

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4月20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592335

研究課題名（和文）：ヒト唾液腺悪性腫瘍の癌幹細胞の同定と腫瘍組織構築への関与

研究課題名（英文）：Cancer stem cells of salivary gland tumors: identification and contribution to histological morphogenesis

研究代表者

藤田 修一（FUJITA SHUICHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00181355

研究成果の概要（和文）：

癌幹細胞は、腫瘍組織の発生、組織構築、予後に緊密に関与している細胞である。本研究では、唾液腺腫瘍の癌幹細胞の分布を明らかにすることで、唾液腺腫瘍の組織構築に癌幹細胞がどのように関係しているのかを検討した。唾液腺腫瘍、特に悪性腫瘍では癌幹細胞は細胞外基質に接する部位に多く、細胞外基質が癌幹細胞の活性を制御していることが示された。唾液腺腫瘍の特徴的な組織構築は、細胞外基質が癌幹細胞の微小環境（ニッチ）として働くことによって作られることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Cancer stem cells (CSCs) are defined cells within a tumor that possess the capacity to self-renew and to induce the heterogeneous lineages of cancer cells that comprise the tumor. CSCs are related to histogenesis, morphogenesis and prognosis of the tumors. We investigated the relationship with morphogenesis based on the immunohistochemical distribution of CSCs. Salivary gland tumors, especially malignancies showed high density of the CSCs adjacent to the extracellular matrices. The finding suggested that the extracellular matrices control the activity of CSCs. In the morphogenesis of the characteristic salivary gland tumor, CSCs are considered to be activated by the extracellular matrices as a microenvironment (niche).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学、形態系基礎歯科学

キーワード：癌幹細胞、唾液腺腫瘍、組織構築、細胞外基質、ニッチ、免疫組織化学、CD44、CD133

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、分裂によって癌幹細胞として保持されるだけでなく、癌組織の増殖、転移、組織構築に関与する分化していく腫瘍細胞に分かれていく。すなわち、腫瘍実質細胞の中で自己複製能と多分化能を有する細胞である。免疫不全マウスに移植された癌幹細胞は高率に、元の腫瘍組織を再構成する。悪性腫瘍の治療でも、癌幹細胞を標的にすることでその効果が上がることが知られている。癌幹細胞の分子マーカーは動物種、悪性腫瘍の組織型によって異なる。研究開始当初は様々なヒト臓器での悪性腫瘍の癌幹細胞の同定がなされていたが、唾液腺腫瘍では見出されていなかった。また、唾液腺腫瘍は多彩な組織構築を示し、それが癌（腫瘍）幹細胞とどのような関連を持っているのか不明であった。組織構築については、病理診断を業務とする病理医にとっては興味のあるところで、癌幹細胞の組織構築における役割が解明されれば、組織形態を重視する病理診断にとっても有用である。

2. 研究の目的

本研究はヒト唾液腺悪性腫瘍での癌幹細胞の分子マーカーの決定、及び癌幹細胞と組織構築との関連を検討することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ヒト唾液腺悪性腫瘍での癌幹細胞のマーカーの決定

ヒト唾液腺悪性腫瘍の新鮮手術材料より、腫瘍細胞を遊離し、セルソーターにより候補となる癌幹細胞のマーカーを単独または複数組み合わせることで、細胞群を単離する。得られた細胞群はヌードマウスに移植し、その腫瘍形成速度を測定する。癌幹細胞の特徴である腫瘍形成能が最も高い細胞群を癌幹細胞とみなし、用いた抗体から癌幹細胞のマーカーを決定する。

(2) 癌幹細胞と組織構築との関連

凍結切片またはホルマリン固定、パラフィン包埋されたヒト唾液腺腫瘍についても retrospective に、癌幹細胞、腺上皮性細胞、筋上皮性細胞のマーカーを用いて免疫染色を行い、癌幹細胞の分化様式を検討する。癌幹細胞の分布から、唾液腺腫瘍の特徴的な組織構築の解析を行う。

4. 研究成果

「ヒト唾液腺悪性腫瘍での癌幹細胞のマーカーの決定」では、唾液腺悪性腫瘍の症例が少なかったこと、患者とのインフォームド・コンセントの問題等で、新鮮材料が入手できず、進展しなかった。

