

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390456

研究課題名(和文)口腔癌幹細胞ニッチにおけるサイトカインネットワークの解明とその診断・治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of cytokine network in oral squamous cell carcinoma stem cell niche, and its application to diagnosis/treatment

研究代表者

岡本 哲治 (OKAMOTO, TETSUJI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00169153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)の癌幹細胞を分離・同定し、そのニッチ機構を明らかにし、癌化の解明とともに癌幹細胞を標的とした新しい癌の診断・治療法の確立を目指した。無血清培養系でOSCC株よりCD133(+), Sp、ES/iPSCsに特異的に発現するrBC2LCNの幹細胞マーカーとしての有用性を検討した。CD133(+), rBC2LCN(+), Spは0.5%、2%、1%の陽性率で、高いsphere形成能を有していた。EGF, sonic hedgehogは sphere形成能を誘導し、Spは抗がん剤耐性及び高い造腫瘍性を示した。rBC2LCNは新規癌幹細胞マーカーとして有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a new diagnosis and treatment that target cancer stem cells along with the elucidation of the carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). For that, the cancer stem cells of OSCC, will be separated, and identified in serum-free culture. Then the niche mechanism of OSCC will be clarified. We examined the usefulness of CD133(+), Sp and rBC2LCN that is specifically expressed in ES / iPSCs, as a stem cell marker of OSCC. As a result, positive cell ratio of CD133 (+), rBC2LCN (+), and Sp is 0.5%, 2%, and 1%, respectively. These cells exhibited a high sphere forming ability in suspension culture. EGF and sonic hedgehog induces sphere forming ability. Sp showed resistance to anti-cancer drug and high tumorigenicity. rBC2LCN I was considered to be useful as a novel OSCC stem cell marker.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌細胞 癌幹細胞 CD133 CD44 side population rBC2LCN 無血清培養 sphere形成

## 1. 研究開始当初の背景

近年、色々な検討から、癌組織中には未分化な細胞や分化した細胞、さらには分裂速度が異なる細胞など多種類の細胞が混在していることが知られており、放射線治療や化学療法などは分裂速度の早い細胞を標的としているため、分裂速度が遅い癌細胞には治療効果が低いことが推察され、再発や転移にはこれら治療に抵抗性の癌細胞が関与していると考えられてきた。このような疑問を解決する糸口として、癌幹細胞の存在が考えられている。近年、幹細胞研究の著しい進展により、胚性幹細胞、造血幹細胞、組織幹細胞をはじめとする幹細胞の性状が明らかにされはじめ、幹細胞を用いた再生医療・細胞治療が期待されているが、造血器系腫瘍において、癌幹細胞が発見されて以来、様々な固形腫瘍においても幹細胞が存在し、腫瘍の発生・進展・維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌の癌幹細胞を分離・同定し、さらにその自己複製能と分化能を制御しているニッチ(niche)機構を明らかにする。さらに、そのニッチ機能維持に必要なサイトカインネットワーク分子・シグナル群の同定を通して、その細胞・分子生物学的特徴を明らかにし、癌化のメカニズムの解明とともに癌幹細胞を標的とした新しい癌の診断・治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

【平成24年度】口腔扁平上皮癌幹細胞の分離・同定：我々が開発したヒトES細胞培養用無血清培地(hESF培地)にインスリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-アミノエタノール、セレン酸、オレイン酸の6因子(6F)を加えたhESF6F培地で口腔扁平上皮癌細胞株(HO-1-u-1(UE)、HO-1-n-1(NA)、KA、KO、NI)の継代培養を行った後、CD133、CD44陽性細胞を磁気ビーズ法にて分離した。さらに、各細胞をHoechst33342色素で処理し、UVレーザー照射により励起される450nmと675nmの波長の蛍光発現の低いSP細胞群をセル・ソーターにて分取した。これら細胞群の無血清浮遊培養系での各陽性細胞と陰性細胞間で増殖能sphere形成能、ヌードマウスでの造腫瘍性を検討した。さらに細胞増殖能およびsphere形成能に及ぼす種々の細胞増殖因子(FGF-1、FGF-2、EGF、TGF-beta1、TGF-beta2、sonic hedgehog、wnt、activin A、IL-6、PDGF、BMP-4、LIF、GABA、BDNF、Nodal、IGF-1、)、細胞外マトリックス蛋白(接着因子)(I型、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリ-Lリジン)脂質(LDL、HDL、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸)、アミノ酸(チロシン、イソロイシン)、ビルビン酸などの影響について検討した。

