

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26日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592211

研究課題名（和文） 頭頸部癌における癌幹細胞と EGFR 標的治療との相関に関する研究

研究課題名（英文） Cancer stem cell and EGFR target therapy for head and neck cancer

研究代表者

藤井 正人（Masato Fujii）

国立病院機構東京医療センター・聴覚平衡覚研究部・部長

研究者番号：70129633

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌細胞株における EGFR 発現と MT1-MMP 発現との相関に関する検討では、HSC4 に EGFR を添加すると MT1-MMP 発現の増加を認めた。すなわち、EGFR は細胞増殖のみならず MT-MMP を介した腫瘍の浸潤増殖にも関与する可能性が示唆され癌幹細胞に関連する MT1-MMP との相関を認めたことから EGFR と癌幹細胞との相関が示唆された。HSC4 の癌幹細胞としてのクローン形成能）について検討したところ 26%の細胞がクローン形成能が有り 60%のクローンが内因性 ALP 陽性であった。HSC4 における癌幹細胞マーカー発現を検討したところ Oct3/4 と Nanog が発現し CD133 の発現は見られなかった。FACS によって HSC4 から SP 細胞を分離同定した。その結果、0.3-0.4%の SP 細胞が同定された。FACS で分離同定された SP 細胞と non-SP 細胞（MP 細胞）における各種癌幹細胞マーカーの発現を検討した結果、SP 細胞において Oct3/4、Nanog の発現が有意に亢進していた。頭頸部癌細胞株 SAS および SCC4 から SP 細胞と MP 細胞を分離同定し癌幹細胞マーカーの発現を検討した。その結果 HSC4 と同様に Oct3/4、Nanog の発現が有意に亢進していた。早期舌がん症例 ステージ I/II の 41 例における癌幹細胞マーカー発現とリンパ節後発転移（DNM）との相関について検討した。その結果、DNM と Oct3/4、Nanog 発現とは有意に相関した。早期舌がんにおける様々な病理的特徴、癌幹細胞マーカー発現とリンパ節後発転移（DNM）との相関について多変量解析で検討した。その結果、腫瘍の血管浸潤と Oct3/4 が DNM にたいして独立した危険因子であることが証明された。以上から、EGFR は癌の浸潤、転移と関連し癌幹細胞マーカーとして Oct3/4 は EGFR を介して癌の再発、転移に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the EGFR expression in the head and neck cancer cell stock and the examination concerning the correlation with the MT1-MMP appearance, when EGFR was added to HSC4, an increase in the MT1-MMP appearance was admitted. That is, the possibility of taking part was suggested in the permeation proliferation of the tumor through not only the cell proliferation but also MT-MMP as for EGFR and because the correlation with MT1-MMP that related to the cancer stem cell had been admitted, the correlation of EGFR and the cancer stem cell was suggested. When the clone formative ability as the cancer stem cell of HSC4 was examined, 26% cells had the clone formative ability and the clone of 60% was cause ALP on the inside positivity. Expression of Oct3/4 and Nanog as cancer

stem cell marker in HSC4 was proved. The SP cell was identified from HSC4 by FACS. As a result, SP cell of 0.3-0.4% was identified. The appearance of Oct3/4 and Nanog was accentuation in the SP cell in significant as a result of examining the various cancer stem cell markers' appearance in the SP cell and the non-SP cell that the separation identification is done with FACS. The SP cell and the MP cell were identified from head neck cancer cell SAS, SCC4 apart and the cancer stem cell marker's appearance was examined. The appearance of Oct3/4 and Nanog was up regulated as a result in significant as well as HSC4. Cancer stem cell marker appearance and the lymph node in 41 examples of stage I/II of the early stage of the example of the tongue cancer syndrome, the correlation with metastasis (DNM) was examined. As a result, it intentionally correlated to DNM, Oct3/4, and the Nanog appearance. After various and pathology features, the cancer stem cell marker appearance, and lymph nodes in the early stage tongue cancer, the correlation with metastasis (DNM) was examined by the multivariate analysis. As a result, the vessel invasion of the tumor and Oct3/4 were proven and it was proven to DNM that it was an independent risk factor. As for EGFR, it was suggested that Oct3/4 be deeply related to the recurrence of cancer and the metastasis as the cancer stem cell marker in relation to permeation and the metastasis of cancer through EGFR above.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 幹細胞 EGFR

