

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791933

研究課題名（和文） 頭頸部癌における上皮間葉移行の癌幹細胞調節機構

研究課題名（英文） Association with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell in Head and Neck cancer

研究代表者

羽生 昇 (HABU NOBORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60365369

研究成果の概要（和文）：頭頸部扁平上皮癌において癌幹細胞様細胞が存在し、その指標として幹細胞関連遺伝子の中でも、特に Oct3/4、Nanog が有用である可能性が示唆された。頭頸部扁平上皮癌細胞株と舌癌扁平上皮癌臨床検体の研究から、Oct3/4、Nanog を指標とした癌幹細胞様細胞の存在が、癌幹細胞の高い遊走能、浸潤能をとおして、後発頸部リンパ節転移に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oct3/4 and Nanog are putative cancer stem cell markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and the reliable predictors of delayed neck metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は自己複製機能をもち状況に応じて様々な成熟した組織に分化する能力をもつとされている。生体内における幹細胞は胚性幹細胞との対比で体性幹細胞と称されている。体性幹細胞はいくつかの臓器で証明されているが、主なものは造血細胞で、そのほか脳、皮膚などがある。さらに造血幹細胞と同様な機能を持つ細胞が白血病のなかに存在することが明らかになり、さらに固形癌の中にも自己複製能力の異なるさまざまなタイプの細胞が混在していることが示唆されているようになってきた。近年発達した細胞マーカーの研究やフローサイトメトリーの開発によって体性幹細胞と同様に多分化能と自己複製能をあわせもつ「癌幹細胞」が存在することが明らかになってきた。この細胞

群は Hoechst333342 で染色性の弱い細胞群として同定されることから SP(Side population)細胞とよばれている。SP 細胞は脳腫瘍、乳癌、膵癌、前立腺癌で存在が明らかになってきた。頭頸部癌では Chen らが存在を報告している (Chen JS et al.; Laryngoscope 116, 401-406, 2006)

癌病巣の中に存在する癌幹細胞が放射線治療や化学療法によってアポトーシスを受けずに、残存し再発をきたす。また原発巣から離脱して血管やリンパ管を移動して転移をきたすと考えられている。このように癌幹細胞は薬物治療耐性であると考えられる。蛍光色素を排泄する細胞群である SP 細胞は同様に、薬物耐性をもつと考えられる。また癌幹細胞は細胞周期の静止期維持を行うことでも、化学療法や放射線の耐性を生じている

といわれている。癌幹細胞の存在の確認やその耐性機構の解明は新たな癌治療に応用できるとして注目されている。

近年、癌幹細胞は、上皮間葉移行を通して転移にも関係しているのではないかと乳がんを中心に報告されている。

上皮間葉移行 (以下 EMT) とは上皮細胞が細胞骨格の再構築を受けることで細胞接着を失い、間葉細胞の性質を獲得する性質である。その結果 EMT 受けた細胞は(1)線維芽細胞様形態へ変化 (2)遊走能、浸潤能の亢進 (3)E-cadherin などの上皮マーカーの発現抑制とビメンチンなど間葉細胞マーカーの発現亢進を起こす。2008 年 Mani (the epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, Cell, 2008) らによって EMT 細胞が幹細胞の性質を示すことが報告された。TGF- β や EMT 誘導遺伝子 (Snail, Twist) によって EMT が誘導された乳腺細胞が幹細胞マーカーを発現し、自己複製能、腫瘍形成能を獲得し幹細胞様細胞となる。つまり、一度分化した細胞が EMT 誘導されることで幹細胞の性質を獲得することを示している。