【平成25年度】ヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)における癌幹細胞候補として、SP(side population)細胞を標的とした新しい診断・治療法を開発する事を目指した。幹細胞は

非幹細胞と比較しABCトランスポーターが高発現されているためHoechst33342で細胞を染色すると同色素が排出されるため、色素で染色されにくくなる性質を利用したもので、フローサイトメトリー解析にて、hoechst33342処理した細胞をUV光で励起すると大部分の細胞は蛍光強度の高い細胞集団MP(main population)として同定されるが、薬剤排出能の高い細胞(SP)は蛍光強度の低い細胞群として分離される。OSCCよりSP細胞を分離し、癌幹細胞としての機能および分子標的としての可能性を検討した。

【平成26年度】体細胞では全く発現せず、ES/iPSCsなどの未分化細胞に共通して発現する糖鎖構造を認識するレクチンrBC2LCNのOSCC幹細胞マーカーとしての有用性について検討した。【材料および方法】OSCC細胞株として本研究室で樹立したHo-1-N-1、Ho-1-u-1を用い、各マーカー陽性細胞を用いた検討は、DMEM/F12培地(DF)にinsulin、transferrin、などの6因子を加えたDF6F無血清培地を用いた。各マーカー陽性細胞率はflow cytometry法を用いて検討し、各陽性/陰性細胞はcell sortingあるいはmagnetic cell sortingで分離しmonolayerでの増殖能及びsphere形成能を評価した。

## 4. 研究成果

【平成24年度】CD133細胞は全細胞中0.5%しか存在しないこと、さらに単層培養系ではCD133陽性細胞の増殖は陰性細胞と比較して低下していたが、浮遊培養系ではCD133陽性細胞もみがsphere形成能を持つことが明らかとなった。さらに、sphere形成能を持たないCD133陰性細胞に対してEGFあるいはsonic hedgehog(SHH)を加えることでsphere形成能を獲得した。一方、CD44陽性細胞は全細胞中50%存在することが判明したため、口腔がん細胞においては、CD44陽性細胞は幹細胞としての性質は持たないことが考えられた。さらに、Sp細胞は抗がん剤に耐性を示し、低酸素培養下でその比率は増加した。また、Sp細胞および非Sp細胞のヌードマウスにおける造腫瘍性を検討した結果、Sp細胞のみが造腫瘍性を示した。以上、口腔がん細胞においては、CD133陽性さいぼうおよびSp細胞が幹細胞としての特性を有していることを明らかにすることが出来た。このように、初年度において口腔扁平上皮癌幹細胞の特徴を細胞生物学的および分子生物学的に解析し、癌幹細胞群の特性を維持するニッチにおいて重要な働きをしているサイトカイン群を明らかにすることが出来た。

【平成25年度】1. OSCC細胞株由来SP細胞の全細胞における比率はわずか1%程度であった。2. SP細胞の単層無血清培養系での細胞増殖能はMP細胞のそれと比較し低下していた。3. SP細胞はMP細胞と比較し単層および浮遊培養系のどちらにおいても抗癌剤(塩酸ドキソルビシンDXR)耐性を示した。4. SP細胞を1%低酸素下にて継代培養すると、SP細胞は高い比率で維持できた。5. HIF-1遺伝子導入SP細胞では通常酸素下でもSP細胞の維持が可能であった。6. ヌードマウス背部皮下移植による

腫瘍形成能の比較により、MP細胞は腫瘍形成能を示さなかったが、SP細胞は高い腫瘍形成能を示した。7. CD133遺伝子の発現抑制により、SP細胞の低酸素応答能は低下し、低酸素下においてもSP細胞は維持されなくなった。8. DNAマイクロアレイ解析にて、SP細胞とMP細胞の比較を行うと、薬剤耐性遺伝子などの遺伝子発現の差異を認めるとともに、IL-6やIL-8について大きな差を認めた。

