

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592979

研究課題名(和文) 上皮間葉形質転換能を有する口腔癌幹細胞の同定と癌幹細胞を標的とした新規癌治療開発

研究課題名(英文) Detection of oral cancer stem cell which indicates epithelial to mesenchymal transition and development of new cancer treatment that targeted oral cancer stem cell

研究代表者

中田 憲 (NAKATA, AKIRA)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：50400510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔癌の癌幹細胞の分離・同定を試み、Snail分子を発現した癌幹細胞は上皮間葉形質転換し、浸潤や転移することを明らかにする。

初め、ヒトSnailのcDNA断片を哺乳類培養細胞用発現ベクターに組み込み、舌癌細胞株(HSC4)に遺伝子導入した。敷石状の形態であるHSC4細胞にSnail分子を導入すると、紡錘形の形態に変化し、細胞間の接着は減弱した。次に、培養したHSC4細胞およびHSC4/Snail細胞をヌードマウス背部皮下に移植した。移植3か月間、形成された腫瘍の大きさを評価した。HSC4の由来であるヒト扁平上皮癌に類似した腫瘍形成がみられ、Snailは腫瘍形成の促進に関与した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to detect oral cancer stem cell and clear that a part of cancer cell which gain invasion ability, express "Snail" molecule, indicates epithelial to mesenchymal transition and changes into the favorable character of invasion and metastasis.

First, cDNA of human Snail was included in expression vector for culture cell of mammals and gene was introduced into tongue cancer cell line (HSC4). when Snail molecule was introduced into HSC4 cells that was cobblestone-shaped form, which changes into the spindle-shaped form, and attached weakly between cell to cell. Next, cultured HSC4 and HSC4/Snail cells were transplanted under the back of nude mice. For 3 months of transplantation and the size of the formed tumor were estimated. Tumorigenesis similar to human squamous cell carcinoma which is the history of HSC4 was seen, and Snail participated in promotion of tumorigenesis.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌幹細胞 Snail 上皮間葉形質転換 浸潤 転移 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

近年、再発や転移の原因として「**癌幹細胞仮説**」が提唱されている。この仮説は、腫瘍組織中に自己複製を無限に行う癌幹細胞が存在し、不均等分裂により一部が自己複製のサイクルから逸脱して多系列の分化細胞を供給しながら癌組織を構成する考えである。化学療法や放射線療法で大部分の癌細胞は排除されるが、正常な幹細胞と同様な防御機構を兼ね備えた癌幹細胞は残存し、癌幹細胞そのものが再発部や転移巣などで治療抵抗性の原因であると示唆されている(図1)。

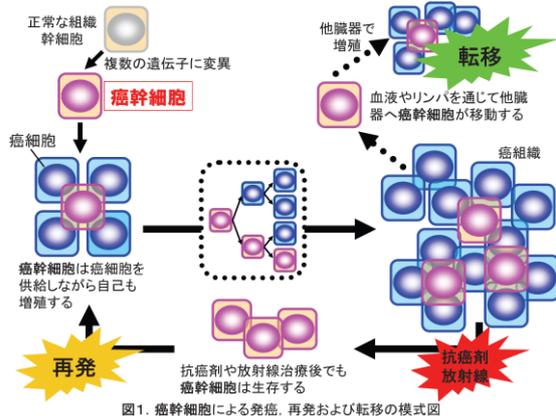


図1. 癌幹細胞による発癌、再発および転移の模式図

すなわち、癌幹細胞を標的とした新しい治療法を確立することは、再発や転移のリスクが少ない癌治療の開発になると期待される。そのためには、癌幹細胞を同定し、癌幹細胞の特性を明らかにすることが重要である。これまで組織幹細胞マーカーを用いた癌幹細胞の同定が行われ、頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞様細胞は、CD44+細胞群の中に存在することが明らかになったが、癌幹細胞の分離・同定には至っていない。

また、浸潤能を獲得した一部の癌細胞は、転写因子である「**Snail**」分子を発現させ上皮間葉形質転換(Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)を示し、浸潤や転移に有利な形質に可逆的に変化することが示唆されている。

