

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33902  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2013～2016  
 課題番号：25462940  
 研究課題名(和文) 口腔扁平上皮がんの浸潤転移、薬剤耐性におけるがん幹細胞ならびに上皮間葉移行の役割  
  
 研究課題名(英文) Role of cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition in the invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma  
  
 研究代表者  
 後藤 満雄 (Goto, Mitsuo)  
  
 愛知学院大学・歯学部・講師  
  
 研究者番号：60645191  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)において、がん幹細胞(CSC)や上皮間葉移行(EMT)と転移・浸潤との関連は明らかにされていない。本研究ではPodoplanin(PDPN)に注目し、CSC形質やEMT形質発現における役割を検討した。実験にはOSCC株親株、CSC亜株、EMT亜株を用いた。PDPNの発現はEMT亜株で明らかに低かった。親株とCSC亜株はPDPNノックダウンにより分化が誘導され、増殖が抑制された。PDPN発現はTGF- $\beta$ /Smad2経路を介して誘導された。PDPNはCancer stemnessの維持に重要な役割を担っているのに対し、EMT形質発現には関わっていないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSC) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) are reportedly involved in tumor invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, molecular base of this relationship remains unclear. Here, we focused on podoplanin (PDPN) to investigate its role in cancer stemness and EMT of OSCC. We developed a panel of UMSCC81B cell lines including parent cells, CSC subline, and EMT subline. PDPN expression of parent and CSC cells was significantly higher than EMT cell. In vitro analysis revealed that PDPN expression of parent and CSC cells was down-regulated by HDAC inhibitors, whereas expressions of differentiation markers were up-regulated by the HDAC treatment. Knockdown of PDPN induced differentiation and suppressed cell growth. TGF- $\beta$  induced PDPN expression. These results suggest that PDPN plays some important role in maintaining cancer stemness but not maintenance of EMT phenotype. PDPN would be a new therapeutic target for cancer stem cell of OSCC.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮がん 低分化がん CSC/EMT podoplanin TGF- $\beta$  PI3K/Akt経路 分子標的薬

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮がん(OSCC)は80%以上の症例でEGFRの発現上昇が認められる。EGFR抗体薬のCetuximabは有意な生存期間延長効果が認められ、2006年に米国FDAで承認されている。しかし、その感受性(抵抗性)予測因子は明らかにされていない。近年、抗がん剤のみならず分子標的治療薬に対する耐性機序として、一部のがんではがん幹細胞(CSC)や上皮性がん細胞が肉腫様に変化し、浸潤・転移能を獲得する上皮間葉移行(EMT)が関連することが報告されている。しかし、OSCCにおいてがん幹細胞やEMTと浸潤・転移や薬剤耐性との関連に関する詳細な研究は殆どなされていない。

Wntシグナル経路は、大腸がんなど複数のがんなどでは遺伝子変異により恒常的にWntシグナルが活性化され、複合体からのリン酸化を回避した $\beta$ -cateninが細胞質で安定化し、free  $\beta$ -catenin となって核へと移行することにより、転写因子が活性化されて、がんの増殖、浸潤が促進されることが知られている。また近年、がん幹細胞マーカーの多くがWntシグナルの標的であることも報告され、がん幹細胞を標的とするWntシグナル阻害剤の開発も行われている。申請者(後藤)らはこれまでにOSCCにおいても免疫組織化学的に癌細胞の核に $\beta$ -cateninが蓄積していること、免疫沈降実験によりリン酸化されていない核移行性のあるfree  $\beta$ -cateninが多量に存在していることから、OSCCの中にもWntシグナルの亢進ががんの発生や転移の原因になっているものがあることを明らかにしてきた。また、 $\beta$ -cateninの核移行に参与するタンパクとして、Rasスーパーファミリーの一員である低分子量Gタンパク質Rap1について解析し、その結果、Rap1と $\beta$ -cateninのタンパク質間相互作用により、Rap1が $\beta$ -cateninの核移行を促進させ、TCF4を介して種々の転写活性を増強させることを明らかにした(Goto, et al., Clin Cancer Res, 2010)。以上からWntシグナルはOSCCの浸潤・転移性やがん幹細胞やEMTの形質維持に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されていた。