【平成26年度】CD133(+), rBC2LCN陽性、Sp細胞の陽性率はいずれの細胞株でも、0.5%、2%、1%程度の存在率を示した。これら陽性細胞は早期に大きなサイズのsphereを形成した。またCD133(+), SP細胞とrBC2LCN陽性細胞間に完全なオーバーラップは認めなかった。rBC2LCNは、これまで明らかにした口腔扁平上皮癌細胞の癌幹細胞マーカーであるCD133陽性細胞およびSp細胞とは異なる機序で機能する新規癌幹細胞マーカーとして有用である可能性が考えられた。

#### 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15件)

- Shintani T, Hayashido Y, Mukasa H, Akagi E, Hoshino M, Ishida Y, Hamana T, Okamoto K, Kanda T, Koizumi K, Yoshioka Y, Tani R, Toratani S, Okamoto T. Comparison of the prognosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw caused by oral and intravenous bisphosphonates. *Int J Oral Maxillofac Surg*. No.2: 125- 133, 2015. doi: 10.1016/j.ijom.2015.03.013. 査読有
- Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, Tahara H, Okamoto T. Generation of Human induced pluripotent Stem (iPS) cells in serum- and feeder- free defined culture and TGF-  $\beta$ 1 regulation of pluripotency. *PLoS One*, 9(1) 1- 13, 2014. 10.1371/ journal.pone.0087151. 査読有
- Yamamoto N, Toratani S, Okamoto T. Anti-EGFR monoclonal antibody 12- 93 inhibits the growth of human salivary adenocarcinoma via sub-G1 arrest and induction of apoptosis. *J Oral Maxillofac Surg, Med, Pathol*, 26: 183- 187, 2014. doi:10.1016/ j.ajoms.2013.08.007. 査読有
- S. N. Zawani B. Rosli, Shintani T. Hayashido Y, Toratani S, Okamoto T.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibits FGF- 2 release from oral squamous cell carcinoma cells through downregulation of HBp17/FGFBP-1, *In Vitro Cell. Devel. Biol.- Anim*, Oct;50(9) : 802- 806, 2014. doi: 10.1007/ s11626- 014- 9787- 5. 査読有
- Hayashido Y., Kitano H, Sakaue T, Fujii T, Suematsu M, Sakurai S, Okamoto T. Over expression of integrin  $\alpha$  facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8 with type I collagen, *Int J Oncol*, Nov 4;45(5): 1875- 1882, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2642. 査読有
- Yamasaki S, Nabeshima K, Sotomaru Y, Taguchi Y, Mukasa H, Furue MK, Sato JD, Okamoto T. Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free defined medium, *International Journal of Developmental Biology*, 2013. 57(9-10): 715-724, 2013. Doi:10.1387/ ijdbc.130173to. 査読有
- Okamoto T, Sato JD, Barnes DW, and Sato GH, Review Paper: Biomedical advances from tissue culture, *Cytotechnology* 65(6), 967- 971, 2013. 10.1007/ s10616- 013- 9591- 1. 査読有
- Yoshioka Y, Toratani S, Okamoto T, 他3名; Ectomesenchymal chondromyxoid tumor of the tongue: insights on histogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. Feb;115(2) 233-240, 2013. 査読有
- Yoshioka Y, Toratani S, Ogawa I, Okamoto T. *J Oral Maxillofac Surg*. Ameloblastic carcinoma, secondary type, of the mandible: a case report. *Jan*;71(1) 58-62, 2013. 査読有
- 向笠英恵、山崎佐知子、田口有紀、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治、鎖骨頭蓋異形成症患者歯髓由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立、*本口腔組織培養学会誌*, 第22巻: 15-16, 2013. 査読無
- 藤井隆彦, 林堂安貴, 坂上泰士, 浜名智昭, 岡本哲治, インテグリン 8におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2 (hdm2) 結合部位の探索, *日本口腔組織培養学会誌*, 第22巻: 17-18, 2013. 査読無
- Rosli S.N.Z. 新谷智章, 林堂安貴, 笛吹恵美子, 岡本哲治,  $\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  suppresses HBp17/FGFBP-1 expression via NF $\kappa$ B pathway in oral squamous cell carcinoma: *日本口腔組織培養学会誌*, 第22巻: 19-20, 2013. 査読無
- Rosli SN, Shintani T, Hayashido Y, Toratani S, Usui E, Okamoto T.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression via NF- $\kappa$ B pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Oct 24.(12) 212-219, 2012. 査読有
- Govindam SV, Choi BK, Yoshioka Y, Kanamoto A, Fujiwara T, Okamoto T, Ojika M. Novel cytotoxic polyoxygenated steroids from an Okinawan sponge *Dysidea* sp. *Biosci Biotechnol Biochem*. 76(5): 999-1002, 2012. 査読有