1. 研究開始当初の背景

① EGFR 標的治療の問題点

頭頸部癌の治療は手術が中心に行われているが切除不能例や再発、遠隔転移などが多く進行頭頸部癌の5年生存率は40-50%であり再発・遠隔転移した場合の生存期間は7-9ヶ月とされている。進行頭頸部癌患者の長期生存のためには再発・遠隔転移の抑制が非常に重要である。近年、分子標的薬剤の臨床応用が進み、その中でもEGFR阻害剤は頭頸部癌細胞の90%に発現されており(Grandis

JR, et al Cancer 78:1284-1292,1996) EGFRを標的としてその効果が期待されている。欧米ではEGFR阻害剤と抗がん剤の併用により再発・転移例の生存期間延長が報告されている(Vermorken J, ASCO Annual Meeting Proceedings abstract 6091, 2007)。しかしEGFR阻害剤併用の相乗効果は現在までの臨床治験では10-15%の上乗せ効果にとどまっておりEGFR阻害剤に対する耐性腫瘍の存在も考えられている(Thariat J, et al Int J Clin Oncol 12:99-110,2007)。このメカニズ

ムとして EGFR 変異体 EGFRvIII の存在も報告されている (Sok JC, et al Clin Cancer Res 12:5064-5073, 2006.)。

② 頭頸部癌幹細胞

癌の中に幹細胞の特性を示す「癌幹細胞」が存在することが明らかにされ、それらの細胞は癌の発病、転移、再発に深く関与することが報告された。この細胞群はABC transporter を高い発現し、それによってHoechst33342の染色性を低下させる。Hoechst 33342の染色が弱い細胞群として同定される細胞はside population (SP) 細胞と呼ばれており、脳腫瘍をはじめとして乳癌、膀胱癌、前立腺癌でその存在が明らかとなってきた。頭頸部癌では、Chenらが、頭頸部癌細胞株でSP細胞の存在を報告している (Chen JS et al.; Laryngoscope 116, 401-406, 2006)。また、松村らは頭頸部癌細胞株10株においてSP細胞が0.25-20%存在しマイクロアレイ解析によりABC transporter gene やcalcium-transporting, NF-kappaB cascadeの活性化を報告している(第65回日本癌学会抄録p502 p-1212, 2006)

③ 幹細胞とEGFR標的治療

頭頸部癌では正常細胞または体性幹細胞から様々な遺伝子変異をうけて発現した癌幹細胞が癌の増殖、転移、再発に深くかかわっていると考えられるが、癌幹細胞とEGFRとの相互作用がEGFRを標的とした治療の効果に様々な影響を及ぼしている可能性についてわれわれは注目している。すなわち癌幹細胞においてはEGFRが様々な修飾を受け変異体の出現などでEGFR阻害剤に対して耐性を獲得することが考えられる。EGFRにはEFGR familyと呼ばれるリガンドの異なる4種類のサブユニット、EGFR (ErbB1), ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 and ErbB4/HER4が知られているが、EGFRのリガンドであるEGFを添加することによって、頭頸部癌細胞株のSP細胞は増加することが報告されている。一方、癌浸潤酵素である膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1 (MT1-MMP) は頭頸部癌において再発や転移と深く関わっていることが示されており、MT1-MMPとEGFRとの関連が注目されている。しかし、現在まで頭頸部癌でのMT1-MMPとEGFR発現との関連に関して十分な報告はない。今後はEGFR標的治療の効果を高めるためには、EGFRに関して頭頸部癌での発現と癌幹細胞との関連を検討する必要がある。頭頸部癌における癌幹細胞とEGFRの発現、そのリガンドとの関連、そして様々な細胞内情報伝達機構の相互作用を明らかにすることは、EGFR阻害剤の耐性メカニズム解明につながる