2. 研究の目的

申請者は、**Snail** 分子を発現し上皮間葉形質転換能を有する細胞こそが癌幹細胞であると考えている。そこで本研究では、口腔癌の癌幹細胞の分離・同定を試み、**上皮間葉形質転換能は Snail を発現した癌幹細胞の特性**であることを明らかにする。さらに、**Snail** は癌幹細胞周囲の癌免疫を抑制し、より浸潤や転移に有利な環境へと癌幹細胞を遊走させることを証明し、**Snail** や **Snail** に誘導される分子を阻害することで癌幹細胞を標的と

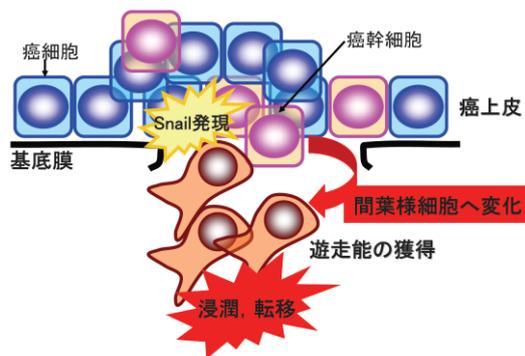


図2. Snailを発現した癌幹細胞の上皮間葉形質転換



図3. 癌幹細胞を標的とした新規癌治療法の開発した新たな癌治療法の開発を目的とする(図2,3)。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌患者の癌組織片の中から幾度となく口腔癌に類似した腫瘍形成を示す新規癌幹細胞の表現型の同定を SCID マウスから SCID マウスへの移植実験で試み、その口腔癌幹細胞が **Snail** 分子を発現していることを明らかにする(図4)。

①本研究に同意が得られた口腔癌患者の臨床検体(1cm³癌組織片)をコラーゲンやヒアルロン酸分解酵素等を使用し細胞を分散させ、口腔癌の **ALDH+CD44+**細胞群などを各種組織幹細胞マーカーを用いてフローサイトメトリーを行い、詳細な表現型の細胞群に選別する。

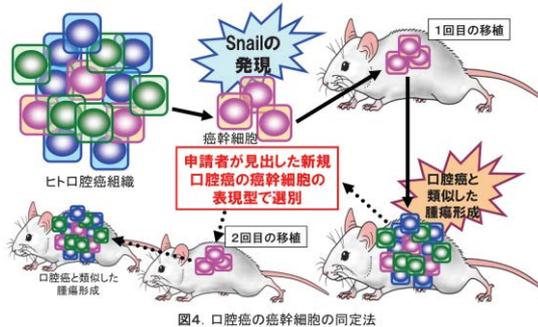
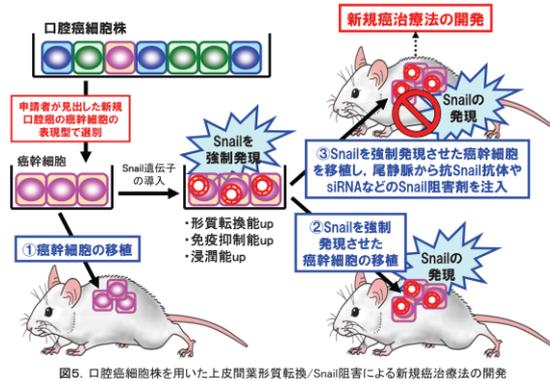


図4. 口腔癌の癌幹細胞の同定法

②詳細に選別した細胞群を回収し、上皮間葉形質転換に関与する **Snail** の発現を RT-PCR 法や免疫細胞学的染色法で検討する。(※**Snail** の発現が確認されない場合には、回収した細胞群を培養し、**CDDP** などの抗癌剤や放射線で細胞を刺激し、再度、**Snail** 発現を検討する)。
③②で **Snail** 発現が確認された細胞群を SCID マウスの背部皮下に移植する。3か月後に移

