

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390448

研究課題名(和文) 活性酸素の制御による口腔がん幹細胞標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy targeting cancer stem cells by ROS regulation

研究代表者

戸塚 靖則 (totsuka, yasunori)

北海道大学・・・名誉教授

研究者番号：00109456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織は強い低酸素とともに、極度の低栄養状態にある。そのような環境で生じる活性酸素(ROS)ががん幹細胞や、さらにそのニッチの役割を果たす腫瘍血管の生態に及ぼす影響を解明し、がん幹細胞の標的化治療につながる分子機構に迫った。ROSにより癌細胞において幹細胞マーカーの発現や血管新生因子の発現が亢進し、さらに腫瘍血管内皮においても様々な遺伝子の発現が変動した。ROSにより増加する腫瘍血管内皮由来分泌たんぱくのうちがん細胞を走化させ、未分化性の維持に働くことのあることが示唆された。最後に、抗酸化剤DPIを用いてin vivo 腫瘍増殖に対する効果を検証した。

研究成果の概要(英文)：Reactive Oxygen Species (ROS) are known as the origin of oxidative stress. ROS are produced in response to hypoxia and nutrient deprivation. It is reported that tumor microenvironment is often exposed to hypoxic condition and nutrient deprivation because of the insufficient blood flow. ROS are accumulated in various cells in tumor microenvironment, and they promote cancer malignancy. In this study, we analyzed the effect on cancer stem cells and tumor blood endothelial cell that is reported to play a role as stem cell niche. ROS accumulation caused in alteration of gene expression profile both in cancer cells and tumor endothelial cells. One secreted protein from tumor endothelial cells was upregulated by ROS and attracted cancer cells. We analyzed the effect of ROS inhibition on cancer stem and tumor angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管新生阻害 腫瘍 微小環境 微小環境 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、それまでにがん組織には分化したがん細胞の他に未熟ながん幹細胞が存在することが明らかになってきていた。

申請者は、それまでに研究グループを率いて、口腔がんにおいてのがん幹細胞について研究してきた。がん幹細胞は放射線や化学療法に対して抵抗性を持ち、また自己複製能により、種々の治療によって他のがん細胞が死滅したあとにも生き残ってがんの再発や転移の原因となる。

われわれは、これまでにがん幹細胞が様々な薬剤抵抗性を持つことを明らかにし、それらに特異的に発現する分子をいくつか見出してきた。その中には、活性酸素(ROS)によって誘導される分子が含まれていた。

活性酸素は、細胞の核酸やタンパク質、脂質などの生体分子に強力かつ不可逆的な変化をもたらす。例えば、活性酸素が生じる環境においては細胞の遺伝子が繰り返し傷つけられ、発癌が誘発されることが知られている。活性酸素はさまざまな環境要因(喫煙、熱刺激、香辛料刺激、機械刺激)によって生じ、それによって細胞内の活性酸素シグナルが活性化し、発がん過程やがんの悪性化に関与していると考えられている。

申請者らは、口腔という特殊な環境(喫煙、熱刺激、香辛料刺激、機械刺激)によって発生した活性酸素が、口腔がんのがん幹細胞の薬剤耐性やそれらの未分化性の維持に関与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

今回の研究目的は、がん幹細胞における薬剤抵抗性など悪性形質の獲得と未分化性の維持に活性酸素が関与しているという仮説のもと、活性酸素により誘導される分子を制御することにより、がん幹細胞を効果的に攻撃できる方法を探る。また、がん幹細胞のニッチである腫瘍血管内皮細胞において活性

酸素ががん幹細胞の生存や未分化性の維持にどのように貢献しているのかについても解明し、がん幹細胞のニッチの破壊を可能とするような分子メカニズムを探る。

また、既存の抗酸化剤と食品として用いられているさまざまな抗酸化物質により、がん幹細胞と腫瘍血管内皮細胞における活性酸素除去の可能性を検討し、発癌・癌の悪性化進展を阻止する治療法開発を目指し、そのための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞の割合解析：

異なる転移能をもつ悪性腫瘍細胞株を用いて ALDH 活性 high/low を検討した。

(2) がん幹細胞の characterization：

PCR 法とフローサイトメーターを用いて、分離したがん幹細胞の幹細胞マーカーの発現を確認した(CD133、CD90)。

(3) 腫瘍血管内皮細胞の分離：

マウス腫瘍モデルから腫瘍血管内皮細胞を CD31 抗体と CD45 抗体を用いて FACS aria 2 により CD31+CD45- の分画として採取した。

(4) 細胞内活性酸素の測定：

分離・培養したがん幹細胞とがん細胞における細胞内活性酸素の測定を、酸化ストレスの指標であり、DNA が活性酸素により酸化されて生成される分子である 8-OHdG を、FACS Aria-2 を用いて測定し比較・解析した。