頭頸部癌におけるEGFR標的治療の効果向上の重要な端緒となる。

2. 研究の目的

頭頸部癌における癌幹細胞とEGFR発現を同一の細胞株を用いて検討することによりその関連について明らかにする。癌幹細胞としての様々なマーカーの発現と臨床的悪性度との関連を検討することにより、癌幹細胞の予後因子としての重要性を明らかにする。

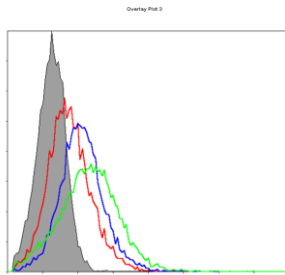
3. 研究の方法

- ① 癌浸潤度の指標となる頭頸部扁平上皮癌細胞株HSC4を使用しEGFRのリガンドであるEGFを投与し、EGF投与群と非投与群のMT1-MMPの発現の変化を検討する。
- ② HSC4を用いて癌幹細胞としての機能を検討する。ALPの発現を検討し、癌幹細胞としてのABCG2, Oct3/4, など癌幹細胞としての様々なマーカーの発現を検討する。癌幹細胞のマーカーとしては、Oct3/4, Nanog, Notch-1, ABCG2, を検討する。
- ③ FACSを用いてHSC4からSP細胞を分離採取する。採取したSP細胞とnon-SP細胞において各種癌幹細胞マーカーの発現の差を検討する。
- ④ 頭頸部癌細胞株HSC4, SAS, SCC4を用いて、FACSによりSP細胞を分離採取し、おのおの細胞株におけるSP細胞とnon-SP細胞の癌幹細胞マーカーの発現の違いを検討する。ここでの癌幹細胞マーカーとしては、Oct3/4, Nanog, Notch-1, ABCG2に加えたSOX2, Bmi-1を検討する。
- ⑤ 助湯のデータから癌幹細胞マーカーとして最も重要と考えられたOct3/4とNanogの発現に関して、臨床検体を用いて予後との関連を検討する。臨床検体としては、初期の舌がん症例で通常は予後が良いと考えられる症例のうち早期に再発転移を来した症例について、以上の実験から、癌幹細胞の最も予後と関連すると考えられるマーカーとの関連を検討する。

4. 研究成果

①まず臨床検体においてEGFRは15例中すべてに発現していた。頭頸部癌細胞株におけるEGFR発現とMT1-MMP発現との関連に関する検

討では、HSC4 に EGFR を添加すると MT1-MMP 発現の増加を認めた。すなわち、EGFR は細胞増殖のみならず MT-MMP を介した腫瘍の浸潤増殖にも関与する可能性が示唆された。(図 1)



横軸：MT1-MMP 染色強度 縦軸：細胞数
赤線:対象 EGFR 赤 0ng/ml 青 1ng/ml 緑 50ng/ml

図 1 EGFR 添加で MT1-MMP 染色強度の増加を認める。

②HSC4 の癌幹細胞としての自己複製能力(クローン形成能)について検討したところ 26% の細胞がクローン形成能が有り 60% のクローンが内因性 ALP 陽性であった。(図 2)

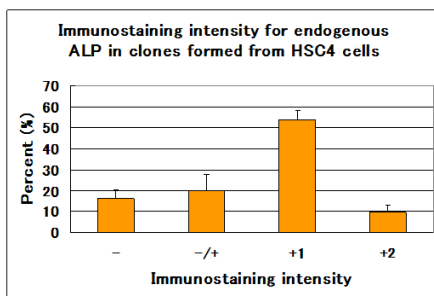
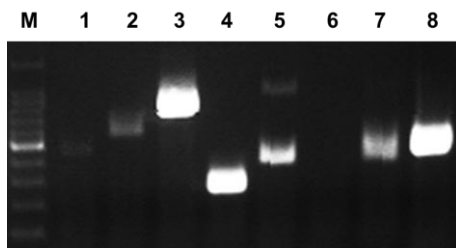


