

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 5 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791777

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌における癌幹細胞マーカーの解析

研究課題名（英文） Gene expression of Cancer Stem Cell in Oral Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

磯邊 友秀（ISOBE TOMOHIDE）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40515855

研究成果の概要（和文）：癌組織中には癌幹細胞が存在し、癌幹細胞の存在は抗癌剤抵抗性を示し再発に関与すると考えられる。本研究では口腔癌における癌幹細胞の同定と遺伝子解析を目的とした。ヒト口腔癌細胞から癌幹細胞様細胞の抽出を行い、網羅的に遺伝子解析を行った。結果、抽出した細胞は幹細胞様の性格を有し、それらの発現した遺伝子の内、keratin34 は癌の浸潤、分化度、また、口腔癌癌幹細胞マーカーの一つのなりえる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells can be the source of all the malignant cells in a primary tumor, they can compose the small reservoir of drug-resistant cells that are responsible for relapse after a chemotherapy induced remission. In this study, we isolated oral cancer stem cell-like cells and the gene expression profile of oral cancer stem cell-like cells was examined. Our results demonstrate that the expression of keratin 34 could be a useful marker for pathologic diagnosis in terms of predicting malignant change and be a one of the makers for OSCC cancer stem cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学

1. 研究開始当初の背景
癌組織は無限に増殖能を有した均一の細胞

集団ではなく、正常体細胞同様に階層構造よりなっていると考えられようになった。すな

わち正常組織における幹細胞同様に癌幹細胞の存在が示唆されている。癌幹細胞は自己複製能、多分化能、増殖能、浸潤能を有し、さらに、薬剤抵抗性を示すと示唆される。癌幹細胞の存在は癌の治療効果、再発・転移など臨床的な予後に大きく関与すると考えられる。癌幹細胞の同定は癌の診断、治療さらに癌の発生を理解するうえで欠かすことのできない因子と考える。癌幹細胞はヒト白血病細胞において同定されて以来、脳腫瘍や大腸癌など様々な固形癌においてもその存在が示唆されつつある。

2. 研究の目的

近年、様々な固形癌において癌幹細胞マーカーの同定、遺伝子解析、さらに機能解析がなされているなか、ヒト口腔癌（口腔扁平上皮癌）においていまだ癌幹細胞の同定に至っていない。口腔癌の罹患患者数は毎年 7000 人、口腔癌による死亡者数も 3000 人程に至り、増加傾向にあるといわれている。近年癌治療は化学療法をはじめ目覚ましい進歩があるなか、口腔癌治療においても薬剤・放射線治療抵抗性を示す症例や、早期に浸潤・転移を起し治療困難な症例も少なくない。口腔癌においても他臓器における癌幹細胞が存在し、薬剤抵抗性や浸潤・転移に深く関与すると考えられる。口腔癌における癌幹細胞の存在を明らかにすることは、新しい癌の診断・治療、さらに癌発生のメカニズムを理解し、癌を抑制し得るものと仮説し、ヒト口腔癌における癌幹細胞マーカーを同定し遺伝子解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株における Side population 解析

癌幹細胞は組織幹細胞同様に細胞周期が休止状態で維持すると考えられている。フローサイトメトリー解析で細胞に DNA 結合色素である Hoechst33342 を取り込ませ、輝度を解析すると色素排泄能の低い細胞は 2 次元解析をおこなうとドット解析で中央に見られる。この細胞集団は細胞周期 G₀/G₂/M 期の細胞集団であり、その分画以外の発現強度の低い分画が存在する。またこの分画は ABC トランスポーター阻害剤によって消失する領域でもある。この低い分画を side population といい、この分画に位置する細胞は ABC トランスポーターを多く有し色素排泄能が高く、よって低輝度で検出される。この分画には幹細胞が多く含まれていることが知られており、この方法を用い本教室で樹立したヒト口腔癌扁平上皮癌細胞株 17 株を用いて SP 解析を行った。培養条件は Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地 (10% Fetal bovine serum, antibiotics 添加) 中、常酸素条件下 (CO₂, 37°C) で行った。subconfluent になった状態で細胞を accutase にて処理し

シャーレより剥離した。細胞を遠心し 1x10⁶ 個/ml に調整し Hoechst33342 を 5µg/ml 添加、コントロール群には Hoechst 添加後 ABC トランスポーター阻害剤である reserpin15µg/ml を添加し 60 分 incubate した。その後、洗浄し 2%FBS/PBS で 1x10⁷ 個/ml に調整し、死細胞除去のために propidium iodide を 0.5µg/ml 添加しフローサイトメトリー解析を行った。解析には FACS Aria II (Becton Dickinson) を用いた。

(2) 癌細胞様細胞の抽出

SP 解析を行った結果、17 種類のヒト口腔癌扁平上皮癌細胞の内、Tosca23S は約 16% と高い SP 細胞含有率を示した。この細胞株を用いて癌幹細胞様細胞の抽出を行った。方法は以下の通りである。

