

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：31101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462854

研究課題名(和文) 口腔癌がん幹細胞の標的治療(抗CD44療法)後に誘発される多剤耐性化の解明と克服

研究課題名(英文) Mechanism of multidrug resistance caused after the treatment targeting CD44, and the strategy for overcoming the resistance in head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

大越 絵実加 (OHKOSHI, Emika)

青森大学・薬学部・准教授

研究者番号：10287667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞マーカーの一つであるCD44が恒常的に発現する口腔扁平上皮癌細胞を用いてCD44による細胞増殖及び多剤耐性化への寄与を解明する過程において、CD44が一過性に過剰発現した場合、DNAダメージにおけるG2/M期のアポトーシス誘導が減弱されること、チェックポイントキナーゼ1の活性化に関与する経路であることを明らかにした。作製した口腔癌細胞(HSC-3)のシスプラチン耐性株は、薬剤排出トランスポーターABCG2を発現し、化学構造や作用機序の異なる抗癌剤に対しても耐性を獲得していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Many studies have demonstrated that a variety of human malignancies, including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), contain subpopulations of cells called cancer stem-like cells (CSCs) that exhibit stem cell-like properties, such as self-renewal and tumor-initiating capabilities. CD44 is a marker of cancer stem cells in HNSCC, and CD44 expression is related to prognosis in cancer patients. The resistance of CSCs to conventional chemoradiotherapy may involve enhanced DNA damage repair pathways and alterations in cell cycle kinetics. Chk1 mediates S and G2 arrests. Our findings suggest that CD44 plays a role in enhancing the DNA damage response coordinated by Chk1. As part of a study of acquired multidrug resistance, then HSC-3 was grown in gradually increasing cisplatin concentrations and selected a resistant subline denote R HSC-3. R HSC-3 showed cross-resistance to several anticancer agents. The multidrug transporter, ABCG2, and CD44 were upregulated in R HSC-3 cells.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：薬剤耐性 がん幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

がん治療において、化学療法や手術などでがんを縮小・切除したにもかかわらず30%の例で再発・転移を招き、さらに抗癌剤治療後の多剤耐性がんの出現は、がん根治において解決すべき課題である。特に口腔扁平上皮癌は世界的に6番目に高い罹患率であり、また頭頸部という複雑な部位に発生することから外科的切除が難しく、たとえ切除しても患者のQuality of lifeを著しく低下させる。加えて5年生存率が30-50%という悪性度の高い癌である (Argiris A. et al. Lancet 2008)。この原因の一つに従来の抗癌剤では死滅しにくく、腫瘍を継続的に成長させ増殖させるがん幹細胞の存在が明らかになってきた。癌を根本的に治療するには、がん幹細胞も特異的に攻撃する治療方針の開発が求められている。CD44は、頭頸部癌におけるがん幹細胞の表面マーカーであり、CD44陽性癌細胞は陰性細胞と比較して、抗癌剤や放射線による治療に対して抵抗性を示すことから癌の再発に関わっていると考えられている。口腔癌患者の原発腫瘍では一般的ながん幹細胞マーカーであるCD44陽性が36%以上の場合、15%以下と比較し、再発リスクが高いことが報告され、CD44は診断と治療の新しいターゲットとして注目されている(Chinn SB. et al. Front Endocrinol 2012)。しかしながら、口腔癌におけるがん幹細胞の多分化能によってCD44標的治療後に誘発される細胞表現型の再発に対応する治療レジメはない。

### 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の抗癌剤治療後に誘発される多剤耐性は、がん幹細胞に特徴的な治療抵抗性を受け継いで再構成されたがん細胞の増殖によって起こると考えられている。本研究はがん幹細胞マーカーの一つであるCD44が恒常的に発現する口腔癌細胞を用いてCD44による細胞増殖及び多剤耐性化

