

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11251

研究課題名(和文) 無血清浮遊培養系でのCD133陽性口腔癌由来sphereの細胞内分泌学的特性解析

研究課題名(英文) Analysis of cellular endocrinological properties of CD133-positive oral cancer-derived sphere in a serum-free suspension culture system

研究代表者

虎谷 茂昭 (Toratani, Shigeaki)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・准教授

研究者番号：90172220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト口腔癌の癌幹細胞を標的とした新しい診断治療法を開発することを旨とし、口腔扁平上皮癌細胞(OSCC)より分離したCD133陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性解析を無血清培養系で行った。その結果、OSCCでは陽性細胞から陰性細胞へ、あるいは陰性細胞から陽性細胞へのトランジット機構が存在し、EGFやSHHは陰性細胞から陽性細胞へのトランジットを促進していると考えられた。一方、抗癌剤や低酸素環境は陰性細胞のみを標的としており、陰性細胞から陽性細胞へのトランジットは阻害していないと考えられた。陽性細胞 OSCCの機能維持には、EGFおよびSHH経路が重要な働きをしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we intended to develop a novel diagnostic and therapeutic method targeting cancer stem cells of human oral cancer and performed cellular and molecular biological characteristics analysis of CD133 positive cell group isolated from oral squamous cell carcinoma cell (OSCC) in serum - free culture system.

As a result, there was a transit mechanism from CD133 positive cells to negative cells or from CD133 negative cells to positive cells in OSCC. EGF and SHH were thought to promote transit from CD133 negative cells to positive cells. On the other hand, anticancer agent and hypoxic environment targeted only CD133 negative cells, and transit from negative cells to positive cells was considered not to be inhibited. It seems that the EGF and SHH pathways play an important role in maintaining the function of the positive cell OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん がん幹細胞 CD133

## 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、がん治療における新たな標的細胞として注目されている。我々は、大腸癌、肝細胞癌などのがん幹細胞マーカーの有力候補である CD133 の機能解析をヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) を用いて行い、以下の結果を得ている。(1)CD133 陽性細胞 (CD133+) の全細胞に占める細胞数の比率は約 0.5% であること、(2)通常癌細胞は足場依存性に増殖するが浮遊培養系では大部分が死滅するが、CD133+は浮遊細胞塊 (sphere) を形成・増殖したが、CD133 陰性細胞 (CD133-) は sphere を形成できなかった。以上より、CD133 は口腔癌における有力ながん幹細胞マーカーの候補であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

今回、口腔癌におけるがん幹細胞を標的とした新しい診断・治療法を開発することを目指し、OSCC 細胞株より分離した CD133 陽性細胞群のがん幹細胞としての細胞・分子生物学的特性を解析する。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、CD133+の産生する細胞増殖因子等の液性因子が sphere 形成能、造腫瘍性に及ぼす影響を分子生物学的に明らかにし、新たな治療標的を同定することを目的とする。 *In vitro* における sphere 内での CD133+と CD133-の相互関係を明らかにする。 癌幹細胞の特性である抗がん剤耐性、未分化能、多分化能、造腫瘍性における CD133+と CD133-の相違を比較検討する。 CD133+と CD133-の遺伝子、蛋白発現の相違を解析する。 Sphere 形成に及ぼす種々の液性因子および液性因子受容体遺伝子を解明する。 中和抗体や siRNA を用いて液性因子あるいは受容体の機能解析、sphere 形成能を比較検討する。

*In vivo* において同定した液性因子と CD133 の癌の浸潤・転移に及ぼす影響について解明する。

## 4. 研究成果

### 緒言

癌組織は多様な細胞集団から構成され、その中でも細胞周期の遅い細胞群は、ごく少数でも癌を生体内に再構築できることから、癌における幹細胞 (癌幹細胞) である可能性が示唆されていた。近年、癌は幹細胞能力と癌形成能を併せ持つ少数の癌細胞群と同細胞に由来した幹細胞の特性を持たない細胞群により形成、維持されていることが示され、癌幹細胞は癌治療における新たな標的細胞として注目されてきている。癌幹細胞の特徴として正常幹細胞と同様に、未分化な表面形質を示す、自己複製能により癌幹細胞集団を維持する、多分化能を有し多様な癌細胞に分化する、高い薬剤耐性を示す、高い腫瘍形成能を示すなどがあげられている。そのため癌幹細胞は癌の発生・進展のみならず再発、転移および治療抵抗性にも深く関与していると考えられている。

