

## 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25年4月18日現在

機関番号：17301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21592558  
 研究課題名（和文） 低酸素環境におけるSP細胞の機能と分子標的治療に関する基礎的研究  
 研究課題名（英文） Study of SP cells under hypoxic conditions and molecular targeted therapy  
 研究代表者  
 川崎 五郎（KAWASAKI GORO）  
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：60195071

研究成果の概要（和文）：口腔癌細胞株より SP 細胞を分離した。SP 細胞は、高悪性度を示しており 5-FU に対する感受性が低下していた。低酸素環境下ではさらに悪性度の増加がみられた。病理組織学的検討では HIF-1 が悪性度と相関し、特に mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF 経路の活性化と悪性度が高い相関性が認められた。口腔癌細胞株に mTOR 阻害薬を加えたところ増殖能および浸潤能の抑制が認められた。低酸素環境下で細胞を培養し HIF-1 $\alpha$  の活性化を認めた。低酸素環境下における mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF 経路に対する mTOR 阻害薬の効果を調べたところ、発現の抑制が認められた。

研究成果の概要（英文）：Side population (SP) cells were isolated from oral cancer cell lines. SP cells possessed high malignant ability and demonstrated more drug resistance to 5-FU, as compared with non-SP cells. Under hypoxic conditions, HIF-1 expressions was associated with pathological malignancy grades, particularly activation of mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway was associated with pathological malignancy grades. Oral squamous cell carcinoma cell lines were treated with mTOR inhibitor, thereafter carcinoma cells revealed cell growth inhibition and reduced invasion. Under hypoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  was activated. The expression of mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway under hypoxic conditions was decreased by the treatment with mTOR inhibitor.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2011 年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2012 年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：7407・2

キーワード：SP 細胞，低酸素環境，扁平上皮癌細胞

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始までに代表研究者は、抗癌薬の感受性に直接関わる遺伝子として、新規 p53 タ

ーゲットである p53R2 に注目し、口腔癌治療における術前化学療法への感受性予測因子と

なり得ることを論文発表していた。この p53R2 は、細胞が DNA ダメージを受けると誘導され、DNA 修復および合成に必要な dNTP 供給を促進させるといわれており、p53R2 を RNA interference (RNAi)法を用いて発現抑制することにより、口腔癌細胞の増殖抑制および 5-FU 感受性増強が可能になることも論文発表していた。また、別の実験系では、5-FU の重要な代謝酵素である TS, DPD および OPRT の遺伝子および蛋白発現についても解析を行い、これらの酵素の発現と抗腫瘍効果についても研究を行っていた。これらの研究の中で、上記遺伝子および蛋白の発現あるいは抑制による抗腫瘍効果および癌細胞浸潤抑制効果が明らかとなったが、一方でその効果は細胞個々によってさまざまな違いがあることもわかってきた。そこでこのような同じ細胞株（細胞集団）の中にあつて、細胞個々により特性が異なる背景には、がん幹細胞を多く含む SP 細胞の関与があると考えるにいたった。一方、癌生物学における低酸素環境の意義は、近年明らかになりつつあり、その重要性が益々認識されている。癌細胞は、生体内で様々なレベルの低酸素状態におかれていたが、癌の増殖に伴い中心部の癌細胞が低酸素環境になると、転写因子 HIF-1 が活性化し血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生および放出が促進され血管新生が開始される。このことにより、癌細胞はさらに増殖能を獲得するが、特に低酸素環境において活動的な細胞は、増殖能や浸潤能を高め悪性度を増していることも報告されている。そのため、低酸素環境における癌細胞と抗癌薬の薬剤抵抗性には相関性があるという報告もなされている。以上より、研究代表者は、低酸素環境下における SP 細胞が癌治療にける重要なターゲットとなると予測し、これらをターゲットとした治療法の開発を行いたいと考えた。

## 2. 研究の目的

癌細胞を低酸素環境下で培養し、SP 細胞と非 SP 細胞の細胞生物学的相違の検討を行う。すなわち、浸潤能や増殖能を調べ、化学療法感受性および放射線感受性の試験を行い、特にそれらに関係する遺伝子に関する研究を行う。同時に、これまで研究を行ってきた転移に関する遺伝子である MTA1, 5-FU の代謝関連酵素である TS, DPD, OPR および癌抑制遺伝子ファミリーである p53R2 の役割について検討を行う。さらに、癌細胞の低酸素環境下での細胞増殖および浸潤との関与が示唆されている細胞内リン酸化酵素遺伝子である AKT ファミリー、mTOR および HIF1 に関する研究を行いあらたな分子標的治療のターゲットとして重点的に研究を行う。以上を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