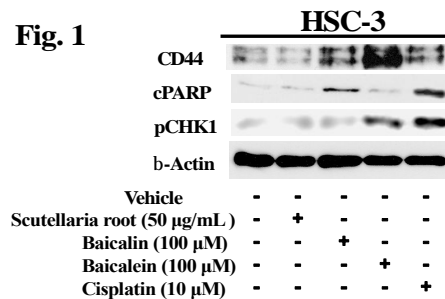
への寄与を解明する。

### 3. 研究の方法

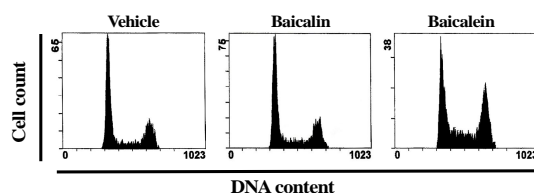
転移性ヒト口腔扁平上皮癌 HSC-3 細胞株を用いて、薬剤抵抗性におけるCD44の寄与について解析を行った。細胞周期S期~G2/M期でダメージを受けたDNAの修復に關与するチェックポイントキナーゼ1 (Chk1)分子のリン酸化による制御機構について検討した。さらにHSC-3の恒常的CD44ノックダウン細胞株を作製し、薬剤抵抗性に關与するCD44の寄与を検証した。シスプラチンをHSC-3に長期間投与し、作製した薬剤耐性株について解析を行った。

### 4. 研究成果

我々は、CD44を恒常的に発現するHSC-3細胞を用いて、薬剤抵抗性におけるCD44の役割について検討を行った。口腔癌治療に用いられている抗癌剤シスプラチンは細胞周期のS期からG2/M期に作用し、DNAダメージによるアポトーシス誘導を作用機序に持つ。Immunoblot法を用い、DNA修復シグナルマーカーとしてリン酸化Chk1 (pChk1)を、また、がん幹細胞マーカーCD44およびアポトーシスマーカーcleaved PARP (cPARP)を検討し、細胞周期はPI染色後フローサイトメーターにて測定した (Fig. 1-2)。



**Fig. 2**



さらに、CD44 の寄与を確認するため恒常的 CD44 ノックダウン HSC-3 細胞株 (shCD44) を作製し、解析を行った。細胞周期 G2/M に作用し、CD44 を一過性に誘導する baicalein は、Chk1 のリン酸化を認めるが、細胞死は認められなかった。一方、CD44 ノックダウン細胞を用いた baicalein の刺激は Chk1 のリン酸化および G2/M 期停止、さらに cPARP 発現上昇を認めた (Fig. 3-4)。このことから CD44 の過剰発現によっておこる G2/M 期のアポトーシス抵抗性は、DNA ダメージにおける Chk1 の活性化に関与する経路であることが示唆された。

Fig. 3

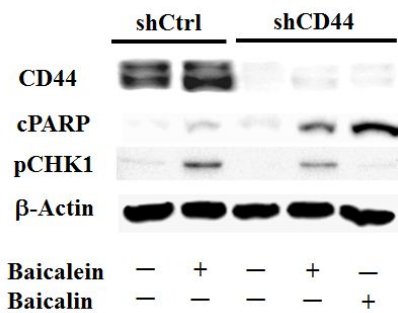
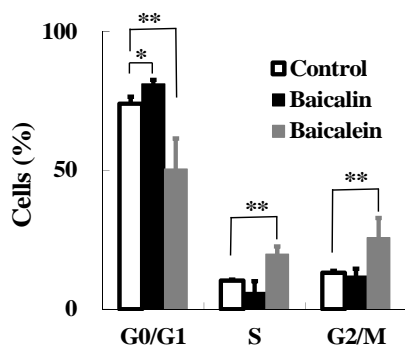
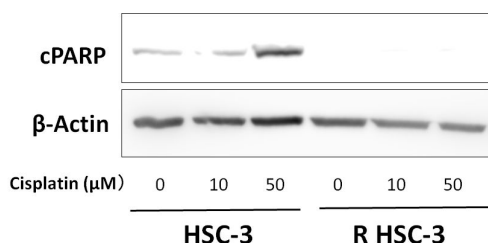


Fig. 4



一方で、多剤耐性を解明するため、HSC-3 のシスプラチン耐性株 (R HSC-3) を作製した。(Fig. 5)