15. Govindam SV, Yoshioka Y, Kanamoto A, Fujiwara T, Okamoto T, Ojika M. Cyclolobatriene, a novel prenylated germacrene diterpene, from the soft coral *Lobophytum pauciflorum*. *Bioorg Med Chem*. 15;20(2) 687-692, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計25件)

〔学会発表〕招待講演(計3件)

1. Tetsuji Okamoto, Strengthening Research Cooperation in Radiation Nuclear Medicine, Technical meeting on research cooperation 2,(招待講演)2013年10月01日~2013年10月05日 IAEA, Vienna, Austria
2. Tetsuji Okamoto, Radiation, Health, and Society: Post- Fukushima Implications for the Training of Health Professionals Technical meeting on research cooperation 1,(招待講演)2013年05月06日~2013年05月10日IAEA, Vienna, Austria
3. 岡本哲治, 招待講演: 基調講演「口腔がんに対する細胞治療」日中歯科医学大会(招待講演)平成24年4月27日 成都 中国四川省

〔学会発表〕一般講演(計22件)

1. 赤木恵理, 山崎佐知子, 岡本哲治, 他, センダイウイルスを用いたフィーダー細胞フリー・完全無血清培養系での末梢リンパ球からのhiPS細胞の樹立と維持に関する研究, 日本口腔科学会学術集会, 2014年05月07日~2014年05月09日, 京王プラザ, 東京
2. 末松 美玲, 林堂安貴, 岡本哲治, 他, 扁平上皮癌細胞でのオートファジーによるインテグリン $\alpha_v$ のプロセッシング, 日本口腔科学会学術集会, 2014年05月07日~2014年05月09日, 京王プラザ, 東京
3. 濱田充子, 山崎佐知子, 岡本哲治, 他, センダイウイルスを用いたフィーダーフリー・無血清培養系での歯髄細胞由来hiPS細胞の樹立と長期培養, 日本口腔科学会学術集会, 2014年05月07日~2014年05月09日, 京王プラザ, 東京
4. Akagi E, Yamasaki S, Hamada A, Taguchi Y, Mukasa H, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, and Okamoto T, Reprogramming efficiencies of hiPS cells with various virus vectors in serum- and feeder- free culture conditions, World Congress of Society for In Vitro Biology, 2014年05月30日~2014年06月04日, Hyatt Regency Savannah, Savannah, Georgia, USA
5. Hamada A, Yamasaki S, Akagi E, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Okamoto T, Generation and maintenance of human induced pluripotent stem cells in serum- and feeder-free culture using Sendai virus vectors,

World Congress of Society for In Vitro Biology, 2014年05月30日~2014年06月04日, Hyatt Regency Savannah, Savannah, Georgia, USA

