

機関番号：17201  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20592023  
 研究課題名(和文) 喉頭癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走における間質細胞の役割とその制御機構  
 研究課題名(英文) Roles of stromal cells in the survival, growth, differentiation, migration of laryngeal carcinoma-derived cancer stem cells and its mechanisms  
 研究代表者 戸田 修二 (TODA SHUJI)  
 佐賀大学・医学部・教授  
 研究者番号：80188755

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞は癌幹細胞の生存・自己複製・癌細胞産生を促進したが、脂肪細胞、脂肪組織では上記現象の抑制傾向が見られた。脂肪組織由来の遊離脂肪酸であるパルミチン酸が癌幹細胞のアポトーシスを促進する傾向が見られた。癌幹細胞-間質細胞相互作用において、アディポカインの産生や遺伝子発現に有意差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Stromal fibroblasts promote the survival, self-renewal and cancer cell production of cancer stem cells under cancer stem cell-fibroblast interaction, while both adipocytes and adipose tissues tend to inhibit those of the cancer stem cells. Adipose tissue-derived free fatty acid, palmitate, tends to promote the apoptosis of cancer stem cells. Finally, the stromal-cancer stem cell interaction does not induce the significant changes of adipokine production and gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成22年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：(1)喉頭癌, (2)癌幹細胞, (3)線維芽細胞, (4)脂肪細胞, (5)増殖, (6)アポトーシス  
(7)遊走, (8)浸潤

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌組織に存在する少数の癌幹細胞が、癌細胞を産生し、腫瘍の形成・維持・進展に必須であることが示唆されている(Mimeault M, et al. Cancer Metastasis Rev 26: 203-14, 2007)。2007年、頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞(CD44陽性)が同定された(Prince ME, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma.

Proc Natl Acad Sci USA 104: 973-978, 2007)。我々も、喉頭扁平上皮癌組織から単離したCD44陽性癌細胞のマウス(SCID)移植実験により高効率造腫瘍能と培養系による癌細胞産生能(未発表、図1参照)を確認し、CD44陽性癌細胞が、喉頭癌の癌幹細胞であることを確認した。しかし、喉頭癌由来癌幹細胞の細胞動態の詳細は不明である。

一方、癌-間質細胞相互作用は癌生物学の中心課題の1つである。即ち、間質細胞が癌細胞の増殖・浸潤・転移を調節し、さらに、

上皮細胞に腫瘍化シグナルを誘導し、発癌にも関与する (Tlsty TD, et al. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 11: 54-59, 2001)。我々は、喉頭の間質細胞が、喉頭扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤を調節することを明らかにした (Yamada S, Toda S, et al. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 424-431, 1999)。即ち、線維芽細胞は癌細胞の浸潤を促進し、脂肪細胞は癌細胞の増殖を促進する。それ故に、癌細胞だけではなく、癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走を基盤とする、その未分化性の保持、自己複製、癌細胞産生、浸潤・転移巣形成能にも、間質細胞が活発に影響を与えていると推測されるが、癌幹細胞-間質細胞相互作用の研究は、国内外に報告はなく、その詳細は不明である。

以上の背景に基づいて、喉頭癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・遊走における線維芽細胞や脂肪細胞の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。本研究により、喉頭癌の癌幹細胞標的療法の開発が期待できる。

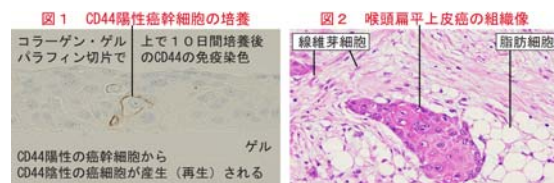
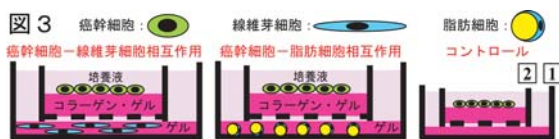


図1 CD44陽性癌幹細胞の培養

2. 研究の目的

本研究では、喉頭癌由来癌幹細胞と間質細胞の混合培養系と移植実験系を用いて以下の点を明らかにする。喉頭癌の間質細胞である線維芽細胞や脂肪細胞 (図2、3参照) が、

- (1) 癌幹細胞のアポトーシス・増殖・遊走・浸潤・転移巣形成に与える影響を解明する。
- (2) 癌幹細胞の未分化性の維持・自己複製・癌細胞産生に与える影響を解明し、癌幹細胞のニッチ (niche) 形成における間質細胞の役割やニッチ細胞を明らかにしたい。
- (3) 上記 (1)、(2) の癌幹細胞-間質細胞相互作用の仲介因子を同定する。また、線維芽細胞と脂肪細胞の癌幹細胞に与える影響の違いを解明する。



