

## 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 1 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592564

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌幹細胞の同定および癌幹細胞に対する治療戦略

研究課題名（英文） Characterization of cancer stem cells for oral squamous cell carcinoma cells and its application for treatment of oral carcinoma

## 研究代表者

水口 純一郎（MIZUGUCHI JUNICHIRO）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20150188

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株（SCC9, SCC25）を EGF(epidermal growth factor) および FGF(fibroblast growth factor) 添加 DMEM/F12 培地で 2～3 週間培養すると、複数のコロニーが形成された。このコロニーを構成している細胞の表面マーカーを調べてみると、CD24 陰性/CD44 陽性(CD24-/CD44+)であり、細胞株の約 6% を占めていた。このマイナー集団は対照に比べて化学療法剤に対して抵抗性を示し、また浮遊細胞塊を形成する能力が亢進していたことから、癌幹細胞であると推測された。さらに、活性化型 Akt を高発現させた細胞株では CD24-/CD44+ 集団の割合が増加しており、また浮遊細胞塊形成能が亢進していることから、活性化 Akt が癌幹細胞の形質の獲得・維持に関わっていると推測された。Akt シグナル伝達系を標的にした分子標的療法は口腔扁平上皮癌の治療戦略を考える上で有用な情報を提供するであろう。

## 研究成果の概要（英文）：

Several colonies were found when oral squamous cell carcinoma cells were cultured with DMEM/F12 medium in the presence of epidermal growth factor and fibroblast growth factor for 2 or 3 weeks. Cells prepared from the colony were CD24-negative and CD44-positive (CD24-/CD44+), as assessed by flow cytometry using monoclonal antibodies. The CD24-/CD44+ cells constituted only a minor population (around 6%) of original cell line and showed resistance to chemotherapeutic agent (carboplatin) and increased capacity to form colony, compared with controls. Thus, this CD24-/CD44+ minor population behaves like cancer stem cells for SCC. The increased proportion of CD24-/CD44+ cells and capacity of colony formation were detected in SCC25 cells over-expressing constitutively active form of Akt, compared with control vector alone, suggesting that Akt activation pathway participates in the acquisition and/or maintenance of cancer stem cells for oral carcinoma cells. Thus, Akt signaling pathway would be a new target for therapeutic intervention of patients with oral squamous cell carcinoma.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔扁平上皮癌、癌幹細胞、治療戦略

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌に対する手術療法、化学療法、放射線治療などの進歩によって、ある程度の治療成績の向上が認められているが、依然としてこれらの治療法に抵抗性を示す症例も存在しており、新規治療法の開発が求められている。近年、正常幹細胞との類似性から、増殖性悪性腫瘍は少数の癌幹細胞から生み出されているというモデル（癌幹細胞仮説）が提唱されているが、口腔扁平上皮癌の分野における癌幹細胞に関する知見は未だ乏しい現状である。

### 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌幹細胞株から癌細胞を濃縮・純化する方法を確立し、癌幹細胞の生物学的・生化学的な特徴を明らかにする。次に、これらの特徴・性状を基にして、新規治療法の開発を推進するための基礎的な情報を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株の維持・培養  
口腔扁平上皮癌細胞株は 10%ウシ胎児血清, 2.5 mM L-glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate, 15 mM HEPES, 1200 mg/ml sodium bicarbonate, および 400 ng/ml hydrocortisone を添加した DMEM/F12 培地で維持した。

(2) 癌幹細胞（候補）の濃縮・純化  
浮遊細胞塊（sphere）形成法および化学療法剤抵抗性を指標として、口腔扁平上皮癌細胞株から癌幹細胞を濃縮・純化した。浮遊細胞塊形成法では、口腔扁平上皮癌細胞株を非付着性シャーレに分注し、至適濃度の EGF, FGF, 2.5 mM L-glutamine, および 1200 mg/l sodium bicarbonate 添加 DMEM/F12 培地を用いて 2-3 週間間培養した。

(3) フローサイトメーターを用いた細胞表面マーカーの決定  
シャーレの中で形成されてくるコロニーをピペットで採取し、メッシュを通過させることによって浮遊単個細胞を得た。次に、抗-CD24 抗体、抗-CD38 抗体、抗-CD44 抗体、抗-CD90 抗体、抗-CD133 抗体、抗-CD184 抗体と反応させ、フローサイトメーター法を用いて、細胞表面分子の発現の有無を決定した。