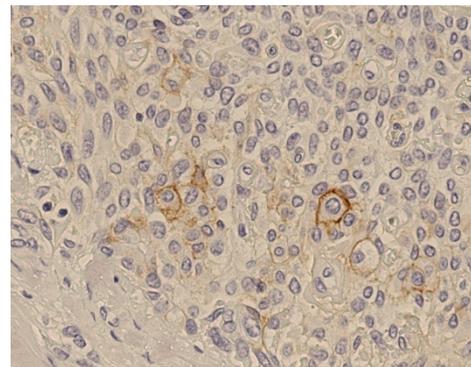
「癌幹細胞と組織構築との関連」では、悪性腫瘍と良性腫瘍でそれぞれ頻度の高い腺様嚢胞癌と多形腺腫で、免疫組織化学的に検討した。唾液腺腫瘍の癌（腫瘍）幹細胞のマーカーとしては、唾液腺と構築の近似している膵臓・乳腺の癌幹細胞マーカーである CD133, CD44 を用いた。対象としたヒト唾液腺腫瘍は多形腺腫と腺様嚢胞癌で、それぞれ良性、悪性腫瘍では頻度が高く、組織学的に腺上皮細胞と筋上皮細胞の区別がわかりやすい腫瘍である。CD133 が癌幹細胞以外でも、正常腺上皮の内腔面細胞膜にも局在を示すことがあるため、多形腺腫は主に CD44 にて検索した。また、CD44, CD133 陽性細胞全てが癌（腫瘍）幹細胞とみなされるか異論があるため、ここでは癌（腫瘍）幹細胞様細胞と表記するが、少なくとも、CD44, CD133 陽性細胞の中に高率に癌（腫瘍）幹細胞が分布していることは確実である。

(1) 多形腺腫

① 充実部

CD44 陽性腫瘍幹細胞様細胞は巣状の集団として点在、または孤在性に散在していた（図1）。充実部に含まれる腺上皮周囲の細胞にも陽性細胞がみられた。腺上皮自体には、頻度は少ないが小型の腺管で局在を示すものも認められた。

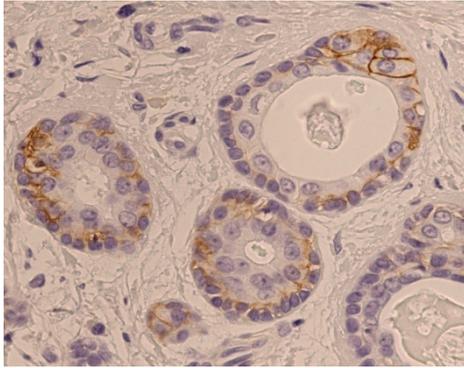
図1
CD44



② 管状部

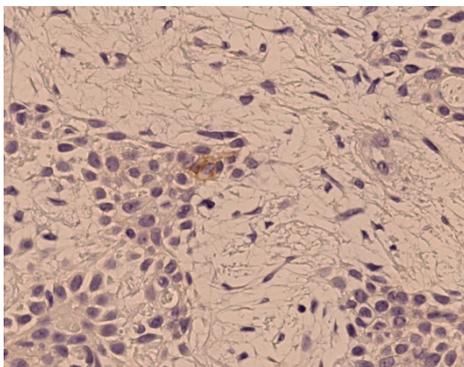
二層性を示す腺管構造では内腔側の腺上皮細胞層より、基底側の筋上皮細胞層に腫瘍幹細胞様細胞が分布していた（図2）。

図 2
CD44



③ 粘液部
粘液様基質に浮遊するような細胞ではほとんどが CD44 陰性であった (図 3)。

図 3
CD44



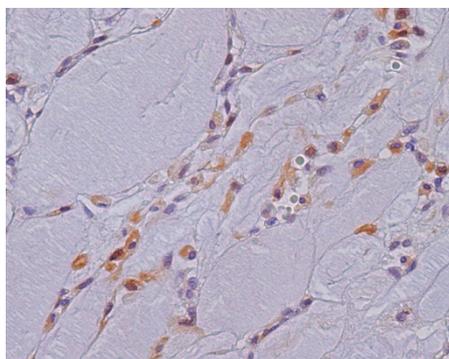
④ 軟骨様部、硝子様部、扁平上皮化生部
基質中の腫瘍細胞、扁平上皮化生の細胞も CD44 陰性であった。

(2) 腺様嚢胞癌

① 篩状部

偽嚢胞を取り囲む細胞に癌幹細胞様細胞がみられたが、真の腺管を形成する腺上皮細胞はほとんどみられなかった。特に、篩状構造が細胞外基質の増量に伴って網状になり、基質に浮遊するように癌幹細胞様細胞がみられた (図 4)。

図 4
CD133



② 管状部

基質中にみられる二層性構造が不明瞭な小

型の腺管で癌幹細胞様細胞の集簇がみられ (図 5)、多形腺腫と同じように、二層性が明確な管状構造では基底側の筋上皮細胞層に癌幹細胞様細胞が認められた (図 6)。