本研究により以下のことが期待される。

- (1) 喉頭癌由来癌幹細胞のニッチ細胞の

同定あるいは、癌幹細胞自体や癌幹細胞ニッチを標的とした喉頭癌の新規治療法の開発が期待できる。従って、より効率的な癌の治療戦略が構築可能となり、喉頭癌以外の多くの癌治療にも応用できる。

- (2) 本研究は、癌生物学に、癌幹細胞-間質細胞相互作用という新たな視点を提供するものであり、多くの癌組織の解析に有用と思われる。さらに、本研究は、ES細胞や組織幹細胞と間葉系細胞との細胞間相互作用に基づく再生医学にも応用可能である。

### 3. 研究の方法

#### 平成20年度の研究計画・方法

- (1) 材料 (喉頭癌手術材料の採取は、倉富 勇一郎が担当。細胞の単離と維持は、戸田修二が担当) : ① 喉頭癌由来 CD44 陽性癌幹細胞 : 手術で得られた喉頭扁平上皮癌組織から、単離した癌幹細胞 (学内倫理委員会の許可症例のみ) を使用する。手術症例が少ない場合を考慮して、喉頭扁平上皮癌細胞株 (HEp-2) から単離した CD44 陽性癌幹細胞も用いる。② 間質細胞 : a) 線維芽細胞 : 喉頭癌組織から単離した線維芽細胞と線維芽細胞株 (NIH3T3) を用いる。b) 脂肪細胞 : 喉頭癌組織や皮下脂肪組織から単離した脂肪細胞を用いる (戸田の文献 7, 14, 15, 18)。
- (2) 癌幹細胞の単離 (戸田修二が担当) : 癌組織を細切し、コラゲナーゼで消化し、癌細胞浮遊液を調整する。CD44 マイクロビーズ法 (ミルテニーバイオテック社) を用いて、プロトコール (Nature 445: 111-115, 2007) に従って、CD44 陽性癌幹細胞を単離する。10 cm 培養皿にコンフルエントになった HEp-2 細胞から、トリプシン処理で、癌細胞浮遊液を調整し、同様に、CD44 陽性癌幹細胞を単離する。これまでの我々の結果では、癌幹細胞は、癌細胞集団の 1-5% であり、造腫瘍能は、最低 1000 個の細胞移植で達成できる。CD44 陽性癌幹細胞は、幹細胞の自己再生マーカーである BMI-1 が陽性、involucrin と 34・E12 が陰性であるが、癌細胞は、CD44 と BMI-1 が陰性、involucrin と 34・E12 が陽性であるので、癌幹細胞と癌細胞を区別できる。
- (3) 培養システム (戸田修二が担当) : collagen gel invasion assay system を用いる (図3、戸田の文献 1, 10, 11 参照)。先ず、外皿 (1) に、間質細胞 (100 万個) を

I型コラーゲンゲル内に包埋し、1日間培養する。その後、底面がニトロセルロース膜から成る内皿（2）にコラーゲンゲル層を作製し、そのゲル上に、癌幹細胞（0.01、0.1、1万個）を播種し、この内皿（2）を、外皿（1）に入れて、培養する。コントロールは、間質細胞のない培養系である。また、外皿（1）に線維芽細胞と脂肪細胞を混合した培養系で、両者の相乗あるいは相反効果も検討する。

(4) 癌幹細胞の生存・増殖・未分化性・自己複製・癌細胞産生能の解析（戸田修二が担当）：培養1, 2, 3, 4週目毎に、**癌幹細胞のアポトーシス**をTUNEL法で、**増殖**をBrdU（ウリジン）の免疫染色で検討する。**癌幹細胞の未分化性**を、BMI-1、Oct-3/4、Notch-1、SMOの免疫染色、Western blot、PCRで解析する。癌幹細胞の自己複製能を、CD44とMBI-1を示標にして、**自己複製率**（ $[\text{CD44/MBI-1 陽性癌幹細胞数}] \div [\text{播種した初めの癌幹細胞数}] \times 100\%$ ）で、検討する。癌幹細胞の癌細胞産生能は、**癌細胞産生率**（ $[\text{CD44/MBI-1 陰性、involucrin/34 \cdot E12 陽性癌細胞数}] \div [\text{播種した初めの癌幹細胞数}] \times 100\%$ ）で、評価する。以上の解析は、ホルマリン固定・パラフィン切片による免疫染色とトリプシン処理でゲル面より単離した細胞のFACS法の2種の方法を用いて行う。以上の実験により、線維芽細胞と脂肪細胞の癌幹細胞の生存・増殖・未分化性・自己複製・癌細胞産生能に与える影響とその相違を解明する。