(4) 癌幹細胞の化学療法剤に対する感受性  
癌幹細胞を種々の濃度の化学療法剤（カルボプラチン）存在下に数日間培養し、MTT 測定

法を用いて生存している癌細胞の程度を評価した。

(5) Akt 高発現 SCC25 細胞株の樹立  
定法に従って、野生型および活性化型 Akt を発現ベクターに挿入し、SCC25 細胞株に移入した。G418 選択培地を用いて、トランスフォーマントを得た。Akt の発現レベルはウエスタンブロット法を用いて確認した。Akt(308) および Akt(473) のリン酸化は特異抗体を用いて検討した。

(6) 免疫不全マウスを用いた腫瘍形成  
種々の細胞数の腫瘍細胞を免疫不全マウス (Rag2 欠損マウス) の皮下に投与し、腫瘍の形成の有無を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 浮遊細胞塊形成法による癌幹細胞の純化  
扁平上皮癌細胞株 (SCC9, SCC25) ( $5 \times 10^3$ ) を非付着性ディッシュに分注し、EGF および FGF 添加 DMEM/F12 培地で 2-3 週間培養すると、コロニー形成が観察された (図 1)。コロニーを採取し、単個浮遊細胞を作製し、細胞表面マーカー、化学療法剤に対する感受性、および in vivo 腫瘍形成能について検討した。

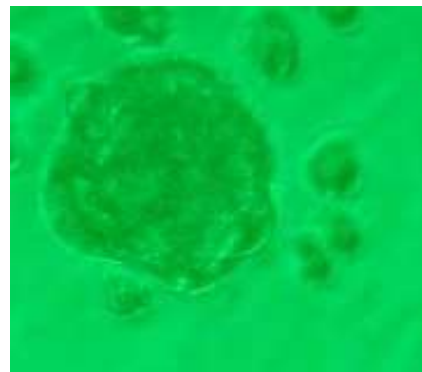


図 1. SCC25 由来の浮遊細胞塊

(2) 癌幹細胞の細胞表面マーカー  
口腔扁平上皮癌細胞株由来の浮遊細胞塊を構成している細胞の表面マーカーをフローサイトメーター法によって解析した。方法の欄に記載されているような種々の抗体を用いて検討したところ、CD24 および CD44 の 2 重染色によって興味深いデータが得られた。すなわち、SCC9 および SCC25 由来の浮遊細胞塊から得られた細胞における CD24-negative/CD44-positive を示す細胞の割合を検討してみたところ、それぞれ 50%、

90%であった。口腔扁平上皮癌細胞株 SCC9 および SCC25 における CD24/CD44 発現レベルを検討すると CD24-negative/CD44-positive (1%, 6%), CD24-high/CD44-positive (68%, 55%)、および CD24-low/CD44-positive (14%, 20%)であった。これらの事実より、マイナーな細胞集団を構成している CD24-negative/CD44-positive 癌細胞が口腔癌幹細胞であると推測される。

(3) 癌幹細胞の化学療法剤に対する感受性乳癌や膵臓癌由来の癌幹細胞は化学療法剤に対して抵抗性を示すことが知られている。そこで、浮遊塊由来の細胞を種々の濃度のカルボプラチンで処理し、生細胞を検討したところ、SCC25 由来の CD24-negative/CD44-positive 癌幹細胞は野生株に比べて化学療法剤抵抗性を示した。しかしながら、SCC9 由来 CD24-negative/CD44-positive では野生株と比べて感受性に違いは認められなかったことから、癌幹細胞には多様性が存在している可能性が示唆された。

SCC25 癌細胞株におけるマイナーな細胞集団 (CD24-CD44-positive) が化学療法剤に対して抵抗性を示す、癌幹細胞であるという可能性をさらに追求するために、SCC25 細胞株をカルボプラチンで処理し、細胞表面マーカーを検討したところ、CD24-negative/CD44-positive 細胞群が濃縮されていたことから、SCC25 由来の癌幹細胞のマーカ―は CD24-negative/CD44-positive であると示唆された。