図 5
CD133

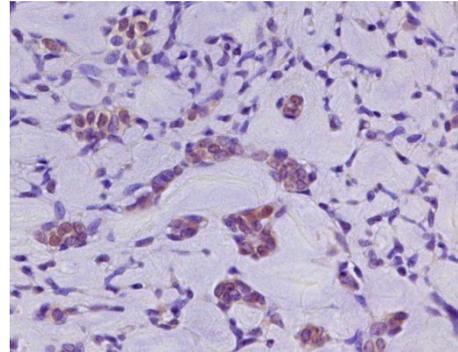
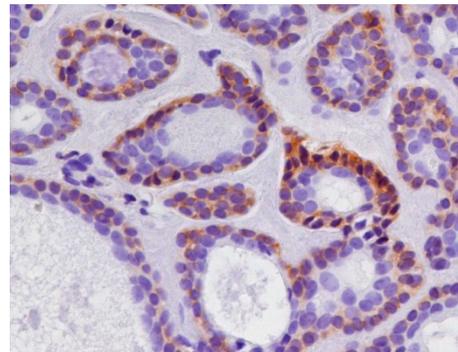


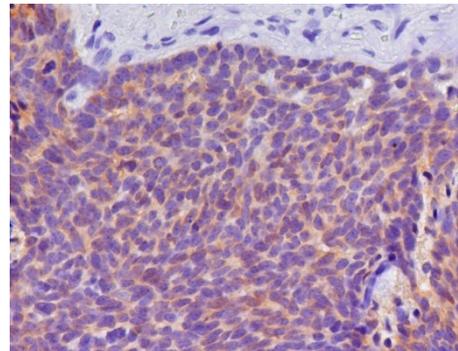
図 6
CD44



③ 充実型

充実性胞巣では、びまん性に多数の癌幹細胞様細胞が胞巣内にみられた (図 7)。神経侵襲部や、頸部リンパ節の転移巣にも多数の癌幹細胞様細胞がみられた。

図 7
CD44



また、腫瘍周囲の正常唾液腺では、唾液腺導管、特に介在部導管で CD44 陽性細胞が認められた。また、口腔粘膜上皮では基底細胞で強い局在がみられた。正常唾液腺や口腔粘膜上皮ではこれらの位置に幹細胞が存在していることを示している。

【総括】

癌 (腫瘍) 幹細胞は唾液腺腺様嚢胞癌では多形腺腫よりその密度が高かった。これは両者の増殖能や悪性度を反映していると考えら

れる。

多形腺腫、腺様嚢胞癌では管状部の基底側に癌（腫瘍）幹細胞が位置している。これは両腫瘍において、筋上皮細胞が腫瘍増殖、腫瘍の組織型性に深く関わっていることを示唆している。

腺様嚢胞癌の組織形成において、管状構造の基底側の筋上皮細胞が増殖し、細胞外基質の局所的な貯留に伴って、偽嚢胞を作り、篩状構造を形成するが、この際、癌幹細胞は偽嚢胞を囲み、細胞外基質に接する位置に存在している。基質の過剰な形成に伴って、篩状構造は網目状、さらには基質に腫瘍組織が浮遊した状態になるが、基質に接する部位や浮遊した細胞塊に幹細胞は保たれる。このような癌幹細胞の細胞塊から再び管状構造が形成される。管状構造の筋上皮細胞の増殖の際、細胞外基質の形成がきわめて少ない場合は、充実性となるが、このときは多数の癌幹細胞が残っている。

癌幹細胞は神経浸潤やリンパ節転移でも重要な役割があることが示唆された。

本来、唾液腺腫瘍は多彩な細胞外基質を形成することが知られているが、特に、腺様嚢胞癌のような悪性腫瘍では細胞外基質と癌幹細胞は密着して存在しており、両者間のシグナリングで癌幹細胞の活性が制御されていることが考えられた。一般的に、唾液腺以外の悪性腫瘍でも癌幹細胞の微小環境（ニッチ）が癌幹細胞の動態を制御していることが示されている。唾液腺悪性腫瘍でも細胞外基質がニッチとしての作用があることが考えられ、今後は癌幹細胞だけではなく、ニッチとしての細胞外基質との関係も解析する必要がある。

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1件）

- ① Fujita S, Ikeda T: Cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: relationship with morphogenesis of histological variants. J Oral Pathol Med (査読有) 41(2012), 207-213

〔学会発表〕（計2件）

- ① 藤田修一、池田 通: 多形腺腫と腺様嚢胞癌での腫瘍幹細胞の分布の相違: CD44 による免疫組織化学的解析。第100回日本病理学会総会、2011年4月30日 横浜
- ② 藤田修一、池田 通: 唾液腺腺様嚢胞癌でのCD133を用いた癌幹細胞の免疫組織化学的解析。第99回日本病理学会総会、

2010年4月28日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田修一 (FUJITA SHUICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 00181355

(2) 研究分担者

池田通 (IKEDA TOHRU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00211029

(H21→H22, 23: 連携研究者)

柴田恭明 (SHIBATA YASUAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 80253673

(H21→H22, 23: 連携研究者)

(3) 連携研究者

山田慎一 (YAMADA SHIN-ICHI)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号: 50380853