(5) 癌幹細胞のゲル内浸潤・遊走能の解析（倉富一郎が担当）：**癌幹細胞のゲル内浸潤**をヘマトキシリン・エオジン染色切片で（戸田の文献10, 11）、**癌幹細胞の遊走能**をボイデンチャンバーで検討する。さらに、細胞浸潤・遊走関連分枝であるHGF/C-Met pathway、MMP-1, 9、ラミニン・2、filamin Aの発現を免疫染色、Western blot、PCRで解析する（文献、戸田6, 11, 12、倉富6）。以上により、線維芽細胞と脂肪細胞の癌幹細胞の遊走・浸潤に与える影響とその相違を解明する。

以上により、喉頭癌由来癌幹細胞の生存・増殖・未分化性・自己複製・癌細胞産生・遊走・浸潤に及ぼす間質細胞の影響とその役割を解明する。線維芽細胞や脂肪細胞で影響が見られない場合は、血管内皮細胞やマクロファージを使用することや、今回の培養系は、癌幹細胞と間質細胞の細胞接触のない条件で解析しているので、細胞接触のある混合培養系を用いることを考慮する。

## 平成21年度以降の研究計画・方法

平成21年度は、混合培養系でのcDNA microarrayによる網羅的遺伝子解析と候補遺伝子の蛋白やその阻害因子（抗体など）の投与実験により、上記の間質細胞誘導性の癌幹細胞の細胞動態の仲介因子を同定する。平成22年度は、癌幹細胞と間質細胞の組み合わせによるスキッドマウス（SCID mouse）への皮下移植実験や喉頭癌組織の免疫組織化学解析により、造腫瘍能・転移形成・ニッチ形成における間質細胞の役割を解明し、ニッチ細胞の同定を試みる（移植した癌幹細胞や間質細胞とレシピエントの細胞との区別は、GFPトランスジェニックマウスを使用するので、識別できる）。余裕があれば、仲介因子阻害剤の喉頭癌治療の可能性を、移植実験系で試みる。

### 4. 研究成果

- 1) 線維芽細胞は、癌幹細胞の生存・自己複製・癌細胞産生を促進した。
- 2) 脂肪細胞は、線維芽細胞とは異なり、癌幹細胞の生存・自己複製率・癌細胞産生に関しては、抑制傾向が見られたが、統計学的な有意差が得られなかった。
- 3) 脂肪細胞-癌幹細胞相互作用におけるアディポカイン産生に優位な相違は見られなかった。
- 4) 脂肪細胞ではなく、脂肪組織での実験では、癌幹細胞の生存・自己複製率・癌細胞産生に関しては、抑制的であった。
- 5) 脂肪組織-癌幹細胞相互作用では、アディポカインに優位な変化見られなかった。脂肪組織が産生する遊離脂肪酸であるパルミチン酸、リノール酸、オレイン酸の中で、パルミチン酸が癌幹細胞のアポトーシスを促進する傾向が見られたが、統計学的な有意差は見られなかった。
- 6) 培養系でのcDNA microarrayによる網羅的遺伝子解析では、優位な遺伝子発現差を同定できなかった。おそらく、培養期

間中の細胞死、細胞脂肪毒性のためと考えられた。

- 7) 脂肪組織と癌幹細胞の解析に集中したために、当初予定していた癌幹細胞への候補遺伝子産物の蛋白やその阻害剤（抗体など）の投与実験、間質細胞誘導性の癌幹細胞の細胞動態の仲介因子の同定、癌幹細胞と間質細胞の組み合わせによるスキッドマウスへの移植実験は遂行できなかった。今後も上記課題を、検討する予定である。また、本研究では脂肪組織の実験を通して脂肪組織を基盤とした病態解析モデルを樹立したので、今後の研究の新展開が期待できる。

本研究により、以下の関連論文がサポートされ、出版された。

#### 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 21 件）

1. Toda S, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Yamamoto M, Ootani A, Yamasaki F, Koike E, Sugihara H. Culture model for studying thyroid biology and disorders. ISRN Endocrinology (in press) 査読有り
2. Toda S, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Yakushiji M. The influence of the skin microenvironment air-liquid interface on melanoma. Melanoma Book-1, Ed. by Murph M. InTech-Open access publisher (in press) 査読有り
3. Anan M, Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Ootani A, Node K, Toda S. A promising culture model for analyzing the interaction between adipose tissue and cardiomyocytes. Endocrinology 152: 1599-15609, 2011 査読有り
4. Nomoto-Kojima N, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Koike E, Ootani A, Yonemitsu N, Fujimoto K, Toda S. Interaction between adipose tissue

stromal cells and gastric cancer cells in vitro. Cell Tissue Res 344: 287-298, 2011 査読有り

5. 戸田修二、松延亜紀、内橋和芳、山本美保子、薬師寺舞、山崎文朗、小池英介、青木茂久、杉原 甫。脂肪組織と脂肪細胞の基礎形態学。臨床検査 55:533-538, 2011 査読有り

