

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791982

研究課題名(和文) Toll様受容体作動薬の扁平上皮癌への治療応用の検討

研究課題名(英文) Study of therapeutic applications of the Toll-like receptor agonist to squamous cell carcinoma

研究代表者

梅村 直己 (Umemura, Naoki)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：80609107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌細胞のCD44陽性細胞が癌幹細胞の特徴を有するか検討した。その結果、頭頸部扁平上皮癌CD44陽性細胞は癌幹細胞の特徴を有する事を確認した。頭頸部扁平上皮癌のCD44の発現を抑制することは癌の再発・転移を抑制に繋がる可能性を感じ、既存の化学療法剤の中で頭頸部扁平上皮癌のCD44の発現を抑制し、なおかつアポトーシスを誘導する化学療法剤を探索した結果、イリノテカン塩酸塩とゲフィチニブの併用療法がCD44の発現を抑え、さらにアポトーシスが誘導する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We determined whether CD44 positive cells of Head and Neck squamous cell carcinoma cell lines (HNSCC) have characteristics of Cancer Stem cells (CSCs). In the results, We confirmed that CD44 positive cells of HNSCC kept characteristics of CSCs.

These data suggested that the inhibition of CD44 expression in HNSCC may inhibit tumor recurrence and metastasis. Therefore, we studied the chemotherapeutic agent in existing that inhibits the expression of CD44 and induce apoptosis in the chemotherapeutic agent existing. As a result, combination therapy of gefitinib and irinotecan hydrochloride suppresses the expression of CD44, and we found that to induce HNSCC apoptosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 がん幹細胞 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

従来の悪性腫瘍治療で用いられる化学療法薬は細胞周期調節剤が主流であり、細胞周期の早い骨髄、毛髪、口腔粘膜の細胞分裂をも同時に抑制してしまう事で、高い確率で副作用が発現する。そこで近年、がん細胞特有の分子（遺伝子、タンパク質）を標的とした分子標的治療薬が登場し、多くのがんで発現が確認されている「上皮成長因子受容体（EGFR）」を標的とした薬、「ゲフィチニブ」が非小細胞肺癌に適用となった。しかしながら、従来の細胞周期調節剤の副作用とは違う間質性肺炎などの重篤な副作用の発現が問題になる一方で、未だ明らかな延命効果は確かめられていない。

歯科医療における悪性腫瘍は 90%以上が扁平上皮癌である。また、頭頸部治療においては顔貌の変形、摂食嚥下困難、発音、構音障害など、著しく Quality Of Life (QOL) を損なう事が多い。頭頸部扁平上皮癌に対する分子標的薬としては、現在、頭頸部扁平上皮癌の EGFR に作用する「セツキシマブ」の臨床適用が待たれている。しかしながら、「ゲフィチニブ」と同じ重篤な副作用の懸念は払拭されておらず、頭頸部扁平上皮癌の他の分子を標的となる新たな分子標的薬は未だ開発されていないのが実情である。

一方で、近年自然免疫学の研究から波及した Toll 様受容体 (Toll like receptor; TLR) が腫瘍細胞上において発現が確認された。(肺癌、結腸癌、卵巣癌、前立腺癌、悪性黒色腫、神経芽細胞腫など)。そのなかで 2006 年に、腫瘍細胞に対して、TLR3 の合成リガンドである poly I:C がアポトーシスを誘導するという報告[4]がなされた。そしてその後、様々な悪性腫瘍においても同様な報告がされ、TLR3 作動薬の悪性腫瘍への治療応用の期待が高まっている。

## 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌の為の新たな分子標的薬として、TLR3 作動薬の腫瘍転移抑制薬としての治療応用を目的とする。

## 3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3) を用いて、細胞培養上で様々な作動薬加えた場合、アポトーシスが誘導されるかどうかを DNA の断片化、ウエスタンブロッティングで新規のアポトーシスの指標である cleaved PARP、Annexin V もしくはカスパーゼ 3/7 の発現量を確認する事でアポトーシスへの誘導を評価する。さらにウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリーにて癌の特徴の解析、さらにどのような化学療法が癌を抑制し、再発を抑えるか分子生物学的手法を用いて検討する。

またある特定因子の細胞をソーティングもしくは MACS 磁気分離法にて分離し、その細胞の特徴を解析する。

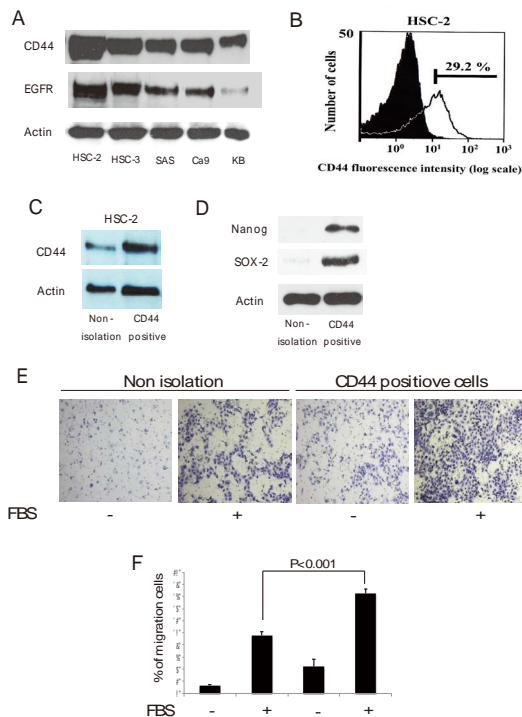
細胞培養上で事象をマウス腫瘍移植モデルにおいて評価し、腫瘍塊から切片標本を作成し、免疫組織染色。さらに腫瘍組織から、real time PCR で mRNA レベルを評価する。

