

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592614

研究課題名(和文) 頭頸部癌のEGFR標的治療におけるHPV感染と癌幹細胞との相関に関する研究

研究課題名(英文) HPV infection and cancer stem-cell in EGFR target therapy for head and neck cancer

研究代表者

藤井 正人(Masato, Fujii)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・聴覚平衡覚研究部・部長

研究者番号：70129633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞としてSP細胞における転写因子Oct3/4、Nanogの発現はSP細胞で顕著に高く、免疫細胞染色でも同様の結果が示された。MicroarrayにてSP細胞とnon-SP細胞との間で比較検討し、同様にSP細胞でOct3/4、Nanogの発現が高かった。EGFR発現では、SP細胞とnon-SP細胞との間に発現の有意な差は認めなかった。臨床腫瘍検体における同関連遺伝子の発現では、後発転移の予後不良例にOct3/4の発現、Nanogの発現が有意に高く、一方扁平上皮癌94例においてPCRにてHPV陽性であったのは62例66%でありEGFR標的治療の効果が良好であった。

研究成果の概要(英文)：SP cells as cancer stem-cell were isolated in head and neck cancer lines examined. Expression levels of Oct3/4 and Nanog were higher in SP cells than MP cells. Additionally, cell migration and invasion abilities were higher in SP cells than MP cells, whereas there was no difference in proliferation. Univariate analysis showed that expression of Oct3/4 and Nanog, vascular and muscular invasion, and mode of invasion were significantly correlated with delayed neck metastasis. Regarding the diagnostic performance, These results suggest that Oct3/4 and Nanog represent probable cancer stem-cell markers in HNSCC, which contribute to resistant to EGFR targeted therapy in part by enhancing cell motility and invasiveness. HPV infection was positive in 62% of 94 head and neck cancer patients. And the effect of radiotherapy and chemotherapy was better and showed good prognosis. It was suggested that cancer stem-cell markers are down regulated in HPV positive patients.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 癌幹細胞 ヒト乳頭腫ウイルス 上皮成長因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞における side population (SP) は癌幹細胞を十分に含んだ細胞と報告されている。癌幹細胞は、治療抵抗性、再発、転移に関与しているといわれている。しかしながら頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) の SP 細胞における癌幹細胞マーカーの機能と臨床的役割は十分に解明されていない。

(2) Stage / 舌扁平上皮癌は、通常舌部分切除術が行われるが、そのうち約 14-48% に原発巣は制御されているにもかかわらず、後発頸部リンパ節転移が生じる。後発頸部リンパ節は生存率を低下させる。

(3) 頭頸部扁平上皮癌では、特に中咽頭癌において HPV 感染が発がんに関連していることが注目されている。

2. 研究の目的

(1) 舌癌の原発巣が制御されているにもかかわらず後発頸部リンパ節転移が生じるのは、癌幹細胞の転移との関係性の検討を目的とした。

(2) HNSCC の細胞株を用いて SP 細胞の存在有無の検討、および有用な癌幹細胞マーカーの検討および機能の評価を検討した。またステージ I/II 舌扁平上皮癌臨床検体を用いて DNM とこれらの癌幹細胞マーカーの発現との相関関係について検討した。

(3) 頭頸部癌における HPV 感染について検討しその治療効果と EGFR 標的治療との関連をみる。

3. 研究の方法

(1) DNA 結合色素 Hoechst33342 を用い舌癌扁平上皮癌細胞株 (SAS, HSC4, SCC4) を flowcytometry にて sorting し癌幹細胞としての機能を持つと考えられる SP 細胞を同定する。

(2) SCC4 の SP 細胞と non SP 細胞を Microarray にて解析する。

(3) SCC4 の SP 細胞と non SP 細胞の間で、48 時間における proliferation assay, migration assay, invasion assay を行い、比較する。

(4) 初回治療として舌部分切除のみを行い、3 年以上経過観察した stage I/II 舌扁平上皮癌症例のうち原発巣標本を入手しえた 50 例を対象に、Oct3/4 と Nanog の発現を免疫染色にて評価し、後発頸部リンパ節転移 (delayed neck metastasis: DNM) との関係について検討する。

(5) 頭頸部扁平上皮癌で中咽頭癌症例において HPV の発現有無と EGFR 標的治療との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) SP は SAS にて 0.9%、HSC4 にて 0.9%、SCC4 にて 10.2%、それぞれ認められた。ABC transporter 阻害剤にてそれぞれ SP の割合が著明に減少することから癌幹細胞様細胞と考えられた。

(2) SP 細胞では Oct3/4, Ntohc1, CD44, ABCG2 が non SP 細胞より発現が高かった。RT-PCR にて癌幹細胞関連遺伝子の発現を SCC4 の SP 細胞と non SP 細胞の間で比較した結果、SP 細胞で転写因子 Oct3/4、

Nanog の発現が高く (図 1)、免疫細胞染色
 にも SP 細胞の Oct3/4、Nanog の発現が高
 かった。

(3) SCC4 の SP 細胞と non SP 細胞の間で、
 48 時間における proliferation assay、(図
 2) migration assay (図 3)、invasion
 assay (図 4) を行い、比較した。細胞増
 殖能に明らかな有意差は認めなかった。遊
 走能と浸潤能は SP 細胞が non-SP 細胞と
 比較して優位に高かった。

DNM は 13 例(267%)に認められ、Oct3/4、
 Nanog の発現との間に正の相関が認められた。

(4) 臨床病理学的因子は T classification、age、
 nest shape、differentiation、depth、muscular
 invasion、vascular invasion、Mode of
 invasion(3.4 v.s 1.2) lymphatic invasion、
 perineural invasion について DNM と単変量解
 析を行った。muscular invasion、vascular
 invasion、Mode of invasion(3.4 v.s 1.2)が
 DNM と正の相関が認められた。単変量解析
 で相関が認められた Oct3/4 expression、
 Nanog expression、Mode of invasion、
 vascular invasion、muscular invasion を
 logistic regression による多変量解析を行う
 と、DNM に対する独立相関因子は多変量解
 析を行うと Oct3/4 の発現(risk ratio = 14.78、
 $p = 0.002$)と vascular invasion(risk ratio =
 12.93、 $p = 0.017$)は、DNM と独立した相関関
 係を認めた。

(5) 頭頸部扁平上皮癌で中咽頭癌 92 例に
 おいて HPV 用陽性は 65 例で 71%であった。
 そのうちセツキシマブによる EGFR 標的治
 療を行った症例は 22 例であった。HPV 陽性
 例では完全奏効率が陰性例に対して有意
 に高く、HPV 陰性例では癌幹細胞マーカー

の発現が高くなっていることが考えら
 れた。

(6)以上の結果から Oct3/4 と Nanog は
 HNSCC の有用な癌幹細胞マーカーに
 なるのではないかと、そして高い遊走能と
 浸潤能を介して DNM を起こすことに寄
 与しているのではないかと考えられた。
 さらに、Oct3/4 の発現と vascular
 invasion は、DNM を起こす潜在的予測
 因子の可能性が示唆された。HPV によ
 る発がんは、癌幹細胞の発現を介して
 EGFR 治療効果が関与することが考え
 られた。

図 1

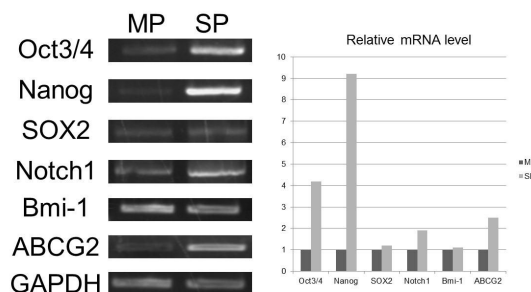


図 2 proliferation assay

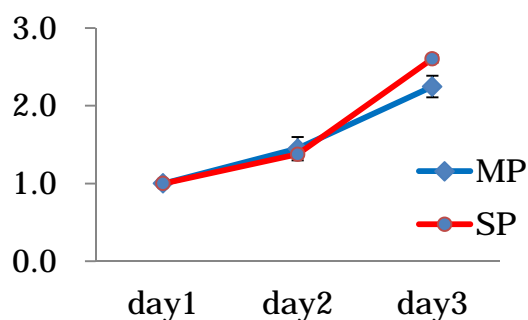


図 3 migration assay

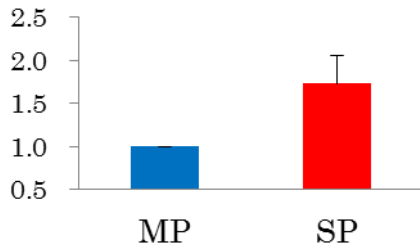
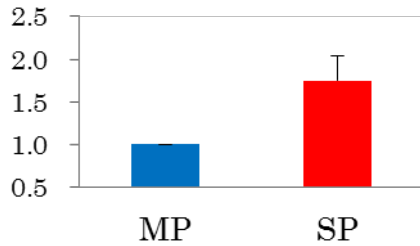


図4 invasion assay



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. Habu, N., Y. Imanishi, K. Kameyama, M. Shimoda, Y. Tokumaru, K. Sakamoto, R. Fujii, S. Shigetomi, K. Otsuka, Y. Sato, Y. Watanabe, H. Ozawa, T. Tomita, M. Fujii and K. Ogawa (2015). "Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma." BMC Cancer **15**: 730 2015
DOI 10.1186/s12885-015-1732-9
2. Hama T, Tokumaru Y, Fujii M, et al: Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a multicenter study in Japan. Oncology 87:173-82, 2014
DOI 10.1159/000360991

〔学会発表〕(計3件)

1. 藤井正人 シンポジウム1 ヒト乳頭腫ウイルス感染の現状と新しい展開 - 中咽頭がんとHPV第114回 日本耳鼻咽喉科学会総会 2013年5月 札幌市
2. 藤井正人 分子標的薬を用いた頭頸部癌

治療 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2014年5月 福岡市

3. 藤井正人 Current and future role of chemoradiation for oropharyngeal cancer based on HPV status 第4回アジア頭頸部癌学会 2015年5月 神戸市

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 正人 (FUJII, Masato)
独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター 聴覚平衡覚研究部・部長
研究者番号：70129633

(2)研究分担者

羽生 昇 (HABU, Noboru)
独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター 聴覚平衡覚研究部・研究員
研究者番号：60365369

孫 こうい (SON, Kouji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究所・研究員

研究者番号：40425773

(3)連携研究者
なし