癌幹細胞研究においては、他の細胞集団から幹細胞群を正確に分離・同定することが重要である。現在までに癌幹細胞の特徴を利用した色々な分離方法が報告されている。まず正常幹細胞の機能的特徴を利用した方法として、ABC トランスポーター分子による色素や薬剤排出能力を利用した方法である。つまり幹細胞では、非幹細胞と比較して ABC トランスポーターが高発現されているため、DNA 結合蛍光色素 Hoechst33342 で染色すると、ABC トランスポーター高発現細胞は Hoechst 33342 で染色されにくくなる性質を利用したもので、UV 光で励起すると大部分の蛍光強度の高い細胞集団よりも蛍光強度の低い細胞群つまり side population (SP) 細胞群がフローサイトメトリーで分離されるが、この SP 細胞群には高頻度に癌幹細胞が存在するといわれ、乳癌、肺癌および脳腫瘍で報告されている。次に、細胞表面マーカーを利用して分離する方法がある。急性骨髄性白血病

(AML)の癌幹細胞がCD34陽性/CD38陰性細胞群により濃縮されることが報告されて以来、色々な分子が癌幹細胞で特異的に発現する細胞表面マーカーとして検討されている。このような癌幹細胞表面マーカーの発現パターンの同定は、癌幹細胞を検出する有効な手段および抗体治療の標的となると考えられる。このような癌幹細胞を同定するマーカーとして最も広く認識されている細胞表面マーカーとしては、CD133 (prominin 1) が有力である。CD133は、5回膜貫通型の糖タンパクで、プロミンファミリーに属し、当初神経幹細胞のマーカーとして同定された。近年、大腸癌、脳腫瘍、肝細胞癌、肺癌および前立腺癌の癌幹細胞マーカーの有力な候補と考えられている。

本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)における癌幹細胞を標的とした新しい診断・治療法を開発することを目指し、OSCC由来細胞株より分離したCD133陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性の解析を行った。

#### 検討項目

1. OSCC細胞株からのCD133陽性細胞群の分離とその細胞特性
2. 無血清浮遊培養系における浮遊細胞塊 (sphere) 形成能
3. Sphere形成に及ぼす種々の細胞増殖因子、抗癌剤、SHH経路阻害剤ならびに抗epidermal growth factor receptor (EGFR)抗体の影響
4. 低酸素環境のsphere形成能に及ぼす影響

#### 結果

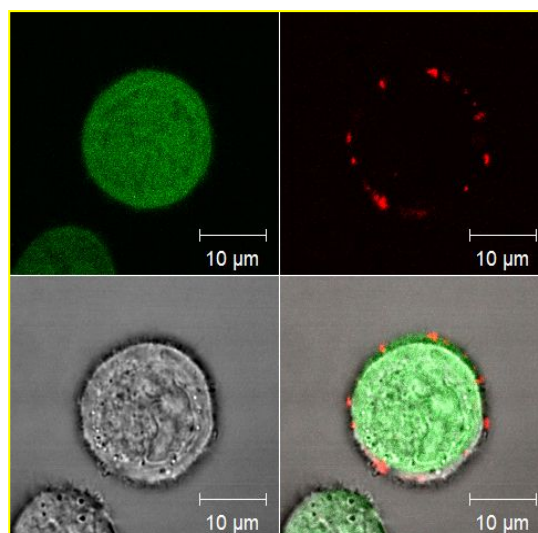
本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌における癌幹細胞を標的とした新しい診断・治療法を開発することを目指し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株より分離したCD133陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性の解析を、無血清培養系を用いて行った。その結果以下の事が明らかとなった。

1. 各細胞株において、陽性細胞の全細胞における細胞数の比率は、0.5%を示した。

#### CD133陽性細胞の全細胞中における比率

	全細胞数	陽性細胞数	%
KO	$1,088 \times 10^4$	$5.6 \times 10^4$	0.50
NA	$1,176 \times 10^4$	$6.6 \times 10^4$	0.55
UE	$1,057 \times 10^4$	$5.3 \times 10^4$	0.52

