

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6月26日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592248

研究課題名（和文） 癌幹細胞と微小環境（ニッチ）および間質線維芽細胞（CAF）の相互作用に関する研究

研究課題名（英文）A study on interaction of cancer stem cells and microenvironment (niche) and stromal fibroblasts (CAF)

研究代表者

森寺 邦康（MORIDERA KUNIYASU）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60461076

研究成果の概要（和文）：

SCC-25, OSC-19, OSC-20の細胞株でSP細胞を分離した。患者から同意を得た摘出検体3体の内1体でSP細胞を確認した。

CD44陽性の手術検体はYK分類の4Dが多かった。CD44陽性であってもSP細胞を分離出来ない検体もありCD44のみが幹細胞のマーカーとならない事が確認出来た。

分離したSP細胞を無血清培地にて培養するも細胞増殖の速度が遅く、全ての細胞株で継代が出来ていない。細胞は約1ヶ月程度、死滅していないが、人正常細胞以上に発育速度が遅い事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We divided SP cells with cell line of SCC-25, OSC-19, OSC-20. We confirmed SP cells with one of three extraction specimens which obtained its consent from the patients.

The CD44-positive surgery specimen had much 4D of the YK classification.

We were able to confirm that there was the specimen which couldn't divide SP cells even if CD44 was positive, and only CD44 did not become the marker of stem cells.

The speed of the cell proliferation is slow, and there is not passage with all cell line though it cultures discrete SP cells in a serum-free medium. The cells did not perish for approximately around one month, but it developed that a growth rate was slow than person normal cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医薬歯学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌治療において、化学放射線療法や

手術法などの改善により、局所制御率は飛躍的に向上したものの、5年生存率はわずかし

か上昇していない。その主たる要因は、従来の抗癌治療によっても残存し、治療抵抗性を示す悪性度の高い癌細胞による再発や転移の制御不能によると考えられる。

(2)そのような悪性度の高い癌細胞に対する1つの考え方として、近年自己複製と多分化能をもち組織再生能を有する癌幹細胞(Cancer stem cell)が注目されるようになった。癌幹細胞は、多剤耐性遺伝子MDR-1であるABCトランスポーターによる薬剤排出機構を有しており、抗癌剤や放射線に抵抗性を示し、再発や転移に関与することが示唆されている。

(3)癌を撲滅するためには、癌細胞を標的とした治療が必須であると考えられ、すでに白血病、大腸癌、脳腫瘍、乳癌等では癌幹細胞の存在が報告されているが、口腔癌では充分明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1)癌の治療抵抗性は癌幹細胞の有する2つの異なる機構によることが最近の報告で示唆される。1つは癌幹細胞が抗癌剤排出能力、中和能力、DNA修復能力などを有している点であり、もう1つは癌幹細胞が正常組織幹細胞と同様に特別な微小環境(ニッチ)内で休眠状態として存在しているため、増殖する細胞を標的とする従来の癌治療法は効果が無い点である。癌幹細胞を特異的に殺傷する方法の開発には癌幹細胞の性状やそのニッチを正確に理解する事がきわめて重要である。しかし口腔癌における癌幹細胞の研究ははじまったところで、癌幹細胞の存在も十分に明らかになっておらずニッチについては全く明らかになってない。このため癌幹細胞およびニッチを正確に理解する事がきわめて重要である。

(2)癌幹細胞の分離・同定を行い細胞生物学的、遺伝子学的解析を行い、癌幹細胞特異的治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1)口腔扁平上皮癌由来培養細胞における癌幹細胞の分離
口腔扁平上皮癌培養細胞(SCCKN, SCCTF, KB, OSCなど)からHoechst33342を用いたFACSによりSP(side population)細胞の分離を行う。さらに、ブラパミル処理によりSP細胞であることを同定する。

(2)ヌードマウスにおける腫瘍形成能の検討
癌幹細胞は、10,000個程度の少数の細胞移植によってヌードマウスに腫瘍を形成することができる。種々の数のSP候補癌幹細胞を

ヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を検討する。

(3)血清含有培養液での細胞分化の検討
癌幹細胞はbFGF, EGFを含む無血清培地においてその性質を維持することができるが、ウシ胎児血清を含む培養液に換えて培養した場合、扁平上皮癌幹細胞ではケラチノサイトに分化することが知られている。そこで細胞形態と分化度の関連について、分化マーカーであるサイトケラチン、E-カドヘリン、Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)発現を免疫組織化学染色およびウエスタンブロットで検討する。

