

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390544

研究課題名（和文） 口腔癌幹細胞の分離・同定と癌幹細胞特異的治療法の開発

研究課題名（英文） Isolation and identification of oral cancer stem cells and development of specific therapy for cancer stem cells

研究代表者

浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70104883

研究成果の概要（和文）：

本研究は、再発や転移に関与すると考えられる口腔癌幹細胞を分離・同定し、癌幹細胞に対する特異的治療法を開発することを目的とする。種々の口腔扁平上皮癌培養細胞は0.04～0.4%程度の癌幹細胞と考えられる Side population (SP) 細胞を含有している。その含有率は、シクロオキシゲナーゼ-2 高発現癌細胞、多剤耐性遺伝子 MDR-1 を発現するシスプラチン耐性癌細胞、分化度が低く浸潤能の高い癌細胞で高い傾向を示した。これらの癌幹細胞様細胞を用いて特異的治療法の糸口が見いだせる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to isolate and identify oral cancer stem cells (CSC) that are considered to be involved in tumor recurrence and metastasis, and to develop the therapy specific for CSC. Various cultured oral squamous carcinoma cells contained SP cells that are included in side population and considered CSC, in 0.04 – 0.4% of total cell population. The ratio included had a tendency to be increased in cancer cells overexpressing cyclooxygenase-2, cisplatin-resistant cancer cells expressing multidrug resistance gene MDR-1, and cancer cells showing poor differentiation and high invasiveness. There is a possibility to find out a clue for specific therapy by using these CSC-like cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌治療において、化学放射線療法や手術法などの改善により、局所制御率は飛躍的に向上したものの、5年生存率はわずかし

か上昇していない。その主たる要因は、従来の抗癌治療によっても残存し、治療抵抗性を示す悪性度の高い癌細胞による再発や転移の制御不能によると考えられる。

(2) そのような悪性度の高い癌細胞に対する1つの考え方として、近年自己複製と多分化能をもち組織再生能を有する癌幹細胞(Cancer stem cell)が注目されるようになった。癌幹細胞は、多剤耐性遺伝子MDR-1であるABCトランスポーターによる薬剤排出機構を有しており、抗癌剤や放射線に抵抗性を示し、再発や転移に関与することが示唆されている。

(3) 癌を撲滅するためには、癌幹細胞を標的とした治療が必須であると考えられ、すでに白血病、大腸癌、脳腫瘍、乳癌等では癌幹細胞の存在が報告されているが、口腔癌では十分明らかにはなっていない。

## 2. 研究の目的

口腔癌における癌幹細胞の分離・同定、および細胞生物学的、遺伝子学的解析を行い、癌幹細胞特異的治療法の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌由来培養細胞における癌幹細胞の分離

口腔扁平上皮癌培養細胞(SCCKN, SCCTF, KB, OSCなど)からHoechst33342を用いたFACSによりSP(side population)細胞の分離を行う。さらに、ベラパミル処理によりSP細胞であることを同定する。

(2) COX-2高発現KB/COX-2細胞における癌幹細胞の検討

COX-2を遺伝子導入したKB細胞(KB/COX-2)が癌幹細胞様特性を有していることから、KB/COX-2と親株KBにおけるSP細胞の比率を検討することにより、癌幹細胞とCOX-2の関連を検討する。

(3) ノードマウスにおける腫瘍形成能の検討  
癌幹細胞は、10,000個程度の少数の細胞移植によってノードマウスに腫瘍を形成することができる。種々の数の候補癌幹細胞をノードマウスに移植し、腫瘍形成能を検討する。

(4) 血清含有培養液での細胞分化の検討

癌幹細胞はbFGF, EGFを含む無血清培養においてその性質を維持することができるが、ウシ胎児血清を含む培養液に換えて培養した場合、扁平上皮癌幹細胞ではケラチノサイトに分化することが知られている。そこで細胞形態と分化度の関連について、分化マーカーであるサイトケラチン、E-カドヘリン、Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)発現を免疫組織化学染色およびウェスタンブロットで検討する。

(5) 抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌培養細胞にお

ける癌幹細胞の同定と分離

シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌培養細胞を作成し、癌幹細胞の有無を親株細胞と比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) SCCKN, SCCTF, KB, OSC-19, OSC-20には、癌幹細胞と考えられるベラパミル感受性のSP細胞が0.04~0.4%程度含まれていることが明らかとなった。その分画の細胞10,000個をNOD/SCIDマウスに移植したが、腫瘍形成には至らなかった。

(2) 造腫瘍性や転移能の高いシクロオキシゲナーゼ(COX)-2高発現KB/COX-2は、対照のKB/Neoに比べ、SP分画に含まれるベラパミル感受性細胞を2.5~4.6倍多く含んでいた。さらに、KB/COX-2はKB/Neoに比べ、癌幹細胞マーカーの1つと考えられるCD44の発現が高かった(論文番号③)。したがって、KB/COX-2は癌幹細胞様細胞としての性格を有することが示唆される。しかし、SP分画における転移関連ケモカインであるCXCR4陽性細胞率には差が見られなかった。

(3) 口腔扁平上皮癌由来H-1およびSa-3とそのシスプラチン耐性細胞H-1R, Sa-3Rは14~28%の高いベラパミル感受性SP分画を有していた。Sa-3とSa-3RではSP分画に差はなかったが、H-1RはH-1に比べ、1.6倍のSP分画細胞を含んでいた。一方、SP分画におけるCD44陽性/CXCR4陽性細胞率はH-1とH-1Rの間には差がなかったが、Sa-3RはSa-3に比べ17倍高かった。H-1RとSa-3Rは多剤耐性に関わるMDR-1遺伝子を高発現していることから、シスプラチン耐性細胞の中には転移能の高い癌幹細胞様細胞が含まれていることが示唆される。

(4) SCCKN, OSC-19, HSC3を用いて新たにシスプラチン耐性細胞を作成し(耐性度2~5倍)、癌幹細胞マーカーであるOct4, Nanog, BMI, Klf-4発現を調べたが、親株との間に明らかな差を見いだせなかった。これら3種の耐性細胞ではMDR-1発現が見られなかったことから、癌幹細胞特性にはMDR-1発現が必須であると考えられる。

(5) 癌幹細胞と上皮・間葉移行(EMT)の関連が示唆されていることから、浸潤様式の異なる口腔扁平上皮癌培養細胞(Grade3: SCCKN, HSC-2, OSC-20; Grade4C: HSC-3, SCC25, OSC-19; Grade4D: HOC313, TSU)ではGradeが進み分化度が低下するとともにE-カドヘリン、NGAL発現が減弱し、逆にN-カドヘリン発現が増強する(論文番号②)。これら細胞の中のOSC-20, OSC-19,

HOC313, TSU に対して、癌幹細胞マーカーである Nanog, BMI, CD44 発現を調べたところ、Nanog はいずれの細胞にも発現が見られなかったが、BMI, CD44 は浸潤性の高い HOC313 と TSU で強く発現する傾向が見られた。

(6) ヒト正常舌ケラチノサイトにヒトパピローマウイルス(HPV) 16 の E6E7 遺伝子あるいは変異型 CDK4, cyclin D1, ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を遺伝子導入すると不死化細胞が得られる。これら細胞にさらに癌遺伝子である HRAS あるいは EGFR と MYC を追加導入すると、100~10000 個の細胞移植によりヌードマウスに扁平上皮癌が形成される(論文番号①)。これらが癌幹細胞としての性格を有するか否か検索中である。

#### 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 □ Yusuke Zushi, Mako Narisawa-Saito, Kazuma Noguchi, Yuki Yoshimatsu, Takashi Yugawa, Nagayasu Egawa, Masatoshi Fujita, Masahiro Urade, Tohru Kiyono: An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. Am J Cancer Res 査読有 2011,1(7):869-881.
- ② □ Takashi Hiromoto, Kazuma Noguchi, Michiyo Yamamura, Yusuke Zushi, Emi Segawa, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation. Oncol Rep 査読有 2011,26:1415-1421.  
DOI:10.3892/or.2011.1429
- ③ □ Emi Segawa, Hiromitsu Kishimoto, Kazuki Takaoka, Kazuma Noguchi, Susumu Hashitani, Kazunari Sakurai, Masahiro Urade: Promotion of hematogenous metastatic potentials in human KB carcinoma cells with overexpression of cyclooxygenase-2. Oncol Rep 査読有 2010, 24:733-739.  
DOI:10.3892/or\_00000915
- ④ □ Nao Ohtsu, Kazuki Takaoka, Emi Segawa, Susumu Hashitani, Kazuma Noguchi, Hiromitsu

Kishimoto, Masahiro Urade: Antitumor effects of inhibitors of nitric oxide synthase or cyclooxygenase-2 on human KB carcinoma cells overexpressing COX-2. Oncol Rep 査読有 2010,24:31-36.  
DOI: 10.3892/or\_00000825