(5) がん幹細胞のニッチとしての腫瘍血管

内皮細胞における活性酸素の蓄積解析：癌組織は強い低酸素とともに、極度の低栄養状態にある。そこで、低酸素培養器を用い、低酸素、低酸素(1%~5%O₂)、低栄養下(無血清培地下)で、活性酸素(ROS)能が変化するかを検討した。

また、腫瘍血管内皮細胞とこれらのがん幹細胞との相互作用を解析するために腫瘍血管内皮とがん幹細胞との接着や生存性をこれ

らの共培養でどのように変わるのかなどについて検討した。

4. 研究成果

(1) がん幹細胞の割合解析：

異なる転移能をもつ悪性腫瘍細胞株を用いて ALDH 活性 high/low を検討した。高転移性の癌細胞では低転移性の癌細胞に比べ ALDH 活性の高い集団の割合が高いことが見出された。

(2) がん幹細胞の characterization：

PCR 法とフローサイトメーターを用いて、分離したがん幹細胞の幹細胞マーカーの発現を確認したところ、ALDHhigh の細胞において CD133, CD90, MDR1, IL6 などの遺伝子の発現レベルが有意に高いことがわかった。

(3) 腫瘍血管内皮細胞の分離：

マウス腫瘍モデルから腫瘍血管内皮細胞を CD31 抗体と CD45 抗体を用いて FACS aria 2 により CD31+CD45- の分画として採取した。

(4) 細胞内活性酸素の測定：

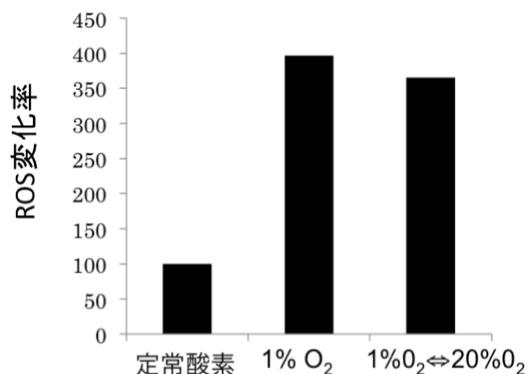
分離・培養したがん幹細胞とがん細胞における細胞内活性酸素の測定を、酸化ストレスの指標であり、DNA が活性酸素により酸化されて生成される分子である 8-OHdG を、FACS Aria-2 を用いて測定し比較・解析した。

(5) がん幹細胞のニッチとしての腫瘍血管内皮細胞における活性酸素の蓄積解析：癌組織は強い低酸素とともに、極度の低栄養状態にある。そこで、低酸素培養器を用い、低酸素、低酸素(1%~5%O₂)、低栄養下(無血清培地下)で、活性酸素(ROS)能が変化するかを検討した。腫瘍血管内皮細胞を低酸素環境にすると ROS の蓄積がみられた。

また低血清培地で培養することによっても血管内皮に ROS が蓄積されることが見出された。

(6) 幹細胞に与える影響に関わる解析

がん幹細胞が未熟な性質を保持したまま血



管ニッチに存在しているメカニズムを探るために腫瘍血管内皮とがん幹細胞の共培養の系において腫瘍血管内皮の活性酸素を除去し、ニッチとしての性質にどのような変化が出るのかを解析した。具体的には腫瘍血管内皮細胞とがん幹細胞との接着やがん幹細胞が腫瘍血管内皮に対する遊走性などが腫瘍血管の活性酸素阻害によりどのように変わるのかを解析した。腫瘍血管内皮から分泌される因子のうちがん幹細胞を走化させる働きがあることが示唆された分子が一つ同定された。その分子は癌細胞の Akt を刺激することがわかり、癌細胞の高い生存性の維持にも機能していることが示唆された。

(7) 抗酸化剤を用いての活性酸素を標的とした治療の取り組み：

既存の抗酸化剤や緑茶カテキン、イソフラボンを始めとした抗酸化物質を用いて ROS が除去されうるかをフローサイトメトリーにより検討した。NAC, EGCG は確かにがん幹細胞ならびに腫瘍血管内皮の ROS のレベルを下げることを確認された。