(4)抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌培養細胞における癌幹細胞の同定と分離
シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌培養細胞を作成し、癌幹細胞の有無を親株細胞と比較検討する。

4. 研究成果

(1)SCCKN, SCCTF, KB, OSC-19, OSC-20には、癌幹細胞と考えられるベラパミル感受性のSP細胞が0.04~0.4%程度含まれている事が明らかとなった。その分画の細胞10,000個をNOD/SCIDマウスに移植したが腫瘍形成には至らなかった。

(2)造腫瘍性や転移能の高いシクロオキシゲナーゼ(COX)-2高発現KB/COX-2は、対照のKB/Neoに比べ、SP分画に含まれるベラパミル感受性細胞を2.5~4.6倍多く含んでいた。さらに、KB/COX-2はKB/Neoに比べ、癌幹細胞のマーカーの1つと考えられるCD44の発現が高かった(論文番号④)したがって、KB/COX-2は癌幹細胞様細胞としての性格を有することが示唆される。しかし、SP分画における転移関連ケモカインであるCXCR4陽性細胞率には差が見られなかった。

(3)SCCKN, OSC-19, HSC3を用いて新たにシスプラチン耐性細胞を作成し(耐性度2~5倍)、癌幹細胞マーカーであるOct4, Nanog, BMI1, Klf-4発現を調べたが、親株との間に明らかな差を見いだせなかった。これら3種類の耐性細胞ではMDR-1発現が見られなかったことから、癌幹細胞特性にはMDR-1発現が必須であると考えられる。

(4)癌幹細胞と上皮・間葉移行(EMT)の関連が示唆されていることから、浸潤様式の異なる口腔扁平上皮培養細胞(Grade3: SCCKN, HSC-2, OSC-20; Grade4C: HSC-3, SCC25, OSC-19; Grade4D: HOC313, TSU)ではGradeが進み分化度が低下するとともにE-カドヘリン、

NGAL 発現が減弱し、逆に N-カドヘリン発現が増強する (論文番号③) これらの細胞の中の OSC-20, OSC-19, HOC313, TSU に対して、癌幹細胞マーカーである Nanog, BMI, CD44 発現を調べたところ、Nanog はいずれの細胞にも発現が見られなかったが、BMI, CD44 は浸潤性の高い HOC313 と TSU で強く発現する傾向が見られた。

(5) ヒト正常舌ケラチノサイトにヒトパピローマウイルス (HPV) 16 の E6E7 遺伝子あるいは異変型 CDK4, cyclin D1, ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を遺伝子導入すると不死化細胞が得られる。これらの細胞にさらに癌遺伝子である HRAS あるいは EGFR と MYC を追加導入すると、100~10,000 個の細胞移植によりヌードマウスに扁平上皮癌が形成される (論文番号②)。これらが癌幹細胞としての性格を有するか否かを検討中である。

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 5 件)

- ① 頭司雄介、野口一馬、浦出雅裕: HPV陽性および陰性の口腔扁平上皮がんに対する in vitro 多段階発がんモデル、日本口腔外科学会雑誌 査読有 2013, 59(3):159-171.
- ② Yusuke Zushi, Mako Narisawa-Saito, Kazuma Noguchi, Yuki Yoshimatsu, Takashi Yugawa, Nagayasu Egawa, Masatoshi Fujita, Masahiro Urade, Tohru Kiyono: An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and-negative human Oral squamous cell carcinoma. Am J Cancer Res 査読有 2011, 1(7):869-881. www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr 0000079
- ③ Takashi Hiromoto, Kazuma Noguchi, Michiyo Yamamura, Yusuke Zushi, Emi Segawa, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation. Oncol Rep 査読有 2011, 26:1415-1421. DOI:10.3892/or.2011.1429
- ④ Emi Segawa, Hiromitsu Kishimoto, Kazuki Takaoka, Kazuma Noguchi, Susumu Hashitani, Kazunari Sakurai, Masahiro Urade: Promotion of hematogenous metastatic potentials in human KB

carcinoma cells with overexpression of cyclooxygenase-2. Oncol Rep 査読有 2010, 24:733-739.