2. 無血清単層培養系では、陽性細胞の増殖能は陰性細胞と比較し低下していた。一方、無血清浮遊培養系では、各親細胞株および各陽性細胞はsphereを形成したが、陰性細胞は形成できなかった。しかし培養開始時に、陰性細胞に陽性細胞を加えることでsphere形成能を獲得し、その大きさや数は、陽性細胞数の割合が0.5%でほぼプラトーに達した。
3. GFP発現細胞を用いて検討した結果、sphere形成細胞の大部分は陰性細胞由来であり、陽性細胞がsphere形成過程で陰性にトランジットした細胞や、陰性細胞が陽性細胞にトランジットした細胞が認められた。また各sphere内には最低1個の陽性細胞が存在していた。



4. EGFおよびSHHは、共に濃度依存的に親細胞株のsphere形成能を促進したが、陽性細胞に対しては作用が異なり、EGFは陽性細胞

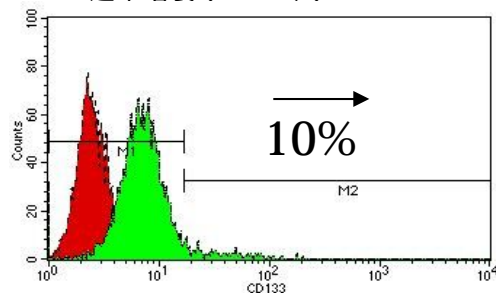
の sphere 形成能に影響を示さず, SHH は陽性細胞の sphere 形成能を促進した。

5. 抗 EGFR 抗体 (12-93 抗体) および SHH 経路阻害剤 (cyclopamin) は, とともに親細胞株の sphere 形成能を阻害したが, 陽性細胞に対しては作用が異なり, 12-93 抗体は陽性細胞の sphere 形成能に影響を示さず, cyclopamin は陽性細胞の sphere 形成能を阻害した。

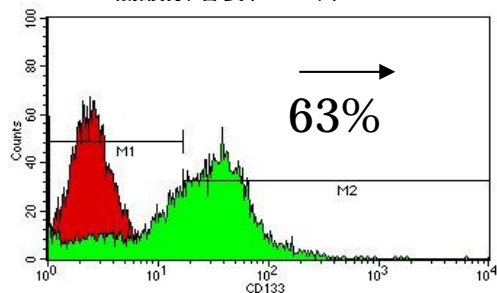
6. DXR は, 主に陰性細胞に作用し, sphere 形成細胞における CD133 陽性細胞の比率を増加した。

7. 低酸素培養下では, sphere 形成細胞における陽性細胞の比率は増加した。また陽性細胞は, その sphere 形成能を失った。

通常培養 (20% O<sub>2</sub>)



低酸素培養 (1% O<sub>2</sub>)



### 親細胞株の sphere 形成能に及ぼす低酸素環境 (1% O<sub>2</sub>) の影響

以上の結果から, 口腔扁平上皮癌細胞株においては, 陽性細胞から陰性細胞へ, あるいは陰性細胞から陽性細胞へのトランジット機構が存在しており, EGF や SHH は陰性細胞から陽性細胞へのトランジットを促進していると考えられた。一方, 抗癌剤や低酸素環境は陰性細胞のみを標的としており, 陰性細胞から陽性細胞へのトランジットは阻害していないと考えられた。したがって CD133 陽

性口腔扁平上皮癌細胞の機能維持には, EGF および SHH 経路が重要な働きをしていると考えられ, EGF や SHH 経路を標的とした分子標的治療と抗癌剤の併用療法の有用性が強く示唆された。

### 参考文献

- 1) Ailles LE, Weissman IL, Cancer stem cells in solid tumors, *Curr Opin Biotechnol*, 18: 460-466, 2007.
- 2) Christine A, Corbeil D, Huttner WB, AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature, *Stem Cells*, 21 : 506-508, 2003.
- 3) Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res*, 65: 10946-10951, 2005.
- 4) Dalerba P, Clarke MF, Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory, *Cell Stem Cell*, 1: 241-2, 2007.
- 5) Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA, Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy?, *MAbs*, 1: 12-25, 2009.
- 6) Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS, Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1, *Cancer Res*, 69:7243-7251, 2009.
- 7) Gilbert CA, Ross AH, Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new