舌扁平上皮癌細胞株 SAS, HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC19, SCC25 および OSC20, 歯肉扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 を低酸素環境下にて培養した。上記各細胞の通常環境下での細胞懸濁液を DNA 結合色素 Hoechst33342 で染色した後、2 つに分注し、一方に Hoechst の排出に関与するとされる ABC トランスポーターの阻害剤である Verapamil を添加した。その後、死細胞を識別するため Propidium iodide (PI) を加え、フィルタリングを行った。解析とソーティングを Fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて行い、SP 細胞と非 SP 細胞に分離した。低酸素環境下でも同様の研究を行った。ソーティングされた SP 細胞と非 SP 細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、SP 細胞において特異的に高発現あるいは低発現している分子について検索した。Fold change が認められた分子を、AKT, mTOR あるいは HIF1 のカスケードに関与す

る可能性がある分子に絞り込みを行った。その各分子について siRNA や発現ベクターを用いて、AKT, mTORあるいはHIF-1との関係を検索し、治療分子としての有効性について検討した。

ソーティングした SP 細胞および非 SP 細胞について、細胞生物学的特性の比較を行う。まず、細胞増殖能については MTT アッセイ、癌細胞浸潤能については Matrigel invasion アッセイを用いて評価した。さらに、5-FU の感受性について、MTT アッセイで評価し、FACS を用いた SP 細胞比率の変化を検索することにより評価した。mTOR 阻害薬である Everolimus についても、がん細胞効果と低酸素環境下での効果を調べるために検討した。

また、免疫組織化学的に、扁平上皮癌症例のパラフィン切片を用いて VEGF-mTOR-HIF 経路の発現を確認し、臨床的ならびに病理組織学的因子との相関についても検討した。

#### 4. 研究成果

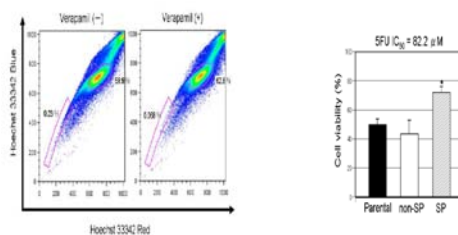
(1) 1) Hoechst33342 による染色で SCC25 細胞において最も細胞分画が得られた。SP 細胞は全細胞のうち 0.23% を占めており、選択的 ABPC トランスポーターインヒビターであるベラパミルにより処理することにより、SP 細胞の発現抑制が認められた。分離した SP 細胞と非 SP 細胞を SFM 培地にて培養したところ、SP 細胞においては sphere の形成が認められた。

2) 幹細胞マーカーの発現を半定量 RT-PCR にて測定したところ、SP 細胞において有意に ABCG2, Oct-4 および EpCAM の高い発現が認められた。

3) MTT アッセイによる細胞増殖能の結果では、SP 細胞が有意に高い増殖能を示していた。

4) コロニー形成を調べた結果、SP 細胞において有意にコロニー形成能が増加してい

た。



5) SCC25 細胞から SP 細胞を分離した。それらの細胞を用いて 5-FU の感受性を調べた。SP 細胞は、対照群に比較して有意に 5-FU の感受性が落ちていた。

(2) mTOR-HIF-1 $\alpha$  経路に関する組織学的検討

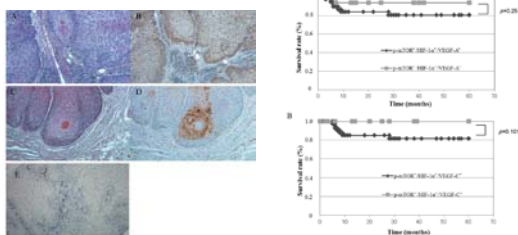
1) VEGF-A および VEGF-C は各々口腔癌 120 症例中 76 例および 81 例に発現が認められた。それらは、CD34 と発現が相関していた。一方 mTOR は 120 例中 49 例に発現がみられ、HIF-1 $\alpha$  は、120 例中 85 例に発現が認められた。