図 2 HSC4 細胞における内因性 ALP 発現割合

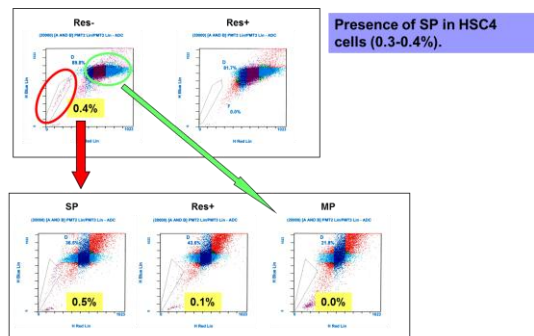
③ HSC4 における癌幹細胞マーカー発現を検討したところ Oct3/4 と Nanog が発現し CD133 の発現は見られなかった。(図 3)



M: markers 5: Oct3/4
1: ABCG2 6: CD133
2: Notch-1 7: Nanog
3: β -catenin 8: GAPDH
4: SMO

図 3 HSC4 における癌幹細胞マーカー発現

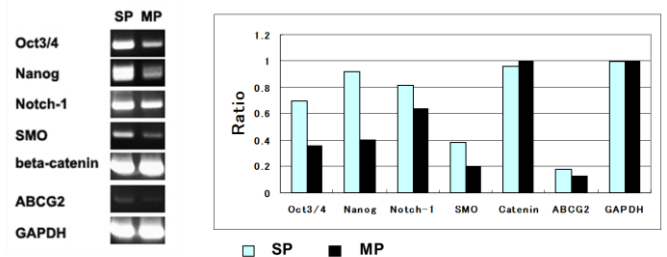
③ FACS によって HSC4 から SP 細胞を分離同定した。その結果、0.3-0.4% の SP 細胞が同定された。(図 4)



The SP cell regenerated SP and MP while MP cells generated MP cells only.

(図 4)

⑤ FACS で分離同定された SP 細胞と non-SP 細胞 (MP 細胞) における各種癌幹細胞マーカーの発現を検討した。その結果、SP 細胞において Oct3/4、Nanog の発現が有意に亢進していた。(図 5)



The expression of stem markers up-regulated in SP cells than in MP cells.

図 5 HSC4 の SP 細胞と MP 細胞における各種癌幹細胞マーカー発現の比較

⑥頭頸部癌細胞株 SAS から SP 細胞と MP 細胞を分離同定し癌幹細胞マーカーの発現を検討した。その結果 HSC4 と同様に Oct3/4、Nanog の発現が有意に亢進していた。(図 6)

Results : RT-PCR SAS

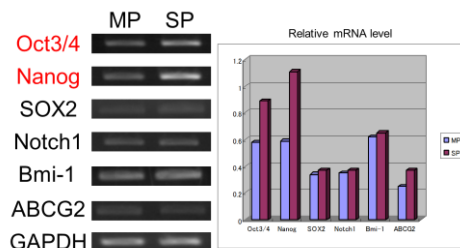


図 6 SAS 細胞における SP 細胞と MP 細胞の癌幹細胞マーカー発現

⑦ 頭頸部癌細胞株 SCC4 から SP 細胞と MP 細胞を分離同定し癌幹細胞マーカーの発現を検討した。その結果 SCC4 と同様に Oct3/4、Nanog の発現が有意に亢進していた。(図 7)