## 4. 研究成果

まず申請者は様々な口腔扁平上皮癌細胞株における CD44 の発現を確認し、全ての細胞株において CD44 が発現していることを確認した (図 1-A,B)。

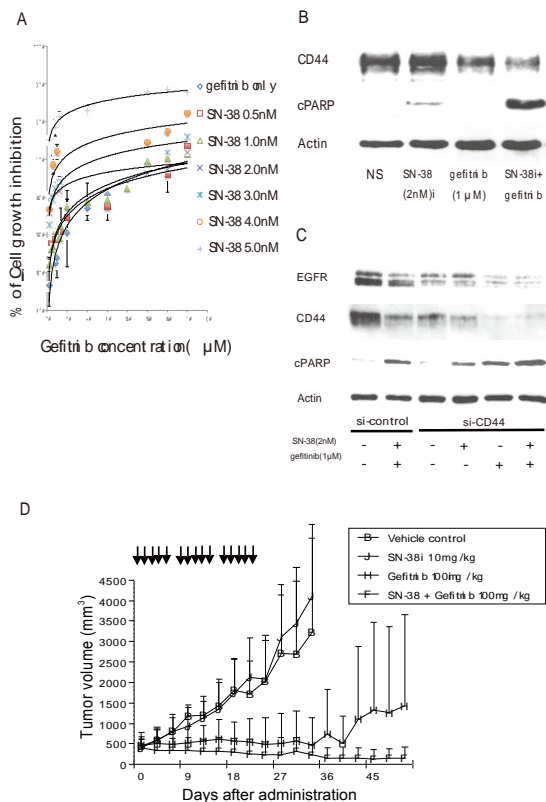
さらに、MACS 磁気分離法により CD44 陽性細胞を口腔扁平上皮癌細胞株より分離し、幹細胞マーカーである Nanog、SOX-2 の発現を確認した (図 1-C,D)。また、がん幹細胞は上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が活性化しており、細胞移行能を有すると考えられている点から CD44 陽性細胞の移行能を検証したところ、通常の口腔扁平上皮癌細胞 (Non-isolation) に比して、CD44 陽性細胞 (CD44 positive cells) は明らかに移行能を有していることを明らか

にした (図 1-E,F)。



次に、従来の化学療法剤 (シスプラチン、パクリタキセル、イリノテカン、5FU、ドセタキセル) と分子標的薬であるゲフィチニブ、ラパチニブ、エルロチニブの様々な組み合わせで、CD44 を標的にした併用療法を模索した。その結果、SN-38(イリノテカンの代謝物)とゲフィチニブの併用療法がCD44の発現を減弱させる一方でアポトーシスを強力に誘導することを新たに発見した (図 2-A,B)。さらに CD44 のノックダウン細胞を作成し、CD44 はアポトーシスを抑制していることが明らかにした (図 2-C)。次に腫瘍異種移植マウスモデルにより *in vivo* で併用療法効果を検証した。その結果、ゲフィチニブ単独治療で当初腫瘍増殖抑制がみられたが、治療終了後腫瘍の増大が起こった。その一方、併用療法では治療終了後も腫瘍の増殖抑制効果が維持されたのである (図 2-D)。治療終了後腫瘍細胞を採取し、腫瘍内の CD44 を確認したところ、併用治療群の腫瘍においてのみ CD44 の発現が減弱していたことを確認できた。これらの研究結果より、CD44 を標的とした治療法は再発・転移を有意に抑制

する可能性が示唆された。



## 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 1 件)

Emika Ohkoshi, Naoki Umemura, Tadashi Katayama, Hiroshi Sakagami: CD44 expression in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is stimulated by baicalin, a common constituent of traditional herbal (Kampo) medicines classified as Bupleurum root drugs, and its aglycone baicalein. Food and Chemical Toxicology *in press*

〔学会発表〕(計 2 件)

梅村直己、坂上宏:ゲフィチニブとイリノテカン塩酸塩の併用療法は頭頸部扁平上皮癌の再増殖を抑制する. 第 72 回日本癌学会学術総会. 10/01-10/03/2013 パシフィコ横浜

Naoki Umemura, Emika Ohkoshi, Toshiyuki Nanbu, Jyun Shimada, Hiroshi sakagami: Cancer stem cell targeting chemotherapy in Head and neck squamous cell carcinoma. 第 87 回日本薬理学会年会 3/19-3/21/2014. 東

北大学  
〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

梅村 直己 ( Umemura Naoki )  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号：80609107

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：