DOI:10.3892/or.2011.1429

- ⑤ Nao Ohtsu, Kazuki Takaoka, Emi Segawa, Susumu Hashitani, Kazuma Noguchi, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Antitumor effects of inhibitors of nitric oxide synthase or cyclooxygenase-2 on human KB carcinoma cells overexpressing COX-2. Oncol Rep 査読有 2010, 24:31-36. DOI:10.3892/or_00000825

[学会発表] (14 件)

- ① 頭司雄介、野口一馬、吉川恭平、岸本裕充、浦出雅裕: 口腔発がんにおける p53, EGFR, Ras 遺伝子発現の関連性について~不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた解析~ 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2012. 5. 17, 広島)
- ② 吉川恭平、野口一馬、山村倫世、頭司雄介、高岡一樹、岸本裕充、浦出雅裕: 口腔扁平上皮癌培養細胞を用いたシスプラチン耐性における銅排出輸送体 ATP 7B の発現とその関与の検討 第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2011. 11. 29, 千葉)
- ③ 頭司雄介、野口一馬、山村倫代、高岡一樹、瀬川英美、岸本裕充、浦出雅裕: 不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた口腔癌の HPV 陽性、陰性モデル解析 第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2011. 11. 29, 千葉)
- ④ Kazuki Takaoka, Sayaka Hidaka, Susumu Hashitani, Yusuke Zushi, Michiyo Yamamura, Emi Segawa, Kazuma Noguchi, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Effect of NOS inhibitors and CXCR4 antagonist on tumor growth and metastasis of human adenoid cystic carcinoma xenografted into nude mice. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (2011. 11. 2, Santiago, Chile)
- ⑤ Yusuke Zushi, Kazuma Noguchi, Michiyo Yamamura, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Emi Segawa, Shin Okui, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: An in vitro multistep carcinogenesis Model for both HPV -positive and -negative human oral squamous cell carcinoma. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery

- (2011.11.2, Santiago, Chile)
- ⑥ 頭司雄介、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、森寺邦康、瀬川英美、奥井 森、岸本裕充、浦出雅裕：不死化ヒト正常舌ケラチノサイト(HTK)を用いた口腔癌のHPV 陽性、陰性モデルの解析
第 56 回(社)日本口腔外科学会学術大会(2011.10.21, 大阪)
- ⑦ 瀬川英美、野口一馬、高岡一樹、頭司雄介、岸本裕充、浦出雅裕：口腔扁平上皮癌細胞の上皮・間葉移行 (EMT) における zyxin の関与
第 70 回日本癌学会学術総会(2011.10.5, 名古屋)
- ⑧ Michiyo Yamamura, Kazuma Noguchi, Emi Segawa, Yusuke Zushi, Kazuki Takaoka, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: A functional analysis of zxin in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. 16th European Cancer Congress (2011.9.25, Stockholm, Sweden)
- ⑨ Kazuma Noguchi, Takashi Hiromoto, Michiyo Yamamura, Yusuke Zushi, Emi Segawa, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade: Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation. 16th European Cancer Congress (2011.9.25, Stockholm, Sweden)
- ⑩ 山村倫世、野口一馬、瀬川英美、高岡一樹、頭司雄介、廣本孝史、岸本裕充、浦出雅裕：口腔癌細胞における Zyxin の発現および機能の検討
第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会(2010.11.13, 高知)
- ⑪ 廣本孝史、野口一馬、山村倫世、瀬川英美、頭司雄介、岸本裕充、浦出雅裕：口腔扁平上皮癌における NGAL の発現
第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会(2010.11.13, 高知)
- ⑫ 瀬川英美、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、頭司雄介、岸本裕充、橋谷 進、浦出雅裕：口腔癌細胞における EMT marker としての zyxin の発現
第 55 回(社)日本口腔外科学会学術大会(2010.10.16, 千葉)
- ⑬ 廣本孝史、野口一馬、瀬川英美、頭司雄介、山村倫世、岸本裕充、浦出雅裕：舌扁平上皮癌の形成・分化度における Neutrophil gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) の発現
第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集

- 会 (2010.6.25, 札幌)
- ⑭ 日高紗弥香、橋谷 進、頭司雄介、田中徳昭、高岡一樹、浦出雅裕：高転移能を有するマウス未分化癌に対する CXCR4 拮抗剤と NOS 阻害剤の腫瘍増殖および転移抑制効果
第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2010.6.25, 札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森寺 邦康 (MORIDERA KUNIYASU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：60461076

(2) 研究分担者

野口 一馬 (NOGUCHI KAZUMA)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50309473

浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70104883