植部の組織切片を作製し、*in vivo*における口腔癌に類似した腫瘍が形成されるか否かを検討する。さらに、形成された腫瘍が口腔癌に類似していれば、再度①の手順で移植部の腫瘍組織を細胞に分散させ、②で確認される申請者が見出した新規口腔癌の癌幹細胞の詳細な表現型で細胞群を選別し、再度 Snail を発現する口腔癌幹細胞を別の SCID マウスの背部皮下に移植し、口腔癌に類似した腫瘍形成能を検討する。

(2) Snail 分子を発現する癌幹細胞は、浸潤能や転移能を高めるために上皮間葉形質転換を行い、自己の姿を変化させ、周囲の免疫環境を潜り抜けることを口腔癌細胞株を用いて明らかにする。逆に、Snail 分子や Snail に誘導される分子をロックダウンし、癌幹細胞を標的とした新規癌治療法の開発を目指す(図5)。



①申請者が見出した新規口腔癌の癌幹細胞の表現型で口腔癌培養細胞株の中から癌幹細胞を選別し、培養癌幹細胞に Snail 遺伝子を導入し、*in vitro*における Snail が癌幹細胞の上皮間葉形質転換能、免疫抑制能および浸潤能に与える影響を検討する。Snail の上皮間葉形質転換能は、Western blotting で上皮マーカーE-cadherin の発現減弱と間葉マーカーvimentin の発現増強で評価する。Snail の免疫抑制能は、脾臓中の細胞と Snail 導入癌幹細胞を共培養し、脾臓中の細胞が免疫抑制型のT細胞分化を示すか否かで評価する。Snail の浸潤能への影響は、癌細胞浸潤アッセイで評価する。

②癌幹細胞, Snail を強制発現させた癌幹細胞をそれぞれ SCID マウスの背部皮下に移植し、*in vivo*における Snail の癌幹細胞の浸潤能や転移能へ与える影響とマウス個体の悪液質および生存期間に与える影響を検討する。浸潤能と転移能は、移植後1か月, 2か月および3か月にマウス標本を作製し、H-E染色や上皮間葉形質転換に関する免疫組織化学的

染色で評価する。また、悪液質は、定期的に採血を行い、血清中の ALB および CRP で評価する。

③Snail を強制発現させた癌幹細胞を SCID マウスの背部皮下に移植し、癌幹細胞が生着・腫瘍化した後に、抗 Snail 抗体や Snail 特異的 siRNA などの Snail 阻害剤と頭頸部癌に使用される抗癌剤 (CDDP, TXT や 5-FU) をそれぞれ SCID マウスに投与し抗腫瘍効果を比較検討することで、Snail 阻害剤の抗癌性を立証し、口腔癌幹細胞を標的とした再発や転移のリスクが少ない新規癌治療法の開発を総合的に検討する。

4. 研究成果

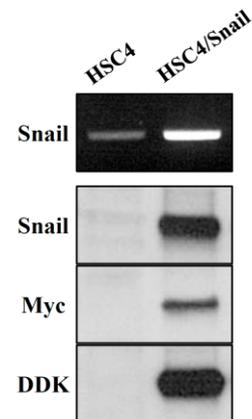
(1) 本研究で作製した細胞



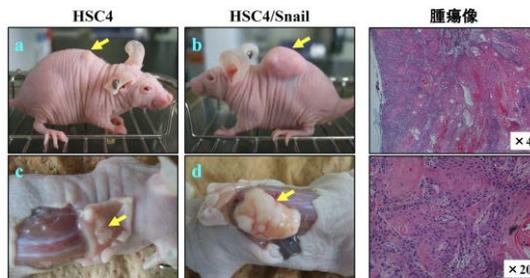
コードされる全領域を含む Snail (human) の cDNA 断片を哺乳類培養細胞用発現ベクターに組み込む。Lipofection 法を用いて、Snail 分子が組み込まれたプラスミドを舌癌細胞株 (HSC4) に遺伝子導入し、G418 が混合された培地で HSC4 変異細胞を作製した(図6)。敷石状の形態である HSC4 細胞に Snail 分子を導入すると、紡錘形の形態に変化し、細胞間の接着は減弱した