Tosca23S 細胞株を subconfluent まで培養し、培養後、無血清培地 (N2 supplement, 10ng/ml EGF, 10ng/ml bFGF 添加) にて培養を行い幹細胞特有の sphere を形成させ、この細胞の抽出を行った。

(3) 網羅的遺伝子解析

(2) の方法で抽出を行った細胞が幹細胞様細胞であるかを既知の幹細胞マーカー (CD44, CD24, CD133) を用い検討を行い、さらに網羅的遺伝子解析を行った。

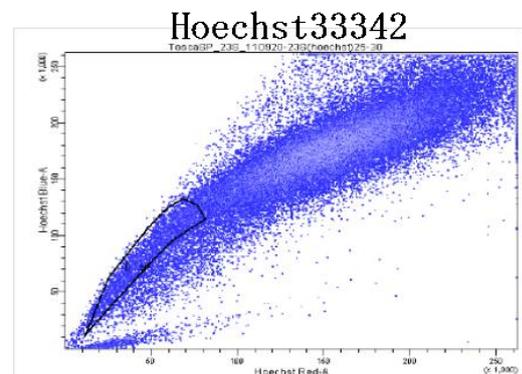
(4) 免疫組織学的検討

網羅的遺伝子解析の結果、毛包における幹細胞マーカーの一つであり、表皮における幹細胞マーカーと考えられている keratin34、また、幹細胞マーカーになりえる膜抗原である CD73 に着目し、正常、口腔粘膜上皮、異型上皮、口腔扁平上皮癌における局在および発現の検討を行った。

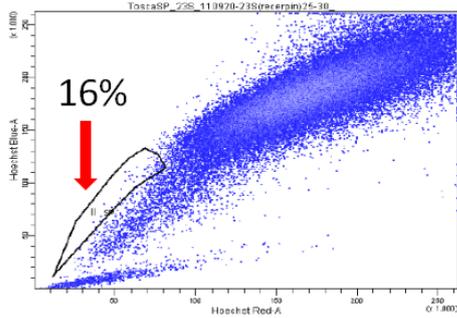
4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株における Side population 解析

17 種類の細胞株における SP 細胞含有率の内訳は、13 株において 1%、3 株においては 1% 以上 5% 未満、1 株においては約 16% であった。



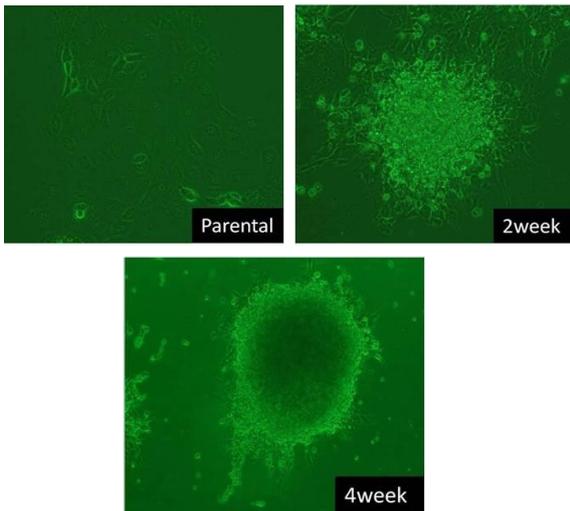
Hoechst33342+Reserpin



(図には Tosca23S 細胞株における SP 分画を示す)

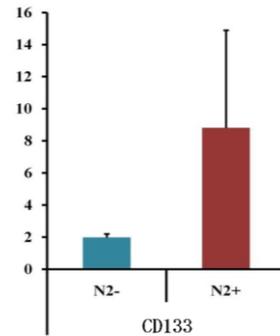
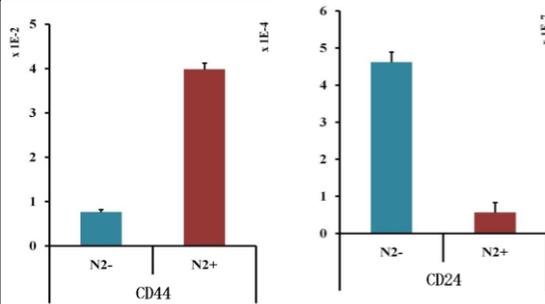
(2) 癌幹細胞様細胞の抽出

SP 分画含有率の高かった Tosca23S 細胞を無血清培地 (N₂ supplement, EGF, bFGF) 用いて長期培養を行った。その結果、培養開始より 1 週間ころより、コロニー形成を開始し、4 週間目には幹細胞特有の形態である spheroid 様の形態を示し、その後、長期培養においても維持され、形態学的、細胞数において変化が見られなかった。母細胞、2 週間後、4 週間後の培養細胞の写真を示す。