6. Rosli S.N.Z., Shintani T., Toratani S., Usui E. and Okamoto T. Down- regulation of HBp17/FGFBP- 1 by  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibits FGF- 2 activity in oral squamous cell carcinoma cell line, 16th Workshop on Vitamin D, 2013年06月11日~2013年06月14日, Sanfrancisco, California, USA.
7. Taguchi Y., Yamasaki S., Shimamoto A., Mukasa H, Tahara H. and Okamoto T. Generation of induced pluripotent stem cells from dental pulp cells in serum free and feeder- free culture condition, 2013 World congress on In Vitro Biology, 2013年06月15日~2013年06月18日, Providence, Rhode Island, USA
8. Sakaue T., Hayashido Y., Hamana T., Fujii T. and Okamoto T, Analysis of binding site of ubiquitin ligase, human double minute 2 in integrin  $\beta 8$  in Oral Squamous Cell Carcinoma cell lines, The 2nd International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster, Feb. 11, 2013. Hiroshima.
9. Rosli S.N.Z., Shintani T., Hayashido Y., Toratani S., Usui E. and Okamoto T.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  down-regulates FGF-BP expression through NF $\kappa$ B pathway. The 2nd International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster, Feb. 11, 2013. Hiroshima.
10. Mukasa H., Yamasaki S. and Okamoto T. Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells from dental pulp cells of a patient with Cleidocranial dysplasia in serum-and feeder-free culture, The 2nd International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster, Feb. 11, 2013, Hiroshima.
11. Taguchi Y., Yamasaki S., Shimamoto A., Tahara H. and Okamoto T. Generation of induced pluripotent stem cells from dental pulp cells in serum-free and feeder-free culture condition, The 2nd International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster, Feb. 11, 2013, Hiroshima.
12. Fujii T., Hayashido Y., Hamana T., Sakaue T. and Okamoto T. Participation of heterodimer formation with integrin  $\alpha_v$  subunit in the stability of integrin  $\beta 8$  subunit in squamous cell carcinoma cells, The 2nd International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster, Feb. 11, 2013, Hiroshima.

13. Yamasaki S., Shimamoto A., Tahara H., and Okamoto T. Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture from fetal lung fibroblasts and dental pulp, World congress on In Vitro Biology, June 25, 2012. Bellevue, Washington, USA.
14. Rosli S.N.Z., Shintani T., Hayashido Y., Toratani S., Usui E. and Okamoto T.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  down-regulates FGF-BP expression through NF $\kappa$ B pathway, 15th Workshop on Vitamin D, June 20- June 22 Houston, Texas, USA, 2012.
15. 山崎佐知子、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治、鎖骨頭蓋異形成症患者歯髓由来細胞を用いた疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
16. 田口有紀、山崎佐知子、嶋本顕、田原栄俊、岡本哲治、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の単層無血清培養系の確立、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
17. 藤井隆彦、林堂安貴、浜名智昭、坂上泰士、岡本哲治、インテグリン  $\alpha 8$ におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2 (hdm2) 結合部位の探索、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
18. 坂上泰士、林堂安貴、浜名智昭、藤井隆彦、岡本哲治、インテグリン  $\alpha 8$ サブユニットとの二量体形成が  $\alpha 8$ サブユニットの安定化に与える影響、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
19. 伊藤翼、藤井良典、岡本哲治、口腔扁平上皮癌細胞におけるSP細胞群の癌幹細胞としての細胞・分子生物学的特性の検討、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
20. Rosli S.N.Z.、新谷智章、林堂安貴、笛吹恵美子、岡本哲治、口腔扁平上皮癌細胞株を用いた活性型ビタミンD3によるFGFBP / HBp17蛋白発現の検討、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
21. 坂上泰士、林堂安貴、浜名智昭、藤井隆彦、岡本哲治、Analysis of binding site of ubiquitin ligase, human double minute 2 in integrin  $\alpha 8$ 、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年5月17日、広島大学
22. Rosli S.N.Z.、新谷智章、笛吹恵美子、岡本哲治、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  down-regulates HBp17/FGFBP-1 by inhibiting NF  $\kappa$  B

activity、第85回日本生化学会大会、平成24年12月15日、福岡

〔図書〕(計2件)

1. 岡本哲治：良性腫瘍。戸塚靖則・高戸毅(監修):口腔科学,第2章:134-156,口腔領域の腫瘍,2013年12月10日、朝倉書店,東京
2. 岡本哲治、細胞培養実習テキスト、日本組織培養学会/編、3-125,2013年3月、株式会社じほう

〔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：  
 出願年月日：  
 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

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00169153

(2)研究分担者

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)

広島大学・病院・講師

研究者番号：70243251

(3)連携研究者

( )

研究者番号：