(4) 構成活性化型 Akt を高発現している SCC25 細胞株における CD24/CD44 発現 CD24/CD44 発現パターンに影響を及ぼしている細胞内シグナル分子を検索している過程で、活性化型 Akt を高発現している SCC25 細胞株では CD24-negative/CD44-positive 細胞の割合がコントロールに比べて4%から25%に増加していることが示された。しかしながら、野生型 Akt を高発現している細胞ではコントロールとの間に優位差は認められなかった。活性化型 Akt の高発現細胞株では Akt (308) および Akt (473) のリン酸化が対照細胞株に比べて亢進していることから、活性化型 Akt が細胞内で機能していることが確認された。これらの事実は、活性化型 Akt 高発現細胞では癌幹細胞 (CD24-negative/CD44-positive) の割合が増加しているということを示唆している。

(5) 活性化型 Akt を高発現している SCC25 細胞株の浮遊細胞塊形成能

上記の結果より、SCC25 細胞株における癌幹細胞の形質獲得・維持に Akt 活性化が関わ

っている可能性が示唆された。そこで、活性化型 Akt 高発現細胞株および対照細胞株を FGF/EGF 添加培地で培養し、コロニー形成能を検討したところ、活性化型 Akt 高発現細胞では対照細胞株に比べて、コロニー数が増加していることが示された。これらの事実より、活性化 Akt が口腔扁平上皮癌幹細胞の性状の維持・獲得に関わっていると推測された。

(6) 免疫不全マウスにおける腫瘍形成

SCC25 癌細胞では CD24-negative/CD44-positive 細胞群が癌幹細胞として機能していると推測された。癌幹細胞の特徴として、自己複製能、化学療法剤に対する抵抗性、成熟癌細胞への分化能、転移能を上げることができ、これらの性質を *in vivo* で確認する方法として腫瘍形成法が用いられている。

SCC 細胞株における腫瘍形成能を検討する第1段階として種々の腫瘍細胞 ( $5 \times 10^6$  および  $10 \times 10^6$ ) を免疫不全マウス (Rag2 欠損マウス) の皮下に投与した。しかしながら、3ヶ月間観察した限りでは、いずれの場合にも腫瘍形成は認められていない。腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植する方法による腫瘍形成には、腫瘍細胞の形質が関わっており、SCC25 細胞株ではこれらの因子が欠落している可能性も考えられる。一方、Rag2 欠損マウスでは成熟 T 細胞および B 細胞が欠如しているが、抗腫瘍作用を示す NK 細胞機能などが保持されており、SCC25 癌幹細胞の腫瘍形成能の感受性に影響を与えている可能性は否定できない。今後、活性化型 Akt を高発現している癌 (幹) 細胞の移植および新たな免疫不全マウスなどを用いて、さらに検討を重ねたい。

(7) 癌細胞および癌幹細胞の増殖、細胞死などに影響を及ぼす細胞内シグナル伝達分子の検討:

今回の解析により、Akt 活性化経路が口腔癌幹細胞形質の獲得・維持に関わっていることが明らかになった。細胞内シグナル伝達経路は複数のネットワークを構築し、これらのネットワーク間の相互作用によってさらに上位のネットワークが構築され、細胞の運命が決定されると考えることができる。そこで、Akt シグナル伝達経路によって調節を受けている FOXO シグナル経路、さらに PKC- $\delta$  → ASK/JNK 経路の腫瘍増殖や細胞死に及ぼす影響を検討した。また、腫瘍の増殖や発育は免疫系、特にサイトカインの影響を受けており、それらの特徴・性状について主に *in vitro* の解析を行った。

本プロジェクトでは、口腔扁平上皮癌細胞から癌幹細胞 (候補) を純化する方法を確立し、その性状 (細胞表面マーカー、化学療法

剤感受性、癌細胞への分化、細胞増殖速度など)について明らかにすることができた。また、口腔扁平上皮癌幹細胞の特質の獲得・維持にはAkt活性化シグナル伝達経路が関わっていると推測された。現時点では、in vitroでの解析結果に留まっているが、Aktシグナル伝達経路を阻害すること、あるいはこれらのシグナル伝達系の干渉と従来の化学療法剤や放射線治療法の併用などによって、癌幹細胞の制御、つまり口腔扁平上皮癌細胞のコントロールが可能になると期待できる。