(3) real time PCR 解析

4 週間無血清培地下で Tosca23S 細胞株を培養することで spheroid 形成がみられ、この細胞群の遺伝子発現の検討を頭頸部腫瘍の癌幹細胞マーカーとして知られる CD133, CD44, CD24 の発現について母細胞である Tosca23S 細胞と比較検討を行った。結果をグラフに示す。4 週間培養によって得られた細胞は母細胞と比較し CD44 (high)+CD24 (low)、CD133 (high) であった。



これまでのことより、無血清培地下長期培養によって幹細胞様の形態を示し、またそれらの遺伝子発現は癌幹細胞遺伝子発現示すことが示唆された。

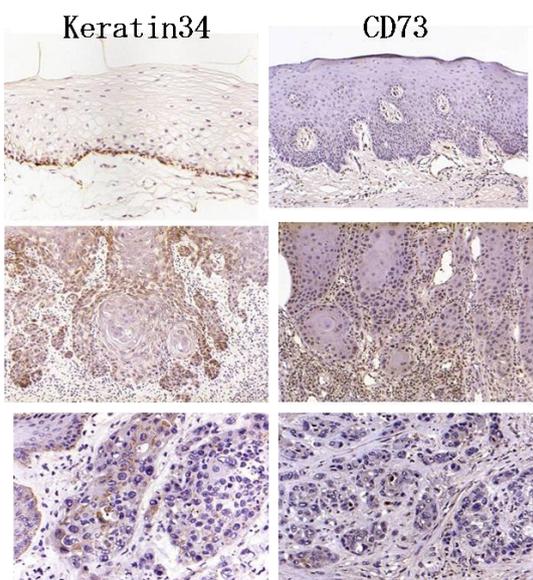
(4) 網羅的遺伝子解析

(3) で得られた結果をふまえ、無血清培地下長期培養 Tosca23S 細胞について microarray 解析を行った。結果、CD73、keratin34、IL-8、VGF など 18 種の遺伝子に 8 倍以上の発現増強が見られた。また、real time PCR の結果同様 CD44^{high}CD24^{low} であることも確認された。

(5) 免疫組織学的検討

(4) で 8 倍以上の遺伝子発現増強が見られた keratin34、CD73 について免疫組織学的検討を行った。標本は正常口腔粘膜上皮、上皮異形成から早期浸潤癌、低分化型扁平上皮癌についてその発現と、局在について検討を行った。CD73 の染色結果について。正常口腔粘膜上皮においては基底細胞から傍基底細胞にわずかに発現を認めるにみであった。また異型上皮においては基底細胞様細胞の重層化したところに陽性細胞の増加が見られた。また早期浸潤癌においては浸潤先端部にその発現が見られ、陽性細胞の増加が見られた。また、高分化型扁平上皮癌においては正常上皮同様、基底細胞様細胞にその発現を認めた。一方、低分化型扁平上皮癌においては CD73 の発現増強が見られた。keratin73 の染色結果について。正常粘膜上皮においては基底細胞にのみ一致して発現が見られた。上皮異形成においては異型細胞に一致してその

発現が見られた。早期浸潤癌においては浸潤先端部に発現を認めた。高分化型扁平上皮癌においては基底細胞様細胞に一致して発現が見られた。また、CD73 同様に低分化な癌細胞には高率に keratin34 の増加を認めた。結果の一部を示す。左のパネルには keratin34、右のパネルには CD73 の染色結果を示し、上段には正常粘膜上皮、中段には上皮異形成と早期浸潤癌、下段には低分化扁平上皮癌を示す。



以上の結果より、無血清培地長期培養において得られた細胞は癌幹細胞様の遺伝子発現を示した。またこの細胞の網羅的遺伝子解析によって得られた CD73、keratin34 の免疫組織学的検討の結果、CD73、keratin34 の発現は上皮の分化の一つの指標、また幹細胞マーカーの一つとなりえると示唆された。

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 入江太朗、磯邊友秀、立川哲彦、口腔粘膜前癌病変のプロミクス解析 口腔粘膜前癌病変の診断における新たな「尺度」を求めて、日本病理学会、誌査読あり、99 巻 1 号、p387、2010 年
- ② Irie Tarou、Tomohide Isobe、Sclerosing odontogenic carcinoma、Pathology International、査読あり、62 巻、p75-76、2011 年

[学会発表] (計 3 件)

- ① Tomohide Isobe、Identification of cancer stem cell-like fractions in

cultured oral squamous cell carcinoma and expression of keratin15 as a putative cancer stem cell marker、AACR101st, Washington DC、2010 年 4 月

- ② 磯邊友秀、Identification of cancer stem cell-like fractions in cultured oral squamous cell carcinoma and expression of keratin15 as a putative cancer stem cell marker 第 19 回日本癌転移学会学術集会・総会、金沢、2010 年 6 月
- ③ 磯邊友秀、Identification of cancer stem cell-like fractions in OSCC and expression of CK15 as a putative cancer stem cell marker、第 69 回日本癌学会総会、大阪、2010 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯邊 友秀 (ISOBE TOMOHIDE)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：40515855

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：