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 12 件)

すべて査読あり

1. Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and Hida K. : Inhibition of

- multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel , *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015
doi:10.1016/j.ajpath.2014.10.017
2. Ohmura-Kakutani H., Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Iida J., Shindoh M., Tsuchiya K., Shinohara N., Hida K : Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype, *PLoS ONE*, 9(12):e113910, 2014
doi: 10.1371/journal.pone.0113910.
 3. Alam Mohammad Towfik , Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and Hida K : Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 105(12), 1533–1540, 2014
doi: 10.1111/cas.12549.
 4. Otsubo T., Hida Y., Ohga N., Sato H., Kai T., Matsuki Y., Takasu H., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Nonomura K., Hida K. : Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells, *Cancer Sci*, 105(5), 560-567, 2014
DOI: 10.1111/cas.12394
 5. Habiba U., Kitamura T. Yanagawa-Matsuda A., Hida K., Higashino F., Ohiro Y., Totsuka Y. and Shindoh M. : Cytoplasmic expression of HuR may be a valuable diagnostic tool for determining the potential for malignant transformation of oral verrucous borderline lesions, *Oncol Rep*, 31(4), 1547-1554, 2014 DOI: 10.3892/or.2014.3017
 6. Kondoh M., Ohga N., Akiyama K., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik, Inoue N., Shindoh M. and Hida K : Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment, *PLoS ONE*, 8(11), e80349, 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0080349
 7. Osawa T., Ohga N., Akiyama K., Hida Y., Kitayama K., Kawamoto T., Yamamoto K., Maishi N., Kondoh M., Onodera Y., Fujie M., Nonomura K., Shindoh M. and Hida K.. : Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis, *Br J Cancer*, 109(8), 2237-2247, 2013 DOI: 10.1038/bjc.2013.535
 8. Nagamine K., Kitamura T., Yanagawa -Matsuda A., Ohiro Y., Tei K., Hida K., Higashino F., Totsuka Y. and Shindoh M. : Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma, *Oncol Rep*, 29(6), 2114-2118, 2013 DOI: 10.3892/or.2013.2393
 9. Osawa T., Ohga N., Hida Y., Kitayama K., Akiyama K., Onodera Y., Fujie M., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., Hida K.: Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner, *Cancer Sci*, 103(6), 1038-1044, 2012 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02261.x
 10. Yamamoto K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Kitayama K., Akiyama K., Osawa T., Kondoh M., Matsuda K., Onodera Y., Fujie M., Kaga K., Hirano S, Shinohara N., Shindoh M., Hida K.: Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells, *Br J Cancer*, 106(6), 1214-1223, 2012 DOI: 10.1038/bjc.2012.59
 11. Ohga N., Ishikawa S., Maishi N., Akiyama K., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Osawa T., Yamamoto K., Kondoh M., Ohmura H., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., Hida K. : Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells: Comparison between Tumor Endothelial Cells Isolated from Highly Metastatic and Low Metastatic Tumors, *Am J Pathol*, 180(3), 1294-1307, 2012 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.035
 12. Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Sadamoto Y., Ishikawa S., Maishi N., Akino T., Kondoh M., Matsuda A., Inoue N., Shindoh M. and Hida K. : Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 upregulation via VEGF signaling in tumor microenvironment, *Am J Pathol*, 180(3), 1283-1293, 2012 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.029

