

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463005

研究課題名(和文) ヒト口腔扁平上皮癌幹細胞におけるGSK3 の発現及び機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of GSK3beta in human oral cancer stem cells

研究代表者

重石 英生 (Shigeishi, Hideo)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：90397943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CD44およびALDH1は癌幹細胞同定のための有用なマーカーであるが、我々は、これまでGSK3betaが口腔扁平上皮癌における癌幹細胞の自己複製に関与することを明らかとした(Shigeishi et al. 2013)。今回の研究成果から、GSK3betaがCD44high/ALDH1high 口腔癌細胞の癌幹細胞形質の維持に重要な役割を担うことが明らかとなり、口腔扁平上皮癌において、癌幹細胞形質と間葉形質の間には密接な関連があることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD44 and aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) has been proved useful marker for the identification of cancer stem cells (CSCs). We previously reported that glycogen synthase kinase 3(GSK3beta) is involved in the regulation of self-renewal ability of oral squamous cell carcinoma (OSCC) CSC (Shigeishi et al. 2013). We demonstrate that GSK3beta play a major role in the maintenance of stemness of CD44high/ALDH1high HNSCC cells. Additionally, our results indicate a close relationship between CSC and mesenchymal character in OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍では乳癌において CD44 高発現細胞が癌幹細胞として同定されて以降、大腸癌、脳腫瘍、膵臓癌において癌幹細胞の存在が相次いで報告された。口腔扁平上皮癌細胞においても、CD44 高発現細胞分画のなかに癌幹細胞形質をもつ細胞が存在することが明かとなった。我々は、口腔癌細胞株を用いて、CD44 と ESA (epithelial specific antigen) をマーカーとして FACS 解析を行い、CD44 高発現細胞に線維芽細胞様形態を示す細胞集団 (CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>) と上皮様形態を示す細胞集団 (CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>) の二つの phenotype が存在することを報告した。(Shigeishi et al. Stem Cells, 2013)。

CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は Vimentin、Snail 等の上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) 関連遺伝子を高発現し、高い遊走能を呈し、間葉系細胞の性質を示した。さらに CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞や CD44<sup>low</sup> 細胞と比較して高いコロニー形成能を示した。このことは、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞が高い自己複製能を有することを示唆する。一方、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞は E-cadherin の高発現と高い増殖能を示し、上皮系細胞に特徴的な性質を示した。

## 2. 研究の目的

幹細胞は自己複製能と分化能をもつ細胞であるが、癌組織においても癌特異的な幹細胞が存在し、腫瘍の再発や転移に深く関与すると考えられている。我々は、口腔癌細胞株において癌細胞形質を有する 2 つの細胞集団を同定し、その自己複製と分化の調節には GSK3 $\beta$  が関与することを明らかとした。本研究においては、これまでの成果をさらに発展させ、口腔扁平上皮癌幹細胞における特徴的な自己複製と分化の調節機構や抗がん剤抵抗性の獲得機構を解明する。

さらに癌幹細胞において制御される個々の遺伝子産物の発現と機能を検討し、ヒト口腔扁平上皮癌における高度悪性化機構の解明と、悪性化の制御について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔扁平上皮癌幹細胞における自己複製と分化の調節機構の解析

口腔扁平上皮癌細胞から、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞および CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>low</sup> 細胞を sorting し、その性状を解析する。両細胞の自己複製能等の癌幹細胞形質を検索する。また、数週間培養後の細胞形態の変化を検討する。さらに、RHAMM siRNA 発現ベクターを作成し、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞および CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>low</sup> 細胞に遺伝子導入を行い、自己複製能、分化能、細胞浸潤能、遊走能等について検討する。

### (2) 口腔扁平上皮癌幹細胞における抗癌剤抵抗性の獲得機構の解析

口腔扁平上皮癌幹細胞におけるアポトーシス抵抗性の検討を行う。CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞、CD44<sup>low</sup> 細胞において、AnnexinV を用いて、抗癌剤 (5-FU, CDDP, Docetaxel) により誘導されるアポトーシス細胞の検出を行う。また、5-FU の抵抗性に関与する Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の酵素活性を検討する。

### (3) 癌幹細胞形質の獲得と EMT との関連の検討

Snail 過剰発現細胞の樹立

口腔扁平上皮癌由来細胞株 (LUC4、Ca1、OM-1) に、当研究室で作成された Snail 過剰発現ベクターを遺伝子導入し、導入遺伝子産物の発現をウエスタンブロッティング法にて確認する。

Snail 過剰発現細胞における癌幹細胞形

## 質の検討

Snail 過剰発現細胞の CD44 及び ESA の発現を FACS 解析にて検索する。Snail 過剰発現により誘導された CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞を sorting し、GSK3β の発現レベル、幹細胞マーカー遺伝子の発現及び ALDH1 の酵素活性を解析し、導入前細胞と比較検討する。

Snail 過剰発現により誘導された CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞における性状を解析する。

これらの解析により EMT が誘導された細胞における癌幹細胞形質と GSK3β の役割を明らかとする。

## 4. 研究成果

### (1) 口腔扁平上皮癌細胞における癌幹細胞形質の解析

口腔扁平上皮癌細胞 OM-1 から、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞および CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>low</sup> 細胞を sorting し、その性状を解析した。CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞は GSK3β の高発現を示し、高いスフィアコロニー形成能を有し、Sox2、Oct4、Nanog 等の幹細胞マーカーの高発現を示した。さらに、GSK3β ノックダウン後に、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞のスフィアコロニー形成能は著しく抑制された。また、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞は線維芽細胞様形態を示し、ビメンチンの高発現を示し、間葉系細胞の形質を示した(Seino and Shigeishi et al. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2016)。以上の結果から、GSK3β が CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 細胞の幹細胞形質や表現型に重要な役割を担うことが示唆された。