- therapies, *J Cell Biochem*, 108: 1031-1038, 2009.
- 8) Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA, Cancer stem cells: mirage or reality?, *Nat Med*, 15: 1010-1012, 2009.
  - 9) Huls M, Russel FG, Masereeuw R, The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration, *J Pharmacol Exp Ther*, 328: 3-9, 2008.
  - 10) Jones RJ, Cancer stem cells-clinical relevance, *J Mol Med*, 87: 1105-1110, 2009.
  - 11) Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF, The biology of cancer stem cells, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23: 675-99, 2007.
  - 12) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells, *Nature*, 445:111-115, 2007.
  - 13) Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL, The cancer stem cell hypothesis: a work in progress, *Lab Invest*, 86:1203-1207, 2006.
  - 14) Trumpp A, Wiestler OD, Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin, *Nat Clin Pract Oncol*, 2008 5 : 337-47, 2008.
  - 15) Visvader JE, Lindeman GJ, Cancer stem cells in solid tumors; accumulating evidence and unresolved questions, *Nat Rev Cancer*, 8: 755-768, 2008.
- は下線)
- 1) Shintani T, Hayashido Y, Mukasa H, Akagi E, Hoshino M, Ishida Y, Hamana T, Okamoto K, Kanda T, Koizumi k, Yoshioka Y, Tani R, Toratani S, Okamoto T. Comparison of the prognosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw caused by oral and intravenous bisphosphonates. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 査読有、 44, 840 - 844, 2015.
  - 2) Yoshioka Y, Toratani S, Nakatoa H, Koizumi K, Hayashido Y, Okamoto T. Weekly paclitaxel plus cetuximab reduces the lung metastasis of adenoid cystic carcinoma arising from the salivary gland. *Oral Science International*, 査読有、 12, 67-71. 2015.
  - 3) Shintani T, Miyauchi M, Tani R, Yoshioka Y, Akagi E, Toratani S, Okamoto T: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw successfully treated with surgical resection and its histopathological feature: A long-term follow-up report. *J oral Maxillofac Surg Med Pathol*, 査読有、 27, 238-286. 2015.
  - 4) Toratani S, Tani R, Kanda T, Koizumi K, Yoshioka Y, Okamoto T. Photodynamic therapy using Photofrin and excimer dye laser treatment for superficial oral squamous cell carcinomas with long-term follow up. *Photodiagnosis and Photo-dynamic Therapy*, 査読有、 14, 104-110, 2016.
  - 5) Yamasaki S, Hamada A, Akagi E, Nakatao H, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Toratani S, Okamoto T. Generation of cleidocranial dysplasia specific human pluripotent stem cells in completely serum-, feeder-, and integration

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

-free culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim、  
査読有、 52. 252-264, 2016.

6) Shintani T, S.N.Z. Rosli, Takatsu F, Choon Y.F, Hayashido Y, Toratani S, Usui E, and Okamoto T: Eldecalcitol (ED-71), an analog of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 as a Potential Anti-cancer Agent for Oral Squamous Cell Carcinomas. J Steroid Biochem Mol Biol、 査読有、 164, 79-84.2016.

7) Shintani T, Takatsu F, Rosli SNZ, Usui E, Hamada A, Hayashido Y, Toratani S, Okamoto T. Eldecalcitol (ED-71), an analog of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ , inhibits the growth of squamous cell carcinoma (SCC) cells in vitro and in vivo by down-regulating expression of heparin-binding protein 17/fibroblast growth factor-binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) and FGF-2. In Vitro Cell Dev Biol Anim、 査読有、 53, 810-817, 2017.

8) Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Chanbora C, Mikuriya A, Nguyen PT, Furusho H, Ayuningtyas NF, Fujita M, Toratani S, Takechi M, Niida S, Takata T. Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma. [PLoS One](#). 査読有、 2017 Nov

17;12(11):e0187092. doi: 10.1371/journal.pone.0187092.

9) Nagasaki A, Ogawa I, Sato Y, Kitagawa M, Ando T, Sakamoto S, Shrestha M, Uchisako K, Koizumi K, Toratani S, Konishi M, Takeuchi K and Takata T. Central mucoepidermoid carcinoma arising from glandular odontogenic cyst confirmed by analysis of *MAML2* rearrangement: a case report. Pathology International、 査読有、 68, 31-35, 2018.

〔雑誌論文〕(計 9 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

虎谷 茂昭 (TORATANI, Shigeaki)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・  
准教授  
研究者番号：90172220

##### (2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO, Tetsuji)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・  
教授  
研究者番号：00169153

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )