

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 5月 21日現在

機関番号：17201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591613
 研究課題名（和文） 扁平上皮癌の癌幹細胞の生存・増殖・分化における放射線被曝間質細胞の役割と制御機構
 研究課題名（英文） Roles of irradiated stromal cells in the survival, growth, differentiation of squamous cell carcinoma-derived cancer stem cells and its mechanisms
 研究代表者 蒲地 紀之（KAMOCHI NORIYUKI）
 佐賀大学・医学部・助教
 研究者番号：70452836

研究成果の概要（和文）：非放射線被曝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。放射線被曝線維芽細胞でも上記現象の促進傾向が見られたが、統計学的な有意差は得られなかった。放射線被曝線維芽細胞－癌幹細胞相互作用における遺伝子不安定性マーカーである 53BP1 の発現にも有意差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：Non-irradiated fibroblasts promote the survival, self-renewal and cancer cell production of cancer stem cells under cancer stem cell-fibroblast interaction, while irradiated fibroblasts tend to promote those of the cancer stem cells. However, both fibroblast types show no significant difference between irradiated and non-irradiated fibroblasts. Finally, the irradiated fibroblasts-cancer stem cell interaction does not induce the significant change of the genomic instability marker p53-binding protein 1 (53BP1) expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011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：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：(1)扁平上皮癌，(2)癌幹細胞，(3)線維芽細胞，(4)放射線

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 (PrinceME, 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)

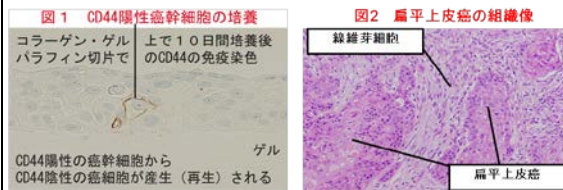
を確認し、CD44陽性癌細胞が、扁平上皮癌の癌幹細胞であることを確認した。しかし、扁平上皮癌由来癌幹細胞の細胞動態の詳細は不明である。一方、癌-間質細胞相互作用は癌生物学の中心課題の1つである。即ち、間質細胞が癌細胞の増殖・浸潤・転移を調節し、さらに、上皮細胞に腫瘍化シグナルを誘導し、発癌にも関与する(Tlsty TD, et al. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 11: 54-59, 2001)。また、頭頸部癌や子宮頸癌などの扁平上皮癌に対する放射線療法では、癌細胞自体と線維芽細胞などの間質細胞も被曝する。近年、放射線被曝細胞が、近傍の放射線非被曝細胞に活発な影響を与えることが示唆されており、この放射線被曝細胞の誘導する影響は、

“Radiation-induced bystander effects”と呼ばれている (Hamada N, et al. *J Radiat Res* 48:87-95, 2007)。我々は、放射線被曝線維芽細胞が、扁平上皮癌細胞の遺伝子不安定性を誘導し、癌細胞の増殖・浸潤を促進することを見出した

(Kamochi N, Toda S, Kudo S et al. Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of squamous cell carcinoma under cancer-stromal cell interaction. *Cancer Sci* 99:2417-2427, 2008)。それ故に、放射線被曝線維芽細胞は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-放射線被曝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、扁平上皮癌由来癌幹細胞の生存・増殖・分化・浸潤・遊走における放射線被曝線維芽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、癌幹細胞や間質細胞を標的とした放射

線療法の開発や放射線照射後の2次発癌の発病機構の解明が期待できる。



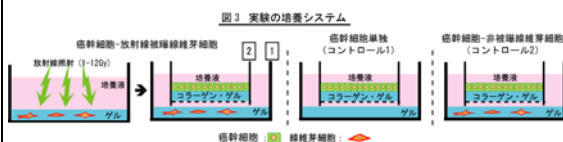
2. 研究の目的

本研究では、扁平上皮癌由来癌幹細胞と放射線被曝線維芽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。放射線被曝線維芽細胞(図2、3参照)が、

- 1) 癌幹細胞のアポトーシス(生存)・未分化性の維持・自己複製(増殖)・癌細胞の産生(分化)・浸潤・遊走・転移巣形成・遺伝子不安定性に与える影響を解明する。
- 2) 上記1)の癌幹細胞-放射線被曝間質細胞相互作用の仲介因子を同定し、その制御機構を解明する。

本研究により以下のことが期待される。

- 1) 癌幹細胞や間質細胞を標的とした放射線療法の開発により、扁平上皮癌のより効率的な治療戦略が樹立できる。また、他の多くの癌治療に応用可能である。
- 2) 本研究は、癌生物学に、癌幹細胞-放射線被曝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、放射線療法後の2次発癌の発病機構の解明が期待できる。



3. 研究の方法

平成21年度の研究計画・方法

(1) 材料 (細胞の単離と維持は蒲地紀之が担当): ①CD44陽性癌幹細胞:T3M-1(口腔癌)、HEp-2(喉頭癌)、HeLa(子宮頸癌)などの扁平上皮癌細胞株から単離したCD44陽性癌幹細胞を用いる。② 間質細胞:線維芽細胞:線維芽細胞株(NIH3T3、WI-26 VA4)を用いる。

(2) 癌幹細胞の単離(戸田修二が担当):培養癌細胞株から、トリプシン処理で癌細胞浮遊液を調整し、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。予備実験では、癌幹細胞は、癌細胞集団の5%であり、造腫瘍能は、最低1000個の細胞移植で達成できる。癌幹細胞は、自己再生マーカーであるBMI-1が陽性、involucrinと34βE12が陰性であるが、癌細胞は、CD44とBMI-1が陰性、involucrinと34βE12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(蒲地紀之が担当):collagen gel invasion assay systemを用いる(図3、蒲地、戸田の文献1, 11, 12参照)。まず、外皿 [1]に、線維芽細胞(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、放射線照射装置(Gammacell 40)を用い、線維芽細胞に放射線を照射する。照射線量は、1、3、6、9、12 Gyとする(Lee HS, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 38:1079-1087, 1997)。放射線照射後、1日間培養する。次に、底面がニトロセルロース膜からなる内皿 [2]に、コラーゲンゲル層を作製し、そのゲル上に癌幹細胞(100、1000、10000個)を播種する。この内皿 [2]を、外皿 [1]に入れて、培養する。コントロールは、線維芽細胞に放射線照射しない培養系や癌幹細胞単独の培養系である。

これまでの我々の研究では、本培養系で、放射線を照射した線維芽細胞には、遺伝子不安定性マーカーである53BP1の核内フォーカス形成が著明に誘導される。さらに、放射線被曝線維芽細胞と混合培養した扁平上皮癌細胞にも、53BP1の発現が誘導され、癌細胞の増殖・浸潤が促進される(Kamochi N, Toda S, Kudo S et al. Cancer Sci 99:2417-2427, 2008)。それ故に、本培養系は、癌幹細胞-放射線被曝線維芽細胞相互作用を解析する方法として、適切と考えられる。

(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(蒲地紀之、戸田修二が共同で担当):培養1, 2, 3, 4週目毎に、癌幹細胞のアポトーシスをss-DNAで、増殖をKi-67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($\frac{[CD44/MBI-1陽性癌幹細胞数]}{[播種した初めの癌幹細胞数]} \times 100\%$)で、検討する。癌幹細胞の癌細胞産生能は、癌細胞産生率($\frac{[CD44/MBI-1陰性、involucrin/34\beta E12陽性癌細胞数]}{[播種した初めの癌幹細胞数]} \times 100\%$)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、放射線被曝線維芽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を解明する。

(5) 癌幹細胞のゲル内浸潤・遊走能の解析(蒲地紀之が担当):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(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・遊走関連分子であるHGF/C-Met pathway、MMP-1, 9、ラ

ミンγ2, filamin Aの発現を免疫染色、Western blot、PCRで解析する（文献6, 11, 12）。以上により、放射線被曝線維芽細胞の癌幹細胞の浸潤・遊走に与える影響を解明する。

(6) 遺伝子不安定性の解析（蒲地、戸田、工藤が共同で担当）：遺伝子不安定性マーカーである53BP1の発現を蛍光染色で検討する（文献1）。53BP1は、放射線照射により、細胞の核内にフォーカスを形成する。このフォーカス形成を指標にして、放射線被曝線維芽細胞が癌幹細胞の遺伝子不安定性に与える影響を解明する。

以上の実験により、扁平上皮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・浸潤能及び遺伝子不安定性における放射線被曝線維芽細胞の役割を解明する。

平成22年度以降の研究計画・方法

平成22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、siRNAなど）の投与実験により、上記の放射線被曝線維芽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23年度は、癌幹細胞と被曝及び非被曝線維芽細胞の組み合わせによるスキッドマウス(SCID mouse)への皮下移植実験により、造腫瘍能・転移巣形成における放射線被曝線維芽細胞の役割を解明する（移植した癌幹細胞や線維芽細胞とレシピエントの細胞との区別は、GFPマウスを用いるので、識別出来る）。余裕があれば、仲介因子阻害剤の癌治療の可能性を検討する。

4. 研究成果

- 1) 非放射線被曝線維芽細胞は、癌幹細胞の生存・自己複製・癌細胞産生を促進した。
- 2) 放射線被曝線維芽細胞は、癌幹細胞の生存・自己複製率・癌細胞産生への増殖傾向が見られたが、統計学的な有意差が得られるほ

どではなかった。

- 3) 放射線被曝線維芽細胞－癌幹細胞相互作用における細胞浸潤・遊走関連分子であるHGF/C-Met pathway、MMP-1, 9、ラミンγ2、filamin Aの発現に有意差は見られなかった。
- 4) 放射線被曝線維芽細胞－癌幹細胞相互作用における遺伝子不安定性マーカーである53BP1の発現に有意差は見られなかった。
- 5) 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、細胞毒性のためと考えられた。
- 6) 放射線被曝線維芽細胞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、本研究にて癌幹細胞や放射線被曝細胞の安定した培養法が確立できたため、様々な細胞や組織との組み合わせにより病態解析モデルを樹立することが可能と考えられ、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7件）

1. Aoki S, Ikeda S, Takezawa T, Kishi T, Makino J, Uchihashi K, Matsunobu A, Noguchi M, Sugihara H, Toda S. Prolonged effect of fluid flow stress on the proliferative activity of mesothelial cells after abrupt discontinuation of fluid streaming. *Biochem Biophys. Res Commun.* 16; 416(3-4):391-6, 2011 査読あり

2. 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
3. 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
4. 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
5. Toda S, Uchihashi K, Aoki S (他6名). 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
6. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S (他5名). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med* 15:701-706, 2009 査読有り
7. 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

[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 なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
蒲地 紀之(KAMOCHI NORIYUKI)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：7 0 4 5 2 8 3 6

(2) 研究分担者
戸田 修二(TODA SHUJI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：8 0 1 8 8 7 5 5

工藤 祥(KUDO SHO)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：5 0 1 6 1 6 4 1

(3) 連携研究者 なし