。これには nude mouse などの immunocompromised mice を用いる。移植方法としてはシリコンチャンバーを用いた *in vivo* grafting tumor formation assay を用い、細胞の腫瘍形成能を評価する (腫瘍形成能の評価)。この grafting assay は間質細胞である線維芽細胞を混合することにより、より SCC 形成の環境を再現するものであり、

皮下注入による移植に比べより正確で効率

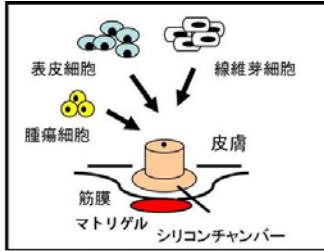


図1 Grafting assayの外用(上図)、Graftins assayで形成された腫瘍(下図:ただしこれはマウスのSCC)

を有するかどうかを確認する(例えば、SP細胞はSP細胞自身と non-SP細胞をも作り出しているかどうか)。そして、マウスへの連続移植実験を行い、強い腫瘍形成能を有するかどうかを検討する(半永久的に分裂する能力があるかどうかの検討)。

*In vitro, in vivo* 実験で癌幹細胞を同定できれば、これらの分子機構を解明していく。これにはまず、マイクロアレイを用いて行う。

上記の実験で得られた癌幹細胞群と非癌幹細胞群とからセルソーターを用いて細胞を採取する。この細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイを行い、癌幹細胞に特徴的な分子の同定を行う。遺伝子発現の確認は real-time PCR 法で行う。特定の分子が同定できれば、この分子をノックダウンさせる siRNA を設計し、腫瘍形成能が落ちるかどうかを spheroid assay さらに、移植実験で確認する。

#### 4. 研究成果

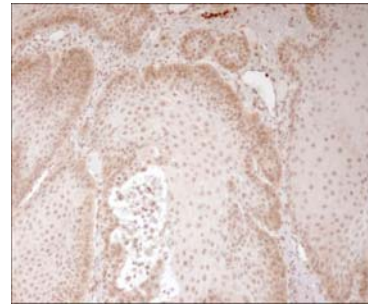
皮膚有棘細胞癌をはじめとする各種皮膚癌における幹細胞同定を試みた。幹細胞のマーカーを *in vivo* 実験で確認する前実験として既存の手術サンプル標本より FANCD2, CD133, SPF1, smad4, 14-3-3 sigma の染色を行い解析した。FANCD2, CD133 陽性細胞はほとんど認められず、幹細胞マーカーとしては不相当と考えられた。SPF1, smad4, 14-3-3 sigma の発現は、幹細胞マーカーとしては不相当であったが、症例により明らかに発現の差が認められた。そこで細胞を使った実験系にはまず CD133, samd4, ついて検討した。まず、実際の腫瘍の手術サンプルを用いて CD133, samd4 の発現について、免

疫組織学的に検討した。手術サンプルは皮膚有棘細胞癌以外の皮膚癌からも得た。皮膚有棘細胞癌、およびその *in situ* 病変である日光角化症、Bowen 病では、一部の症例で、

*In vivo* grafting tumor formation assay で、

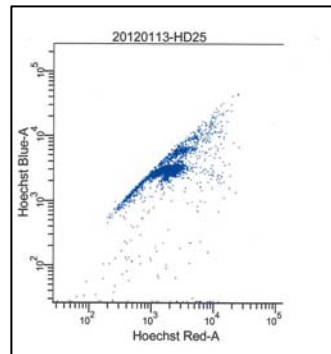
腫瘍が得られたら、フローサイトメトリーでこれらの二次性腫瘍をさらに解析し、移植した腫瘍細胞が自己複製能、分化能

を有するかどうかを確認する(例えば、SP細胞はSP細胞自身と non-SP細胞をも作り出しているかどうか)。そして、マウスへの連続移植実験を行い、強い腫瘍形成能を有するかどうかを検討する(半永久的に分裂する能力があるかどうかの検討)。



CD133 の発現が数%未満で認められた(上図)。しかしフローサイトメトリーを用いた解析では染色条件の設定が難しく検出できなかった。

マウスの SCC cell-line では SP 細胞が存在していた(下図)。このためヒトサンプルでも同定を試みた。ヒト SCC のサンプルを手術時に採取し nude mouse に移植して担癌モデルの作成を試みたが、生着が悪くうまくいかなかった。このため、まず細胞培養を行い、expand しマトリゲルを用いた移植を行うことにした。



また隆起性皮膚線維肉腫からのサンプルは培養系でよく expand できたため、SP 細胞の検出を試みた。

また、悪性黒色腫の cell line である SK-

MEL を用いてモデルマウスを作製し(上図)、SP 細胞の同定・解析を始めたところである。

しかし、cell line とは異なり、実際の人細胞のマウスへの移植は非常に難しく、様々な工夫をしたがほとんど、機能解析には至らなかった。これはおそらく免疫抑制マウスと言えども異種間移植の問題があるものと思われる。これを克服するには移植床により



donor に近い環境を作ること、つまり humanized model を作成する必要があるものと思われる。今回の研究で得た新たな課題である。

#### 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 2 件)

① Murao K, Miyajima O, Oshima M, Kubo Y. Verrucous skin lesions on the feet in diabetic neuropathy successfully treated with topical maxacalcitol. European Journal of Dermatology 22:274-275, 2012, 査読有.

② Murao K, Fukumoto D, Kubo Y. Scalp Bowen's disease associated with human papillomavirus type 16. European Journal of Dermatology 21: 1005-1006, 2011, 査読有.

[学会発表] (計 1 件)

① Murao K, Kubo Y. Human papillomavirus infection in Bowen disease. The 37<sup>th</sup> annual meeting of Japanese society for investigative dermatology. 2012年12月7日～12月9日. ロワジールホテル那覇 (沖縄県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村尾 和俊 (MURAO KAZUTOSHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：40363171

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：