

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791806

研究課題名(和文) 癌幹細胞と上皮間葉転換を誘導するシグナル伝達経路を標的とした頭頸部癌治療の研究

研究課題名(英文) A study of head and neck cancer treatment targeting signaling pathway to induce the cancer stem cells and the Epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

佐藤 陽一郎 (Sato, Yoichiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40624440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌において、Oct3/4、Nanogを発現する癌幹細胞様細胞の存在が、細胞遊走能および浸潤能を亢進し、上皮間葉移行(EMT)を誘導した結果、転移をきたしていると考えられた。このことから、Oct3/4、Nanogなどの癌幹細胞をターゲットとした再発・転移抑制の新規治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oct3/4 and Nanog expression putative cancer stem cells with enhanced cell migration and invasion, and then was thought to induce EMT, experiencing the metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. That could lead to new treatment for targeting cancer stem cells, such as oct3/4, Nanog recurrence and metastasis inhibition was suggested.

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 上皮間葉移行 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) EMT (epithelial to mesenchymal transition) と癌転移

EMT とは、上皮細胞が細胞間接着を失い細胞骨格の再構築を行うことにより間葉細胞の性質を獲得する現象で、初期胚発生過程や創傷治癒過程に特有とされる。直接的には E-cadherin などの上皮細胞マーカーの発現抑制と vimentin など間葉細胞マーカーの発現亢進を介し、上皮細胞の紡錘型の形態変化を伴って遊走能・浸潤能が亢進することから、上皮由来癌細胞の浸潤・転移にも寄与していると考えられているが、その機序は多彩である (Kalluri R.; J Clin Invest, 2009)。

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) における浸潤転移能亢進についても初期胚発生過程や創傷治癒と同様に EMT の誘導が寄与していると考えられている。

2) 癌幹細胞と治療抵抗性および癌転移

近年癌組織中にも体性幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有する「癌幹細胞」が存在することが解明されてきた。癌幹細胞は ABC transporter を介した薬剤排泄能が高いこと、細胞周期が停止した G0 期に高率に存在することから、癌の治療抵抗性 (chemoradio-resistance) に寄与すると推定されている。癌幹細胞の抽出方法のひとつである DNA 結合性色素 Hoechst333342 染色を用い、その排泄能の高い細胞群として分画される、即ち癌幹細胞様細胞に相当すると考えられる side population (SP) 細胞は、脳腫瘍、乳癌、膀胱癌、前立腺癌に加え HNSCC でも報告されている (Zhang P; Cancer Letter, 2009)。また癌幹細胞の存在は転移能にも関与していると考えられている。

3) 癌幹細胞と EMT

癌幹細胞の起源について、当初は正常組織内の幹細胞や前駆細胞から直接形質転換すると考えられていた。ところが最近になり、分化の進んだ上皮由来癌細胞においても EMT が誘導される結果、自己複製能や多分化能という幹細胞様の形質が獲得される、という考え方が提唱されている (Singh A; Oncogene, 2011)。この仮説は、TGF- 刺激や E-cadherin 転写抑制因子の導入によって EMT を誘導した不死化乳腺細胞では幹細胞マーカーの発現が亢進し、一方不死化乳腺細胞から抽出された幹細胞分画では EMT マーカーの発現が亢進していたという報告 (Mani S; Cell, 2008) に支持されている。しかしながら EMT マーカーと癌幹細胞マーカーの発現を同時に誘導する分子機構についてはまだ明らかにされて

いない。

浸潤転移のモデルである EMT と、治療抵抗性のモデルである癌幹細胞が関係をしていると近年報告されている。これは EMT を起こしている細胞と癌幹細胞では、発現している遺伝子のパターンが類似していることから、上皮細胞が上皮間葉転換の過程において幹細胞様の性質を獲得する考え方が支持されてきている (Mani, S, et al., Cell, 133:704-715, 2008)。癌幹細胞が成熟癌細胞に比べて EMT を起こしていると考えられるが、癌幹細胞に EMT 誘導を行ったときの EMT 形質の獲得についての頭頸部での報告は少ない。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) における EMT 誘導と癌幹細胞形質の相互関係に着目し、その共通項が新たな治療標的となる可能性を明らかにする。HNSCC において EMT を誘導する多彩な分子機構の中から癌幹細胞形質の獲得にもつながるメカニズムが解明されれば、すなわち癌幹細胞が chemoradio-resistance に寄与するのみならず EMT を介して転移にも寄与していることが証明される。従って、その共通シグナル伝達経路を治療標的とすることにより、治療成績の改善を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞株 HSC4、SAS、SCC4 (舌扁平上皮癌株) に対し上皮間葉移行 (EMT) を誘導し、細胞形態の観察を行い EMT 指標となる因子の変化を確認するとともに癌幹細胞マーカーの発現変化を調べた。