癌幹細胞の転移との関係の解明および EMT との関係にも注目した。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌に癌幹細胞が存在するかどうかについて検討する。癌幹細胞様細胞 (SP 細胞) が存在を確認後、癌幹細胞関連遺伝子や EMT 関連遺伝子において SP 細胞と Non SP 細胞との間に差がある遺伝子はなにかを検討する。また癌幹細胞の亢進している機能はなにかを検討する。臨床検体における同関連遺伝子の発現とその臨床的意義について、転移を中心に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) vitro では、頭頸部扁平上皮癌細胞株 SAS, SCC4, HSC4 を用いた。Flowcytometry にて SP 細胞の存在の確認を行った。SP 細胞と non SP 細胞を sorting して癌幹細胞関連遺伝子と EMT 関連遺伝子について Microarray を行い比較した。癌幹細胞マーカーを RT-PCR を行い比較した。癌幹細胞マーカーの Oct3/4, Nanog の免疫細胞染色を行った。

SP 細胞の機能の解明に、増殖能・遊走能・浸潤能 assay を行った。

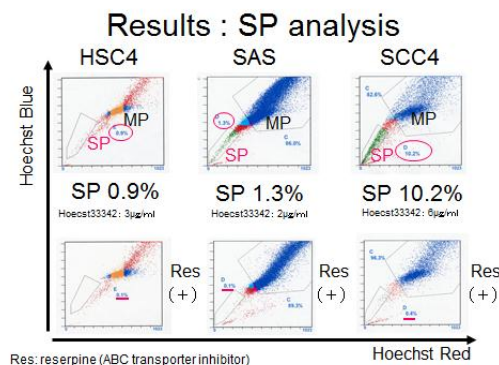
(2) 臨床検体では

1996 年から 2007 年までの間に慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科で初回治療として舌部分

切除を行った、stage I/II 舌扁平上皮癌症例 50 例の Oct3/4 と Nanog の発現を免疫組織化学染色にて評価し、後発頸部リンパ節転移 (delayed neck metastasis: DNM) との関係について検討した。DNM は 13 例に認められていた。また臨床病理学的因子は病理医によって評価した。DNM との相関関係について統計学的検討を行った。

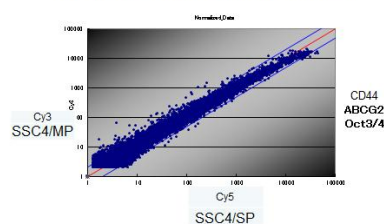
4. 研究成果

(1) 舌癌扁平上皮癌細胞株 SAS, SCC4, HSC4 を flowcytometry にて sorting した結果、SP は 1.3%, 10.2%, 0.9% それぞれ認められ、ABC transporter 阻害剤を投与すると SP が消失することから、SP 細胞が存在することが考えられた。すなわち癌幹細胞様細胞の存在が頭頸部扁平上皮癌にも存在すると考えられた。



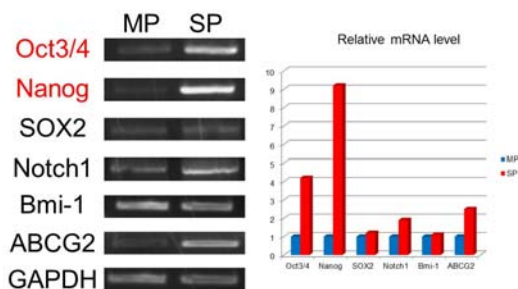
SCC4 において、Microarray にて癌幹細胞関連遺伝子の発現や EMT 関連遺伝子を SP 細胞と non SP 細胞と比較すると SP 細胞で転写因子 Oct3/4, Nanog, SOX2 や CD44, ABCG2 などの発現が高かった。EMT 関連遺伝子はとくに有意な差を認めなかった。

Results : Microarray-SCC4



癌幹細胞と非癌幹細胞の間の EMT 発現遺伝子レベルは同程度であって、それ自身の発現程度が転移に関係しているのではないことが考えられた。

RT-PCR にて癌幹細胞関連遺伝子の発現を SP 細胞と non SP 細胞と比較すると SP 細胞で転写因子 Oct3/4, Nanog や ABCG2, Notch1 の発現が高かった。