(2) 遺伝子とタンパクの強発現

RT-PCR と Western blotting を行い、HSC4 変異細胞の Snail 強制発現を確認した(図7)。



(3) HSC4 変異細胞の移植実験



培養した HSC4 細胞および HSC4/Snail 細胞

のそれぞれ 1×10^6 個をヌードマウス背部皮下に移植した。移植 3 か月間、形成された腫瘍の大きさを評価した (図 8)。また、形成された腫瘍を切除し、4%PFA で固定、パラフィン包埋を行い、組織切片を作製した。H&E 染色で組織学的評価を行った (図 9)。すると、HSC4 の由来であるヒト扁平上皮癌に類似した腫瘍形成がみられ、Snail は腫瘍形成の促進に関与した。

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 18 件)

- 1) 中田 憲, 福田雅幸, 山下貴史, 本間高志, 桑島精一, 高野裕史: 下顎歯肉に発生した腺扁平上皮癌の 1 例, *日本口腔外科学会雑誌*, **60**(4), 193-198, 2014. 査読有
- 2) 福田雅幸: 口腔インプラント百科全書 (分担執筆). クインテッセンス出版, 東京, 印刷中, 2014. 査読無
- 3) 福田雅幸: 日本口腔インプラント学会 (編) 口腔インプラント学学術用語集第 3 版 (分担執筆). 医歯薬出版, 東京, 2014. 査読無
- 4) 福田雅幸: 日本歯科医学会 (編) 厚生労働省委託事業「歯科保健医療情報収集等事業」歯科インプラント治療のための Q&A (分担執筆). 日本歯科医学会, 東京, pp. 8, 2014. 査読無
- 5) 中田 憲, 桑島精一, 大淵真彦, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸: 80 歳以上の高齢者口腔癌に対する選択的動注化学療法 of 臨床的検討. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 72-73, 2013. 査読有
- 6) 高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 桑島精一, 福田雅幸: インプラント義歯により機能改善をおこなった口腔癌切除症例の臨床的検討. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 74-75, 2013. 査読有
- 7) 山崎雅人, 中田 憲, 鈴鹿正顕, 近江龍哉, 谷藤未典, 大淵真彦, 桑島精一, 高野裕史, 福田雅幸: 当科における口腔癌の頸部リンパ節転移診断における PET-CT の有用性に関する臨床的検討. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 70-71, 2013. 査読有
- 8) 谷藤未典, 中田 憲, 近江龍哉, 山崎雅人, 桑島精一, 高野裕史, 福田雅幸: ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対して外科的治療を行った 26 例の臨床的検討. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 9-10, 2013. 査読有
- 9) 近江龍哉, 谷藤未典, 山崎雅人, 桑島精一, 中田 憲, 高野裕史, 福田雅幸: 口腔癌切除後に皮弁再建を用いた症例の術後合併症に対する口腔ケア効果の検討. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 76-77, 2013. 査読有
- 10) 穂積 憲, 長野 玄, 及川瑛明, 佐藤暢也, 桑島精一, 中田 憲, 高野裕史, 鷺谷一晴: PT-INR 測定値を用いたワルファリン服用患者に対する術後出血の検討. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 11-12, 2013. 査読有
- 11) 長野 玄, 鷺谷一晴, 穂積 憲, 及川瑛明, 桑島精一, 高野裕史, 中田 憲: 当院における 8020 運動達成者に関する臨床的研究. *みちのく歯学会雑誌*, **44**(1・2), 70-71, 2013. 査読有
- 12) 福田雅幸: 日本歯科医学会 (編) 歯科インプラント治療指針 (分担執筆). 日本歯科医学会, 東京, pp. 35-36, 2013. 査読無
- 13) 本間高志, 中田 憲, 福田雅幸: 口腔癌に対する皮下埋め込み式リザーバーを用いた逆行性超選択的動注化学療法 of 経験. *頭頸部癌*, **38**(1), 21-25, 2012. 査読有
- 14) Yamazaki M, Kanzaki S, Tominaga K, Miyamoto I, Yamauchi K, Fukuda M, Takahashi T: Evaluation of secondary bone grafting of the alveolar cleft in adult cleft lip and palate patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, **24**(2), 86-89, 2012. 査読有
- 15) 田中清志, 福田雅幸, 成田王彦, 高野裕史, 中田 憲, 古谷博子, 神谷 修: 閉塞型睡眠時無呼吸症候群の治療に用いる口腔内装置の咬合採得器具の使い方. *日本歯科技工学会雑誌*, **32**(2), 109-115, 2012. 査読有
- 16) 谷藤未典, 高野裕史, 濱田知穂, 山崎雅人, 桑島精一, 中田 憲, 福田雅幸: 舌痛症に対する加工ブシ末製剤 (アコノンサン錠™) の効果に関する検討. *みちのく歯学会雑誌*, **42・43**(1・2), 58-59, 2012. 査読有
- 17) 濱田知穂, 高野裕史, 谷藤未典, 山崎雅人, 桑島精一, 中田 憲, 福田雅幸: 病院歯科口腔外科における口腔ケアの医療連携について. *みちのく歯学会雑誌*, **42・43**(1・2), 76-77, 2012. 査読有
- 18) 福田雅幸: 生体内微量元素としての亜鉛