### (2) 口腔扁平上皮癌細胞におけるアポトーシス抵抗性の解析

口腔扁平上皮癌細胞から、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>

細胞、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> 細胞、CD44<sup>low</sup> 細胞を sorting し、それぞれの細胞集団において、AnnexinV を用いて、抗癌剤 (5-FU) により誘導されるアポトーシス細胞の検出を行った。その結果、CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は、5-FU に対して、最も高いアポトーシス抵抗性を示した (Shigeishi et al. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2015)。CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は高い Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の発現を示し、ABC トランスポーターの高発現を示したことから、DPD が 5-FU の抵抗性に、また ABC トランスポーターが CDDP、Docetaxel に対する抵抗性に関与することが示唆された (Hashikata and Shigeishi et al. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2016)。

### (3) CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup>/GSK3β<sup>high</sup> 細胞における性状解析

口腔扁平上皮癌細胞 OM-1 から、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup>/GSK3β<sup>high</sup> 細胞を sorting し、その性状を解析した。CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup>/GSK3β<sup>high</sup> 細胞は CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup>/GSK3β<sup>low</sup> 細胞と比較して、より多くのスフィアコロニーを形成し、幹細胞マーカーの高発現を示した。一方、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>low</sup> 細胞において RHAMM をノックダウンしたところ、その増殖能が抑制されたことから、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>low</sup> 細胞の増殖には RHAMM が関与していることが示唆された。さらに、Snail 過剰発現により誘導された CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> 細胞は高い ALDH1 活性を示し、高いアポトーシス抵抗性を示した (Hashikata and Shigeishi et al. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2016)。

以上より、GSK3β が CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> 口腔癌細胞の癌幹細胞形質の維持に重要な

役割を担うことが明らかとなり、口腔扁平上皮癌において、癌幹細胞形質と間葉形質との間には密接な関連があることが強く示唆された。

#### 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 5 件 )

1 . Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Ono S, Simasue H, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M. CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup> head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 $\beta$ -dependent cancer stem cell properties. Journal of Oral Pathology & Medicine 45(3): 180-188, 2016. 査読有り .

2 . Hashikata M, Shigeishi H, Okui G, Yamamoto K, Tobiume K, Seino S, Uetsuki R, Kato D, Ishioka Y, Ono S, Ohta K, Higashikawa K, Sugiyama M, Takechi M. Snail-induced CD44<sup>high</sup> cells in HNSCC with high ABC transporter capacity exhibit potent resistance to cisplatin and docetaxel. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 9(8):7908-7918, 2016. 査読有り .

3 . Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, Rodini CO, Yamasaki M, Seino S, Sugiyama M, Takechi M, Mackenzie IC. Elevation in 5-FU-induced apoptosis in Head and Neck Cancer Stem Cells by a combination of CDHP and GSK3 $\beta$  inhibitors. Journal of Oral Pathology & Medicine 44(3): 201-207, 2015. 査読有り .

4 . Shigeishi H, Ohta K, Okui G, Seino S, Hashikata M, Yamamoto K, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Ono S, Shimasue H, Higashikawa K, Sugiyama M, Takechi M. Clinicopathological analysis of salivary gland carcinomas and literature review. Molecular and Clinical Oncology 3(1): 202-206, 2015. 査読有り .

5 . Shigeishi H, Higashikawa K, Takechi M. Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 140(10):1629-1640, 2014. 査読有り .

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

1 . 清野 紗矢香, 重石 英生, 奥井 岳, 箸方 美帆, 植月 亮, 山本 一博, 小野 重弘, 東川 晃一郎, 太田 耕司, 島末 洋, 武知 正晃. CD44high/ALDH1high 口腔扁平上皮癌細胞における癌幹細胞形質の解析. 日本組織培養学会第88回大会 2015年5月28日, 広仁会館(広島市).

2 . 箸方 美帆, 重石 英生, 清野 紗矢香, 太田 耕司, 東川 晃一郎, 武知 正晃. CD44highESAlow 口腔扁平上皮癌細胞における抗癌剤抵抗性とそのメカニズムの解析. 第25回日本口腔内科学会学術大会, 2015年9月19日, 大阪大学コンベンションセンター(吹田市).

3 . 清野 紗矢香, 重石 英生, 奥井 岳, 箸方 美帆, 植月 亮, 山本 一博, 小野 重弘, 東川 晃一郎, 武知 正晃. 口腔扁平上皮癌における ALDH1 発現と臨床病理学的指標との関わり. 日本口腔科学会・中国四国地方部会, 2014年10月25日, 徳島大学歯学部(徳島市).

4. 箸方 美帆, **重石 英生**, 奥井 岳, 山本一博, 清野 紗矢香, 植月 亮, 東川 晃一郎, 武知 正晃. 口腔扁平上皮癌細胞における5-FU 抵抗性について. 第 51 回日本口腔組織培養学会学術大会, 2014 年 11 月 15 日, 九州歯科大学講堂 (北九州市).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号: 90397943

##### (2) 研究分担者

東川 晃 一 郎 (HIGASHIKAWA  
KOICHIRO)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号: 80363084

小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号: 70379882

太田 耕司 (OHTA KOUJI)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号: 20335681