Fig. 5



まず、R HSC-3 の交差耐性を調べた。R HSC-3 は、作用機序が異なる抗癌剤 5-フルオロウラシル、ドセタキセル、SN-38、エルロチニブ、ドキソルピシンにおいて 3~100 倍の抵抗性が見られ、多剤耐性を獲得していることが明らかとなった。また、Immunoblot 法により、薬剤排出トランスポーター ABCG2 の発現を確認した (Fig. 6)。ABCG2 は固形癌のがん幹細胞のマーカーとして報告がある。口腔扁平上皮癌のシスプラチン投与治療後に誘発される多剤耐性は、がん幹細胞に特徴的な CD44 と ABCG2

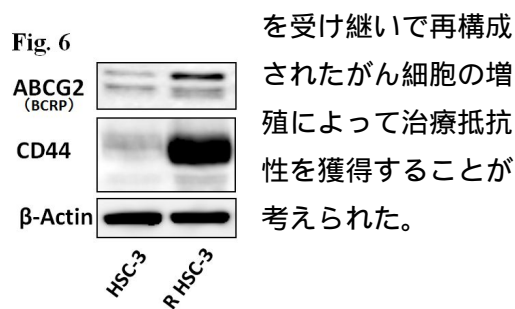


Fig. 6

を受け継いで再構成されたがん細胞の増殖によって治療抵抗性を獲得することが考えられた。

#### 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 4 件)

(1) Ohkoshi E., Umemura N., Induced overexpression of CD44 associated with resistance to apoptosis on DNA damage response in human head and neck squamous cell carcinoma cells., International Journal of Oncology, 50: 387-395, 2017, 査読有

(2) Sumi S., Umemura N., Takayama E, Ohkoshi E., Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Inagaki T, Kawaki H, Sumitomo S, Kondoh N., Metastasized murine oral squamous cell carcinoma cells induce intratumoral polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells., Oncology Reports, 37: 2897-2904, 2017, 査読有

(3) Umemura N., Ohkoshi E., Tajima M., Kikuchi H., Katayama T., Sakagami H., Hyaluronan induces odontoblastic

differentiation of dental pulp stem cells via CD44., Stem Cell Research & Therapy, 7: 135-147, 2016, 査読有

(4) Nakagawa-Goto K., Taniguchi Y., Watanabe Y., Oda A., Ohkoshi E., Hamel E., Lee K.H., Goto M., Triethylated chromones with substituted naphthalenes as tubulin inhibitors., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 24: 6048-6057, 2016, 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 村上 浩一、本木 雅大、大越 絵実加、梅村 直己、上田 條二「頭頸部扁平上皮癌におけるシスプラチン耐性株の機能解析」日本薬学会 137 年会(仙台)、2017 年 3 月、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

(2) 村上 浩一、本木 雅大、大越 絵実加、梅村 直己、上田 條二「頭頸部扁平上皮癌の CD44 過剰発現は細胞周期 G2/M 期の DNA 修復シグナル経路による mitotic catastrophe に抵抗する」日本薬学会 136 年会(横浜)、2016 年 3 月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3) 大越 絵実加、梅村 直己、坂上 宏「Baicalein, a major ingredient of herbal medicines, induced inadequate expression of CD44 that attenuated DNA damage-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma」日本薬理学会 88 年会、2015 年 3 月、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

など

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大越 絵実加 (OHKOSHI Emika)

青森大学・薬学部・准教授

研究者番号：10287667

### (2) 研究分担者

梅村 直己 (UMEMURA Naoki)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：80609107

### (3) 連携研究者

友村 美根子 (TOMOMURA Mineko)

明海大学・総合教育セ・教授

研究者番号：30217559

### (4) 連携研究者

杉本 昌弘 (SUGIMOTO Masahiro)

慶應義塾大学・先端生命科学研・教授

研究者番号：30458963

### (5) 研究協力者

後藤 益生 (GOTO Masuo)

University of North Carolina at Chapel Hill・Pharmacy・Research Assistant Professor