2) VEGF と臨床病理学的因子との相関においては、VEGF-A は腫瘍の大きさや年齢との相関が認められたが、VEGF-C は各種因子との間に相関性が認められなかった。浸潤様式との相関性においては、VEGF-C に関しては相関が認められた。

3) mTOR, HIF-1 $\alpha$  発現と臨床病理学的因子との関係。mTOR はどのような因子との間にも相関性がみられなかったが、HIF-1 $\alpha$  の発現に関しては腫瘍の大きさおよびリンパ節転移との間に相関性が認められた。浸潤様式との関係については、どちらの発現も相関性がみられなかった。

4) mTOR-HIF-1 $\alpha$  経路について。mTOR-HIF-1 $\alpha$  経路の活性化は PCNA 発現と相関性がみられた。5) mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF-A 経路について。mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF-A 経路の活性化は腫瘍の大きさ、浸潤度およびリンパ節転移と相関していた。しかしながら mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF-A および mTOR-HIF-1 $\alpha$

-VEGF-C の活性化と、カプランマイヤー法による予後との相関は認められなかった。



(3) 培養細胞における mTOR 阻害薬の効果について

1) 実験方法で挙げた口腔癌細胞株に mTOR 阻害薬を加え、MTT 法による細胞増殖の測定を行った。すべての細胞株において、濃度依存的に増殖能が抑制されていた。中でも SAS が最も強く抑制された。SAS について、リン酸化および非リン酸化の mTOR, p70<sup>S6K</sup>, 4E-BP1 についてウエスタンブロットで抑制の検討を行ったところ、リン酸化されたものについては全て濃度依存的に抑制が確認された。細胞周期に関しては、mTOR 阻害薬により G0-G1 にわずかな増加がみられた。S 期および G2-M 期においては変化がみられなかった。

2) SAS 細胞における細胞遊走能と浸潤能に関する mTOR 阻害薬の効果について。濃度依存的に SAS 細胞の遊走能の減少がみられた。すなわち、mTOR 阻害薬の量が、1nM, 10nM および 100nM で、各々 68%, 51.8% および 44.1% であった。細胞浸潤能についても、対照群の浸潤能が 58.9% であったのに対し、mTOR 阻害薬の量が、1nM, 10nM および 100nM で、各々 35.3%, 19.1% および 16.7% であった。

3) 低酸素環境下における mTOR 阻害薬の効果。低酸素環境下で上記の癌細胞を培養したところ、HIF-1 の活性化が認められた。HIF-1 経路に対する mTOR 阻害薬の効果について検討した。HIF-1, VEGF-A および VEGF-C の発現において、mTOR 阻害薬の濃度依存的

にその発現が抑制されていた。低酸素環境下でも mTOR 阻害薬の効果が認められた。

## 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 2 件)

1. Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S., Yoshitomi, I., Kawano, T., Yonezawa, H., Rokutanda, S., Naruse, T., Umeda, M. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral Oncol* 47, 855-860, 2011

2. Kawasaki, G., Yoshitomi, I., Yanamoto, S., Yamada, S., Mizuno, A., Umeda, M. Expression of Thymidylate Synthase and Dehydropyrimidine Dehydrogenase in Primary Oral Squamous Cell Carcinoma and Corresponding Metastases in Cervical Lymph Nodes: Association with the Metastasis Suppressor CD82. *Anticancer Res* 31, 3521-3526, 2011

[学会発表] (計 2 件)

1. 鳴瀬智史, 川崎五郎, 柳本惣市, 六反田賢, 水野明夫, 梅田正博: 口腔扁平上皮癌における mTOR 経路の発現について. 日本口腔科学会学術集会, 東京, 2011 年 4 月

2. 鳴瀬智史, 川崎五郎, 柳本惣市, 山田慎一, 吉富 泉, 六反田賢, 川北晃子, 梅田正博: mTOR 阻害薬 everolimus の口腔扁平上皮癌細胞株に対する抗腫瘍効果について. 日本口腔外科学会総会・学術大会, 横浜, 2012 年 10 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎五郎 (KAWASAKI GORO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：60195071

(2) 研究分担者

該当なし