(1) 癌幹細胞の抽出法として、それぞれの細胞株に DNA 結合色素 Hoechst33342 を用いた色素排泄法により flowcytometry にて sorting し、色素排泄能の高い SP 細胞と低い nonSP 細胞を分離させた。

(2) 分離させた SP 細胞と nonSP 細胞での癌幹細胞関連遺伝子の発現を RT-PCR にて比較検討を行った。

(3) 分離させた SP 細胞と nonSP 細胞を in vitro migration assay および in vitro invasion assay を行い、細胞遊走能および浸潤能を調べた

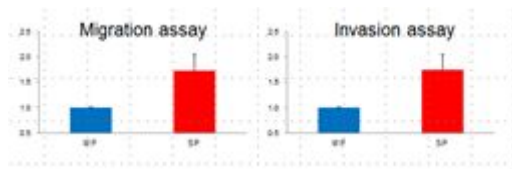
(4) SP 細胞と MP 細胞に対し microarray を行い、EMT 関連因子を比較した。

(5) 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科にて初回治療として舌部分切除のみを行った stage I/II 舌扁平上皮癌症例 37 例の臨床検体において EMT 関連因子、および癌幹細胞マーカーの免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

上述の分離させた SP 細胞と nonSP 細胞での癌幹細胞関連遺伝子の発現を RT-PCR にて比較すると、いずれにおいても転写因子 oct3/4、Nanog の発現が SP 細胞にて強かった。

また in vitro migration assay および in vitro invasion assay を行ったところ、細胞遊走能および浸潤能が SP 細胞において高かったことが確認された。



また、初回治療として舌部分切除のみを行った stage I/II 舌扁平上皮癌症例 37 例の臨床検体において EMT 関連因子の免疫組織化学染色を行ったところ、後発転移をきたした 11 例において細胞接着因子である E-cadherin の発現低下をみとめ、また EMT 関連因子である SIP-1 の発現亢進を認めた。

Immunohistochemistry		DNM - (n=26)	DNM+ (n=11)	p value
CDH1	negative	10	10	0.004
	positive	16	1	
SIP1	negative	23	3	<0.001
	positive	3	8	

Fisher's exact test

この結果から、頭頸部癌(舌癌)において SIP1 が E-cadherin 転写抑制因子となっていると考えられた。

また舌癌後発頸部リンパ節転移は EMT と関連していると考えられた。

以上を踏まえて、SP 細胞における EMT 関連因

子を調べるため SP 細胞と nonSP 細胞に対し microarray を行い比較すると、EMT 関連因子 e-cadherin, SIP1 などはいずれも明らかな差は認めなかったが、前述の臨床検体をさらに症例を追加した 50 例において、癌幹細胞マーカーの免疫組織化学染色を行ったところ、後発転移をきたした 13 症例は Oct3/4 は 8 例、Nanog は 7 例に認め、きたさなかった 37 例に比し、Oct3/4 と Nanog の発現が高いことが確認された。

この結果は EMT を介して後発転移をきたした症例に Oct3/4 と Nanog の発現が関連していた可能性が高いと考えられ、これらを発現する癌幹細胞様細胞の存在が、細胞遊走能および浸潤能の亢進させ、EMT を誘導した結果、stage I/II 舌扁平上皮癌の後発転移をきたしている可能性が考えられた。

このことから、Oct3/4, Nanog などの癌幹細胞をターゲットとした治療が、従来の治療抵抗性の高かった症例や再発・転移抑制に対する新規治療につながる可能性が示された。

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) 羽生 昇, 今西順久, 坂本耕二, 大塚邦憲, 佐藤陽一郎, 渡部佳弘, 小川 郁, 徳丸 裕, 藤井正人 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞様細胞マーカーの発現とその臨床的意義に関する検討 第 51 回日本癌治療学会学術集会(京都) 2013/10/26
- (2) 羽生 昇, 今西順久, 徳丸 裕, 富田俊樹, 坂本耕二, 重富征爾, 佐藤陽一郎, 渡部佳弘, 藤井正人, 小川 郁 頭頸部扁平上皮癌におけるがん幹細胞様細胞の存在と marker の発現に関する検討 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会(札幌) 2013/5/18
- (3) Noboru Habu, Yori-hisa Imanishi, Koji Sakamoto, Yutaka Tokumaru, Masayuki Shimoda, Kaori Kameyama, Yoichiro Sato, Seiji Shigetomi, Toshiki Tomita, Kaoru Ogawa, Masato Fujii: Expression of stem cell markers Oct3/4 and Nanog and its clinical significance in oral tongue SCC. The 8th International Conference on Head and Neck Cancer at MetroToronto Convention Centre/Toronto 2012.7.24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 陽一郎 (Sato Yoichirou)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40624440

(2) 研究協力者

今西 順久 (Imanishi Yori-hisa)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80255538

渡部 佳弘 (Watanabe Yoshihiro)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30445374