[学会発表] (計 13 件)

- ① 吉川恭平、野口一馬、山村倫世、頭司雄介、高岡一樹、岸本裕充、浦出雅裕: 口腔扁平上皮癌培養細胞を用いたシスプラチン耐性における銅排出輸送体 ATP7B の発現とその関与の検討  
第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2011.11.19, 千葉)
- ② 頭司雄介、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、瀬川英美、岸本裕充、浦出雅裕: 不死化ヒト正常ケラチノサイト (HTK) を用いた口腔がんの HPV 陽性、陰性モデル解析  
第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2011.11.19, 千葉)
- ③ Kazuki Takaoka, Sayaka Hidaka, Susumu Hashitani, Yusuke Zushi, Michiyo Yamamura, Emi Segawa, Kazuma Noguchi, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Effect of NOS inhibitors and CXCR4 antagonist on tumor growth and metastasis of human adenoid cystic carcinoma xenografted into nude mice.  
20<sup>th</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (2011.11.2, Santiago, Chile)
- ④ Yusuke Zushi, Kazuma Noguchi, Michiyo Yamamura, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Emi Segawa, Shin Okui, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinoma.  
20<sup>th</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (2011.11.2, Santiago, Chile)
- ⑤ 頭司雄介、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、森寺邦康、瀬川英美、奥井 森、岸本裕充、浦出雅裕: 不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた口腔癌の HPV 陽性、陰性モデルの解析  
第 56 回 (社) 日本口腔外科学会学術大会 (2011.10.21, 大阪)
- ⑥ 瀬川英美、野口一馬、高岡一樹、頭司雄介、岸本裕充、浦出雅裕: 口腔扁平上皮癌細胞の上皮・間葉移行 (EMT) における zyxin の関与

- 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011.10.5, 名古屋)
- ⑦ Michiyo Yamamura, Kazuma, Noguchi, Emi Segawa, Yusuke Zushi, Kazuki Takaoka, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: A functional analysis of zyxin in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. 16<sup>th</sup> European Cancer Congress (2011.9.25, Stockholm, Sweden)
- ⑧ Kazuma Noguchi, Takashi Hiromoto, Michiyo Yamamura, Yusuke Zushi, Emi Segawa, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation. 16<sup>th</sup> European Cancer Congress (2011.9.25, Stockholm, Sweden)
- ⑨ 山村倫世、野口一馬、瀬川英美、高岡一樹、頭司雄介、廣本孝史、岸本裕充、浦出雅裕: 口腔癌細胞におけるZyxinの発現および機能の検討  
第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2010.11.13, 高知)
- ⑩ 廣本孝史、野口一馬、山村倫世、瀬川英美、頭司雄介、岸本裕充、浦出雅裕: 口腔扁平上皮癌におけるNGALの発現  
第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2010.11.13, 高知)
- ⑪ 瀬川英美、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、頭司雄介、岸本裕充、橋谷進、浦出雅裕: 口腔癌細胞におけるEMT markerとしてのzyxinの発現  
第 55 回 (社) 日本口腔外科学会学術大会 (2010.10.16, 千葉)
- ⑫ 廣本孝史、野口一馬、瀬川英美、頭司雄介、山村倫世、岸本裕充、浦出雅裕: 舌扁平上皮癌の形成・分化度におけるNeutrophil gelatinase-associated Lipocalin (NGAL)の発現  
第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2010.6.25, 札幌)
- ⑬ 日高沙弥香、橋谷進、頭司雄介、田中徳昭、高岡一樹、浦出雅裕: 高転移能を有するマウス未分化癌に対するCXCR4拮抗剤とNOS阻害剤の腫瘍増殖および手に抑制効果  
第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2010.6.24, 札幌)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70104883
- (2) 研究分担者  
野口 一馬 (NOGUCHI KAZUMA)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50309473
- 橋谷 進 (HASHITANI SUSUMU)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00330449
- 岸本 裕充 (KISHIMOTO HIROMITSU)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30291818
- (3) 研究協力者  
瀬川 英美 (SEGAWA EMI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00553778
- 頭司 雄介 (ZUSHI YUUSUKE)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80581206
- 廣本 孝史 (HIROMOTO TAKASHI)  
兵庫医科大学・医学部・大学院生
- 山村 倫世 (YAMAMURA MICHIO)  
兵庫医科大学・医学部・大学院生