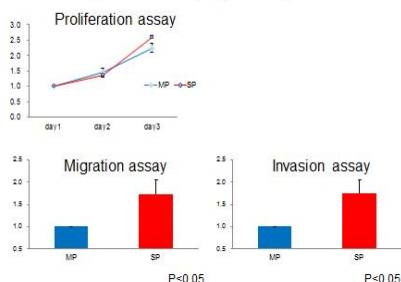


蛋白の発現を確認するのに免疫細胞染色を行うと、Oct3/4, Nanog では SP 細胞が non SP 細胞より染色強度が高く、蛋白においても発現が高いことが確認された。

これらから SP 細胞と non SP 細胞との間で癌幹細胞関連遺伝子の Oct3/4, Nanog が頭頸部扁平上皮癌に有用なマーカーではないかと考えられた。

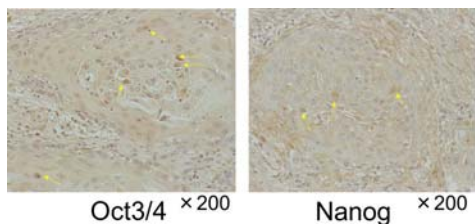
SP 細胞の機能としては、SCC4 の遊走能および浸潤能は SP 細胞が non SP 細胞より高く、増殖能は両者に有意差を認めなかった。癌幹細胞は遊走能や浸潤能が高いことが示唆された。

Results :proliferation,migration,invasion-SCC4



Vitro の結果では頭頸部扁平上皮癌には癌幹細胞様細胞の SP 細胞が存在し、そのマーカーには Oct3/4, Nanog が有用であり、SP 細胞は遊走能や浸潤能が高いことが示された

(2)stage I/II 舌扁平上皮癌症例 50 例の Oct3/4 と Nanog の免疫組織染色は、DNM 陽性 13 例中 Oct3/4 発現は 8 例に認められ、Nanog 発現は 13 例中 7 例に認められた。



DNM との間の相関関係について単変量解析を行うと Oct3/4, Nanog の発現との間に有意な相関が認められた。

Univariate analysis of immunohistochemical expressions and DNM

Immunohistochemistry	DNM - (n=37)	DNM + (n=13)	p value
Oct3/4 negative	33	5	0.001
Oct3/4 positive	4	8	
Nanog negative	34	6	0.001
Nanog positive	3	7	

Fisher's exact test

臨床病理学的因子では、vascular invasion, muscular invasion, mode of invasion が DNM との間に単変量解析で相関関係を認めた。単変量解析で相関関係を認めた Oct3/4 染色陽性、Nanog 染色陽性、vascular invasion, muscular invasion, mode of invasion の 5 項目について SPSS を用いて多変量解析を行うと、Oct3/4 染色陽性、vascular invasion が DNM と相関関係を認めた。

Vitro および臨床検体の結果から、頭頸部扁平上皮癌には癌幹細胞様細胞が存在し、それらは Oct3/4 を指標としていること、そして癌幹細胞は転移に関係し、その機序には遊走能・浸潤能が関与している可能性が示された。

【考察】頭頸部癌癌幹細胞の指標として Oct3/4, Nanog が有用である可能性、およびこれら指標を発現する癌幹細胞様細胞の存在が DNM に寄与している可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Noboru Habu, Yorihisa Imanishi. Expressions of stem cell markers Oct3/4 and Nanog and its clinical significance in oral tongue squamous cell markers. 8th international conference on Head and Neck Cancer. 2012. 7. 21-25 Toronto, Canada

2) 羽生昇、今西順久、徳丸裕、藤井正人、 Expressions of stem cell markers Oct3/4 and Nanog and its clinical significance in oral tongue squamous cell markers. 第 70 回日本癌学会. 2011. 10. 3-5、名古屋

3)羽生昇、今西順久、徳丸裕、藤井正人、小川郁、頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞様細胞の存在と癌幹細胞マーカーの発現に関する検討、第35回頭頸部癌学会、2011.6.11-12、名古屋

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽生 昇 (HABU NOBORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60365369