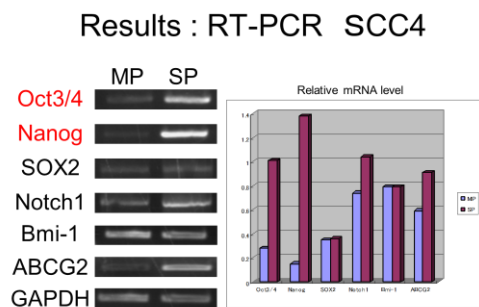


図 7 SCC4 細胞における SP 細胞と MP 細胞の癌幹細胞マーカー発現

⑧ 早期舌がん症例 ステージ I/II の 41 例における癌幹細胞マーカー発現とリンパ節後発転移 (DNM) との相関について検討した。その結果、DNM と Oct3/4、Nanog 発現とは有意に相関した。(図 8)

Immunohistochemistry		DNM - (n=28)	DNM + (n=13)	p value
Oct3/4	negative	24	5	0.004
	positive	4	8	
Nanog	negative	25	6	0.005
	positive	3	7	

Fisher's exact test

図 8 早期舌がん症例における DNM と Oct3/4 および Nanog 発現との相関

⑨ 早期舌がんにおける様々な病理的特徴、癌幹細胞マーカー発現とリンパ節後発転移 (DNM) との相関について多変量解析で検討した。その結果、腫瘍の血管浸潤と Oct3/4 が DNM にたいして独立した危険因子であることが証明された。(図 9)

Factor	Relative Risk	95% Confidence Interval	p value
Stage 3 (ref 2)			
Vascular invasion +	1.782	1.501-38.883	0.035
Oct3/4	10.851	1.881-28.803	0.008
Stage 5			
Vascular invasion +	1.851	0.852-38.138	0.013
Nanog	4.814	0.813-31.848	0.150
Oct3/4	8.458	1.381-21.423	0.051
Stage 1			
Muscular invasion +	5.188	0.384-18.884	0.315
Vascular invasion +	4.812	0.428-25.181	0.188
Nanog	4.588	0.283-35.188	0.128
Oct3/4	1.728	1.183-48.248	0.033

図 9 早期舌がん症例における、病理的特徴および Oct3/4、Nanog 発現と DNM との多変量解析による相関の検討。

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 1 件)

- ① Guangwei Sun, Masato Fujii, Akira Sonoda, Yutaka Tokumaru, Tatsuo Matsunaga, Noboru Habu Identification of Stem-like Cells in Head and Neck Cancer Cell Lines Anticancer Research 査読有 2010,30,2005-2010 <http://ar.iarjournals.org/>

[学会発表] (計 4 件)

- ① 羽生 昇 藤井正人 今西順久 徳丸 裕 小川 郁 口腔舌扁平上皮癌における Oct3/4 と Nanog の発現とその臨床的意義 第 70 回日本癌学会 2011 年 10 月名古屋市
- ② 羽生 昇 今西順久 徳丸 裕 坂本 耕二 富田俊樹 小川 郁 藤井正人 頭頸部扁平上皮癌におけるがん幹細胞の存在と marker の発現に関する検討 第 35 回日本頭頸部癌学会 2011 年 6 月 名古屋市
- ③ 羽生 昇 徳丸 裕 藤井正人 頭頸部扁平上皮癌における SP 細胞の同定と機能の解明 第 34 回 日本頭頸部癌学会 2010 年 6 月 東京都
- ④ 羽生 昇 徳丸 裕 角田晃一 矢島 陽子 藤井正人 頭頸部扁平上皮癌細胞株における上皮成長因子受容体と膜型 MMP の相互作用 第 33 回 日本頭頸部癌学会 2009 年 6 月 札幌市

[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
<http://www.ntmc-jibika.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 正人 (MASATO FUJII)
国立病院機構東京医療センター・臨床研究
センター・聴覚平衡覚研究部・部長
研究者番号：70129633

(2) 研究分担者

羽生 昇 (NOBORU HABU)
国立病院機構東京医療センター・臨床研究
センター・聴覚平衡覚研究部・研究員
研究者番号：60365369

孫 こうい (KOUJI SUNG)
国立病院機構東京医療センター・臨床研究
センター・聴覚平衡覚研究部・研究員
研究者番号：40425773

(3) 連携研究者

()

研究者番号：