#### 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8件)

- ① Noutomi T, Itoh M, Toyota H, Takada E, and Mizuguchi J. (2009) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptotic cell death through c-Jun NH2-terminal kinase activation in squamous cell carcinoma cells. *Oncol Rep*, 査読有、22: 1169-72 DOI:10.3892/or\_00000551
- ② Satomi T, Chiba H, Ushida T. (2009) Antitumor effect of Docetaxel-containing liposomes in a murine tumor model. *Oral Oncology 3 (proceeding)*:190-191
- ③ Furuhata M, Takada E, Noguchi T, Ichijo H, Mizuguchi J. (2009) Apoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1 mediates apoptosis through activation of JNK1 following engagement of membrane immunoglobulin. *Exp Cell Res*, 査読有、315:3467-3476
- ④ Morishima N, Mizoguchi I, Takeda K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. (2009) TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、386:105-110
- ⑤ Yoshimoto T, Morishima N, Okuma M, Chiba Y, Xu M, Mizuguchi J. (2009) Interleukins and cancer immunotherapy. *Immunotherapy 1*, 査読有、1:825-844
- ⑥ Mizuguchi J (2009) A double-edged sword in B-cell-targeted therapy for inflammatory diseases. *Exp Rev Clin Immunol*, 査読有り、5:283-90
- ⑦ Tsuzuki M, Satomi T, Chiba H. (2010) Clinical significance of expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in oral squamous cell carcinoma. *Oral Med Pathol*, 査読有、14:135-141

- ⑧ Satomi T, Watanabe M, Kaneko T, Matsubayashi J, Nagano T, Chiba H. (2011) Radiation-induced malignant fibrous histiocytoma of the maxilla. *Odontology*, 査読有、99:203-208 DOI:10.1007/s10266-011-0001-x

[学会発表] (計8件)

- ① Mizuguchi J, Takada E, Hata K, Furuwata M. (2009) ASK-JNK signaling pathway mediates apoptosis through reactive oxygen species following engagement of membrane immunoglobulin in WEHI-231 B lymphoma cells. (2009) 17th ECDO Euroconference, Institut Pasteur, Paris, France
- ② 清水本武, 佐藤真友美, 小倉潔, 武田康隆, 水口純一郎, 善本隆之 (2009) IL-27による組織適合抗原の発現上昇と抗腫瘍機構の解析 第68回日本癌学会学術総会(横浜)
- ③ 秦喜久美, 高田栄子, 水口純一郎 (2009) BCR刺激誘導性増殖抑制におけるFOXO3aの働き / FOXO3a mediates the G1 arrest through upregulation of B cell translocation gene (Btg) following engagement of membrane immunoglobulin in WEHI-231 B lymphoma cells. 第39回日本免疫学会総会(大阪)
- ④ 矢那瀬紀子, 水口純一郎 (2010) インターフェロン $\alpha$ を介するアポトーシス誘導におけるプロテインキナーゼC(PKC $\zeta$ )の役割 第19回日本Cell Death学会(名古屋)
- ⑤ 清水本武, 佐藤真友美, 小倉潔, 武田康隆, 水口純一郎, 善本隆之 (2010) IL-27の抗腫瘍作用におけるマイクロファージの役割 第69回日本癌学会学術大会(大阪)
- ⑥ Odan N, Fujikawa K, Toyoda J, Hasegawa O, Abukawa H, Watanabe M, Satomi T, Kaneko T, Matsuo A, Chikazu D. (2010) Clinical application of the polyglycolic acid sheet after resection of the tongue squamous cell carcinoma; 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. (Kuala Lumpur, Malaysia)
- ⑦ Mizuguchi J, Hata K. (2010) Requirement for Arginine Methylation in FOXO3a-mediated G1 Arrest of WEHI-231 B Lymphoma Cells upon Engagement of B Cell Receptor for Antigen. 18th Euroconference on Apoptosis, Ghent, Belgium.
- ⑧ Watanabe M, Kohno M, Hasegawa O, Abukawa H, Satomi T, Kaneko T, Matsuo A, Chikazu D. (2011) Effects of metabolic enzymes associated with fluoropyrimidine sensitivity in oral squamous cell carcinoma. IA00 3rd World Congress. Singapore.

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水口 純一郎 (MIZUGUCHI JUNICHIRO)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20150188

### (2) 研究分担者

該当者なし

### (3) 連携研究者

高田 栄子 (TAKADA EIKO)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50110903

秦 喜久美 (HATA KIKUMI)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30287156

豊田 博子 (TOYOTA HIROKO)  
東京医科大学・医学部・助手  
研究者番号：80468660

千葉 博茂 (CHIBA HIROSHIGE)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80105478

松尾 朗 (MATSUO AKIRA)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70229417

里美 貴史 (SATOMI TAKASHI)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70276921

渡辺 正人 (WATANABE MASATO)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40349460