6. 松延亜紀、藤本一真、戸田修二。脂肪組織を基盤とした生体恒常性・メタボリックシンドローム病態解析モデル。臨床検査 55:581-586, 2011 査読有り

7. Aoki S, Makino J, Nagashima A, Takezawa T, Nomoto N, Uchihashi K, Matsunobu A, Sanai T, Sugihara H, Toda S. FLUID FLOW STRESS AFFECTS PERITONEAL CELL KINETICS: POSSIBLE PATHOGENESIS OF PERITONEAL FIBROSIS. Perit Dial Int. 2011 Apr 30. [Epub ahead of print] 査読有り

8. Udo K, Aoki S, Uchihashi K, Kawasaki M, Matsunobu A, Tokuda Y, Ootani A, Toda S, Uozumi J. Adipose tissue explants and MDCK cells reciprocally regulate their morphogenesis in coculture. Kidney Int 79:1151, 2011 査読有り

9. Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M, Kamochi N, Sonoda E, Soejima H, Fukudome K, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S. Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue. Pathol Int. 60(4):259-67, 2010 査読有り

10. 戸田修二（他 8 名、1 番目）。メタボリック症候群における脂肪組織の病理形態と病態解析培養モデル。病理と臨床 28:959-965, 2010 査読有り

11. Udo K, Aoki S, Uchihashi K, Kawasaki M, Matsunobu A, Tokuda Y, Ootani A, Toda S, Uozumi J. Adipose tissue explants and MDCK cells reciprocally regulate their morphogenesis in coculture. Kidney Int 78:60-68, 2010 査読有り

12. Yee CH, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Yamasaki F, Misago N, Piao M, Tetsuji U, Yonemitsu N, Sugihara H, Toda S. The air liquid-interface, a skin microenvironment, promotes growth of melanoma cells, but not their apoptosis and invasion, through activation of mitogen-activated protein

kinase. Acta Histochem Cytochem 43:1-7, 2010 査読有り

13. Toda S, Uchihashi K, Aoki S (他6名、1番目). Adipose tissue-organotypic culture system as a promising model for studying adipose tissue biology and regeneration. Organogenesis 5:50-56, 2009 査読有り

14. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S (他5名、6番目). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. Nat Med 15:701-706, 2009 査読有り

15. 戸田修二, 小池英介, 青木茂久 (他6名、1番目). 甲状腺研究のための培養系. ホルモンと臨床 57:80-87, 2009 査読有り

16. Aoki S, Takezawa T, Uchihashi K, Sugihara H, Toda S. Non-skin mesenchymal cell types support epidermal regeneration in a mesenchymal stem cell or myofibroblast phenotype-independent manner. Pathol Int 59:368-375, 2009 査読有り

17. 園田恵美子, 内橋和芳, 青木茂久, 船津丸貞幸, 米満伸久, 戸田修二. 成熟脂肪細胞、前脂肪細胞及び間葉系幹細胞を有する多機能性脂肪組織の長期培養法の確立. ホルモンと臨床 57:92-101, 2009 査読有り

18. Nagase K, Aoki S, Uchihashi K, Misago N, Shimohira-Yamasaki M, Toda S, Narisawa Y. An organotypic culture system of Merkel cells using isolated epidermal sheets. Br J Dermatol 161:1239-1247, 2009 査読有り

19. Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. Endocrinology 149:4794-4798, 2008 査読有り

20. Kamochi N, Nakashima M, Aoki S, Uchihashi K, Sugihara H, Toda S, Kudo S. Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of squamous cell carcinoma under cancer-stromal cell interaction. Cancer Sci 99:2417-2427, 2008 査読有り

21. 内橋和芳, 青木茂久, 園田恵美子, 米満伸久, 船津丸貞幸, 井手口浩幸, 杉原甫, 佛淵孝夫, 戸田修二. 骨芽細胞とヒト骨髄脂肪組織の細胞間相互作用は骨髄のホメオスタシスに關与する. ホルモンと臨床 56:170-176, 2008 査読有り

[学会発表] (計2件)

1. Toda S. Adipose tissue-organotypic culture and its application for studying adipose tissue biology. 28<sup>th</sup> Japan Endocrine Society Summer Seminar on Endocrinology & Metabolis (招待講演、2010, 7, 10 佐世保市)

2. 戸田修二. 組織細胞化学に於ける転写解析: 各種培養系における細胞増殖・分化と情報伝達・転写因子の発現. 第49回日本組織細胞化学会総会 (招待講演, 2008.10, 10 長崎市)

[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

戸田 修二 (TODA SHUJI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 80188755

(2) 研究分担者

倉富勇一郎 (KURATOMI YUICHIRO)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号：30225247

(3)連携研究者 なし