の利用. 秋田大学環境安全センター報, 32, 13-15, 2012. 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 中田 憲, 高野裕史, 小澤 諒, 近江龍哉, 谷藤未典, 山崎雅人, 桑島精一, 福田雅幸: 口腔癌への放射線治療に伴う口腔乾燥症に対するピロカルピン塩酸塩の治療効果に関する臨床的検討. 第 24 回 (社) 日本有病者歯科医療学会総会・学術大会 (2015 年 3 月 21 日, 旭川)
- 2) 中田 憲, 桑島精一, 福田雅幸: 口腔癌幹細胞を標的とした新規癌治療開発に関する基礎的研究. 第 59 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2014 年 10 月 17 日, 幕張)
- 3) 中田 憲, 桑島精一, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸: 当科で経験した原発性骨内扁平上皮癌 7 例に関する臨床的検討. 第 38 回日本頭頸部癌学会 (2014 年 6 月 12 日, 東京)
- 4) 中田 憲, 桑島精一, 谷藤未典, 近江龍哉, 大淵真彦, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸: 80 歳以上の高齢者口腔癌に対する選択的動注化学療法 of 臨床的検討. 第 66 回東北地区歯科医学会 (2013 年 10 月 20 日, 秋田)
- 5) 中田 憲, 山崎雅人, 大淵真彦, 桑島精一, 高野裕史, 福田雅幸: 下顎骨放射線性骨髄炎術後に増殖性の石灰化像が観察された 1 例. 第 58 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2013 年 10 月 12 日, 福岡)
- 6) 中田 憲, 桑島精一, 大淵真彦, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸: 骨頭付き再建用チタンプレートを用いた下顎骨再建術後の形態, 機能および術後合併症に関する臨床的検討. 第 37 回日本頭頸部癌学会 (2013 年 6 月 13 日, 東京)
- 7) 中田 憲, 高野裕史, 福田雅幸: EPA 配合栄養機能食品プロシユアを併用し TPF 療法 8 クール完遂した再発舌癌の 1 例. 第 36 回日本頭頸部癌学会 (2012 年 6 月 7 日, 島根)
- 8) 中田 憲, 桑島精一, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸: 下顎骨半側切除後に骨頭付き再建用チタンプレートを用いて下顎骨再建を行った症例の臨床的検討. 第 66 回日本口腔科学会学術集会 (2012 年 5 月 18 日, 広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 憲 (NAKATA AKIRA)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 50400510

(2) 研究分担者

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)
秋田大学・医学部・准教授
研究者番号: 20272049

杉山 俊博 (SUGUYAMA TOSHIHIRO)
秋田大学・医学部・定年退職
研究者番号: 00127242