

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791773

研究課題名(和文) 頭頸部癌幹細胞を用いた放射線・抗癌剤耐性の機序解明

研究課題名(英文) the therapeutic resistant mechanisms of head and neck cancer stem cells

研究代表者

福角 隆仁 (Fukusumi, Takahito)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70623734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌は、放射線・抗癌剤治療を行っても経年と共に再発・転移が生じるものも少なくない。これらの予後を改善する為には、治療抵抗性に関するマーカーの検索が重要である。近年癌発生において癌幹細胞理論が提唱されている。また、癌幹細胞は癌の発生のみならず、治療抵抗性にも重要な要因である事が多数報告されている。今回の研究において、我々は頭頸部癌の治療抵抗性や癌幹細胞の新規マーカー検索を目的とした。抗体アレイや、抗癌剤耐性細胞株の使用などにより、CD10が頭頸部癌における治療抵抗性や癌幹細胞の新規マーカーであることを示した。この結果はBritish Journal of Cancer誌に投稿し受理された。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy and chemotherapy initially control tumour growth in head and neck cancer. However, over time many patients suffer relapse. To improve prognosis, the establishment of a novel marker to predict therapeutic resistance is required. It is currently understood that cancer stem cells (CSCs) are responsible for treatment failure in a diversity of cancers. In the present study, identification and testing of cell viability in the presence of therapeutic agents, we identified CD10 as a potential marker of refractory HNSCC. Moreover, CD10 was found to confer a CSC-like phenotype, and underscored expression of OCT3/4. Thus, CD10 could be a specific marker of HNSCC CSCs that contributes to therapeutic resistance. These results were accepted by the British Journal of Cancer in 2014.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：癌幹細胞 CD10 頭頸部扁平上皮癌 抗癌剤耐性 放射線耐性 細胞周期 抗体アレイ

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、近年の手術機器や手技の向上、新たな分子標的薬の開発など治療の進歩があるにもかかわらず、その5年生存率はここ30年大きな改善は認めていない。その原因としては、癌の再発と転移が現時点でもコントロール不良であることがあげられる。つまり、頭頸部癌の生存率の向上を目指すためには、その再発と転移機序の解明に注力しなければならない。

近年、癌病態において癌幹細胞(CSCs)理論が注目されている。癌幹細胞は癌の発生のみならず治療抵抗性、転移・再発に深く関与していると言われている。頭頸部癌においては、2007年にPrinceらはCD44+CD24-の細胞はCSCsの特徴を有すると報告し、以来様々な報告が相次いでいる。そのマーカーはCD44+CD24-以外にも、CD133、SP細胞、BMI1、TGF- β 1、SCF、CD117、ALDH1など多数挙げられている。

この中でも頭頸部癌においてALDH1+細胞は現時点では最もCSCsに近い細胞と言われているが、マウスにおける異種間移植での腫瘍形成能が1/1000個と他臓器のCSCsに比べて低く、頭頸部癌のALDH陽性率は40~50%と比較的高いなど、まだまだその精度は低いというのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、われわれが共同研究により開発した網羅的細胞表面マーカー検索ツールを用いることによって、高精度の癌幹細胞マーカー検索と厳密な機能解析を行うことにより、癌幹細胞の標的化を実現させることを目的とする。

まずは、前述のように既報の頭頸部癌幹細胞マーカーはまだ精度が高いとは言えず、本研究により高精度な新規頭頸部扁平上皮癌幹細胞マーカーを検索する。

3. 研究の方法

本研究を進めるにあたり、Becton Dickinson社のLyoPlate™という測定機器を使用した。LyoPlate™は対象細胞に対してフローサイトメトリーを用いCD1a~CD340,EGFR,SSEAなどの251種類の細胞表面抗原の発現を同時に比較検討できる新しい機器である。

頭頸部癌細胞株を用い、通常培養と放射線照射細胞、cisplatin投与細胞での比較を行った結果、4種類の細胞表面抗原において放射線照射細胞、cisplatin投与細胞での発現上昇を認めた。この結果より、放射線耐性や化学療法耐性には新しいマーカーが関与する可能性が高いと考える。

ひいては放射線耐性、化学療法耐性が特徴である頭頸部癌幹細胞にも既存のマーカーでは挙げられていなかった新しいマーカーがある可能性が示唆された。

次に、細胞株を用いて、その候補細胞表面抗原発現の有無で分離を行った。その2群間で、腫瘍増殖能や自己複製能(colony formation assay,NOD/SCID mouseへのxenograft assay)・未分化能(sphere colony formation,未分化遺伝子の発現)の検討を行った。

4. 研究成果

頭頸部癌細胞株3種を用い、LyoPlate™にて通常培養と放射線照射群、cisplatin投与群での比較を行った。結果、4種類(CD10,CD15s,CD146,CD282)の細胞表面抗原において放射線照射細胞、cisplatin投与細胞での発現上昇を認めた。

次にcisplatin耐性株を用い、上記4種細胞表面抗原の発現を比較した。結果、CD10のみ親株に比してcisplatin耐性株で有意な発現の上昇を認めた。以降、CD10を対象を絞り

検討を加えた。まず、フローサイトメトリーにて CD10(+)細胞と CD10(-)細胞に分離し、cisplatin 耐性と fluorouracil 耐性、放射線耐性を検討した。その結果 CD10(+)細胞は CD10(-)細胞に比べ両薬剤に対する耐性、放射線耐性を持つ事が分かった。薬剤耐性の機序には、DNA 修復や細胞質内の代謝、アポトーシス、薬剤排出能など色々な機構が関与するが、今回我々は細胞周期に着目した。Hoechst33342 を用い、CD10(+)細胞と CD10(-)細胞で細胞周期の phase を比較したところ、CD10(+)細胞では有意に G0/G1 phase の割合が高かった。

次に我々は、この CD10(+)細胞の治療抵抗性、細胞周期の特性の原因として癌幹細胞理論に着目した。癌幹細胞は治療抵抗性を持ち、細胞周期が slow cell cycle もしくは dormant と言われている為、上記結果と合致する為である。また、癌幹細胞は自己複製能や造腫瘍能も併せ持つ。よって、CD10(+)細胞の両特性を sphere formation assay と NOD/SCID マウスへの異種間移植実験で検討した。sphere formation assay は細胞の自己複製能、NOD/SCID マウスへの異種間移植は細胞の造腫瘍能を表す。CD10(+)細胞は CD10(-)細胞に比べスフェア形成率が高く、マウスへの腫瘍形成率も高い結果を得た。

また、既報の頭頸部扁平上皮癌幹細胞マーカーである CD44、CD133、ALDH1 の発現と CD10 の発現の相互関係を検討したところ、ALDH1 において ALDH1(+)細胞は CD10 の発現が有意に高い事が判明した。上記検討より頭頸部扁平上皮癌細胞株において CD10(+)細胞は、cisplatin 耐性・fluorouracil 耐性・放射線耐性・自己複製能・造腫瘍能という癌幹細胞の各特質を持ち、既報の幹細胞マーカーである ALDH1 と発現の相互関係を持つ事が分かった。

このような癌幹細胞の特質を持つ機構を解明するため、OCT3/4 との関連を検討した。

OCT3/4 は組織幹細胞や癌幹細胞のマーカー遺伝子であり、癌発生過程での重要なファクターでもある。まず、CD10(+)と CD10(-)細胞での OCT3/4 の発現を qRT-PCR にて比較したところ、CD10(+)細胞で有意にその発現が高かった。また、siCD10 と si-control を比較したところ、siCD10 で有意に OCT3/4 の発現が低下した。以上より、CD10 の癌幹細胞性は OCT3/4 による関与が示唆された。

以上の結果を論文化し、2014 年 5 月に British Journal of Cancer 誌に受理され、今後掲載予定である。

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 1 件)

Takahito Fukusumi et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: British Journal of Cancer in press. (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

福角隆仁、石井秀始、今野雅允、西川晋平、加納義浩、長谷川慎一郎、小川久貴、浜部敦史、佐藤太郎、土岐祐一郎、森正樹、猪原秀典

『CD10 positive head and neck squamous cell carcinoma have therapeutic resistance and cancer stem cell features』第 72 回日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3 日-5 日 横浜

Takahito Fukusumi, Shimpei Nishikawa, Yoshihiro Kano, Katsuya Ohta, Shinichiro Hasegawa, Hisataka Ogawa, Atsushi Hamabe, Masamitsu Konno, Naotsugu Haraguchi, Taroh Satoh, Hideshi Ishii, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hidenori Inohara

『CD10 Positive Head and Neck Squamous

Cell Carcinoma Have Chemo-resistant and
Radio-resistant Properties』

American Association for Cancer Research
annual meeting

平成 25 年 4 月 5 日-10 日 Washington DC

福角隆仁、原口直紹、西川晋平、加納義浩、
佐藤太郎、石井秀始、土岐祐一郎、森正樹、
猪原秀典

『新規頭頸部扁平上皮癌幹細胞マーカーの
検索』

第 71 回 日本癌学会学術総会 平成 24 年 9
月 19 日-21 日、札幌

福角隆仁、花本敦、安井俊道、中原晋、竹
中幸則、山本佳史、原口直紹、石井秀始、土
岐祐一郎、森正樹、猪原秀典

『抗体アレイを用いた新たな頭頸部癌幹細
胞マーカーの検討』

第 36 回 日本頭頸部癌学会 平成 24 年 6 月
7 日-8 日、島根

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福角 隆仁 (Fukusumi Takahito)

大阪大学大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70623734

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：