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 大賀則孝, 近藤美也子, 秋山廣輔, 間石奈湖, 北川善政, 樋田泰浩, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍内低酸素環境と腫瘍血管内皮の異常性の関連, 第73回日本癌学会学術総会, 2014.9.25、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
2. Ohiro Y., Kuribayashi K, Ashikaga Y, ONO M, Totsuka, Y and Tei, K.,: Locoregional control in advanced resectable oral squamous cell carcinoma by concurrent preoperative chemoradiotherapy with Docetaxel and Cisplatin European Association for Cranio-Maxillo Facial Surgery, 23 - 26, September, 2014, Prague, Czech Republic.
3. 鳥居ちさほ, 進藤正信, 秋山廣輔, 樋田泰浩, 大賀則孝, 間石奈湖, 大廣洋一, 小野貢伸, 戸塚靖則, 松野吉弘, 北川善政, 鄭 漢忠, 佐藤靖史, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における新規予後因子としてのVasohibin-1, 第110回北海道癌談話会例会, 2014.9.13、札幌医科大学(北海道・札幌市)
4. Ohiro Y., Totsuka Y., Tei K Locoregional control in advanced resectable oral squamous cell carcinoma by concurrent preoperative chemoradiotherapy with Docetaxel and Cisplatin Commemoration Ceremony of Sapporo Dental College & Hospital & Scientific Seminar 31, October, 2014, Dhaka, Bangladesh.
5. 鳥居ちさほ, 大賀則孝, 秋山廣輔, 間石奈湖, 北條敬之, 大廣洋一, 小野貢伸, 戸塚靖則, 鄭 漢忠, 樋田泰浩, 進藤正信, 佐藤靖史, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における新規予後因子としてのVasohibin-1, 第103回日本病理学会総会, 2014.4.24 広島市国際会議場(広島県・広島市)
6. Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Omura H., Yamada Y., Torii C., Shindoh M., Ohba Y., Hida K., P-gp inhibitor enhances antiangiogenic activity in metronomic chemotherapy, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, 東映太秦映画村(京都府・京都市)
7. Maishi N., Ohba Y., Ohga N., Akiyama K., Hamada J., Yamamoto Y., Kawamoto T., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells promote metastasis, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, 東映太秦映画村(京都府・京都市)
8. Alam Mohammad Towfik, Nagao H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinozaki N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: SBSN is a novel Tumor Endothelial Cell marker, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, 東映太秦映画村(京都府・京都市)
9. Yamada K., Maishi N. Ohga N., Akiyama K., Kawamoto T., Alam Mohammad Towfik, Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A., Hida K. : CXCL12/CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, 東映太秦映画村(京都府・京都市)
10. Torii C., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Hojo T., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Hida Y., Shindoh M., Sato Y., Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor in oral squamous cell carcinoma, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, 東映太秦映画村(京都府・京都市)
11. 鳥居ちさほ, 大賀則孝, 秋山廣輔, 間石奈湖, 北條敬之, 大廣洋一, 小野貢伸, 戸塚靖則, 鄭 漢忠, 樋田泰浩, 進藤正信, 佐藤靖史, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における新規予後因子Vasohibin-1, 第46回北海道病理談話会, 2013.10.12 北海道大学(北海道・札幌市)
12. 鳥居ちさほ, 大賀則孝, 秋山廣輔, 間石奈湖, 北條敬之, 大廣洋一, 小野貢伸, 戸塚靖則, 鄭 漢忠, 樋田泰浩, 進藤正信, 佐藤靖史, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における新規予後因子Vasohibin-1の発現解析, 第72回日本癌学会学術総会, 2013.10.4 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
13. Ohga N., Yamamoto K., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Shindoh M., Hida K. : Biglycan is an autocrine angiogenic factor of tumor endothelial cells, The 20th annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012.12. 5-7、あわぎんホール(徳島市・徳島県)
14. 大賀則孝, 山本和幸, 樋田泰浩, 秋山廣輔, 間石奈湖, 川本泰輔, 北山和子, 大澤崇宏, 平野 聡, 篠原信雄, 進藤正信, 樋田京子, : Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour

endothelial cells, 第71回日本癌学会学術
総会, 2012.9.21 北海道大学(北海道・
札幌市)

15. 大賀則孝, 山本和幸, 樋田泰浩, 間石奈湖, 秋山廣輔, 川本泰輔, 大澤崇宏, 進藤正信, 樋田京子: Biglycan is an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells, 第92回北海道医学大会(第106回北海道癌談話会例会 腫瘍系分科会), 2012.9.8
ロイトン札幌(北海道・札幌市)
16. 大賀則孝, 石川修平, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田泰浩, 川本泰輔, 大村瞳, 進藤正信, 樋田京子: 転移能の異なる腫瘍由来の血管内皮の特性解析, 第23回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2012.8.31
東京医科歯科大学(東京都・文京区)
17. 大賀則孝, 石川修平, 樋田泰浩, 秋山廣輔, 間石奈湖, 川本泰輔, 進藤正信, 樋田京子: 転移能の異なる腫瘍由来の血管内皮の特性解析, 第28回日本DDS学会学術集会, 2012.7.3 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔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:
出願年月日:
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

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・名誉教授
研究者番号: 00109456

(2) 研究分担者

大賀 則孝 (OHGA NORITAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 40548202

鄭 漢忠 (TEI KANCHU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 80180066

大廣 洋一 (OHIRO YOICHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号: 40301915

(3) 連携研究者
なし