一方、分担研究者の中西らは多数の頭頸部扁平上皮癌細胞株のがん幹細胞やEMT形質を検討し、UMSCC81B株がCD44/podoplanin/Oct4/Sox2などの頭頸部癌におけるがん幹細胞マーカーを発現すると同時に、vimentin/snailが陽性でEMT形質も同時に示すことを明らかにし、本株がEMTとがん幹細胞の性質を併せ持つ細胞株であることを明らかにした。また、このUMSCC81B細胞株にGefitinibを反復投与し、Gefitinib耐性株を作成したところ、その細胞の一部が線維芽細胞様の形態に変化を示し、E-cadherinの発現が消失、vimentinが強発現するというEMT形質を示す細胞株(UMSCC81B-Fb)を樹立した。本株のEMTは

Snailの発現亢進に依存しており、それにはAkt/GSK-3シグナルが関与していることを明らかにした(Br J Cancer, 2012)。

以上の2つの知見を総合して考えると、UMSCC81B-Fb細胞株のEMTにおいてみられるAkt/GSK-3シグナルの亢進が、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルに影響し(クロストーク)、Rap1による $\beta$ -cateninの核移行と転写の活性化が引き起こされ、がんの増殖、浸潤性が活性化されていく一つの可能性が示唆された。また、UMSCC81B-Fb細胞ではEGFRのDown regulationが認められることから逆に、EMTやGefitinib耐性獲得には上記EGFRシグナル経路を代償する経路としてWntシグナルが関与し、Akt/GSK-3シグナルが活性化される可能性も示唆された。

### 2. 研究の目的

OSCCを含む頭頸部扁平上皮癌においては抗EGFR抗体(Cetuximab)の生存延長効果が報告されているが、耐性獲得がしばしば認められ、その克服が臨床上的大きな課題である。近年、がん幹細胞およびEMTは転移・浸潤のみならず、上記抗癌剤耐性にも関連しているとして注目されている。しかし、OSCCにおいてはがん幹細胞やEMTの詳細な分子機序は不明である。本研究ではOSCCにおける浸潤・転移や薬剤耐性におけるがん幹細胞やEMTの役割を明らかにし、その分子メカニズムの一端としてWnt/ $\beta$ -cateninシグナル経路の関与とOSCCの幹細胞マーカーであり、かつ浸潤転移と密接に関連することが報告されているpodoplaninの役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)OSCC株からがん幹細胞形質及びEMT形質を示す亜株の分離と細胞パネルの作成

がん幹細胞亜株はverapamil処理の有無によるSP(side population)画分のFACS sortingにより、またEMT亜株はin vitroにおける薬剤処理(Gefitinibなど)を繰り返すことにより、薬剤耐性を示す細胞の中から線維芽細胞様の形態を示す細胞を顕微鏡下でリングクローニングする手法により分離した。

(2)上記細胞パネルを用いたWnt/ $\beta$ -cateninシグナルやEGFR/Akt/GSK-3シグナル等のin vitro解析

Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル経路の検索として免疫蛍光染色による $\beta$ -cateninの核、細胞膜局在を検討した。また $\beta$ -cateninの核移行タンパクRap1の発現をRT-PCR法により、Wnt/ $\beta$ -catenin経路及びEGFR/Akt/GSK-3シグナル経路はウエスタンブロット等により検討した。

(3)OSCCのがん幹細胞マーカーであるPodoplaninのがん幹細胞ならびにEMTにおける役割の解析

UMSCC81B 細胞親株、UMSCC81B-SP 株及び UMSCC81B-Fb 株の Podoplanin 発現、がん幹細胞形質、分化形質などの解析を免疫染色、RT-PCR 法、ウエスタンブロット、siRNA などを用いたノックダウン法などの方法を用いて行なった。

#### 4. 研究成果

(1) OSCC 株からがん幹細胞あるいは EMT 形質を示す亜株の分離と細胞パネルの作成

OSCC 株の UMSCC81B 親株から SP 画分を FACS sorting により分離し、これから安定して増殖する亜株 (UMSCC-SP) の作成を行なった。この亜株は Oct4, ALDH, Nanog などのがん幹細胞マーカーを高発現しており (RT-PCR 法で確認) UMSCC81B 株からがん幹細胞亜株を樹立することに成功した。また上記 UMSCC81B 親株から Gefitinib 処理により線維芽細胞様の形態を示し、E-cadherin 発現低下および Vimentin 高発現などの EMT 形質をしめす UMSCC81B-Fb 株を既に樹立していたが、これに EGFR を強制発現させることにより上皮分化形質を部分的に回復した細胞株を作製した。このように UMSCC81B 親株からそのがん幹細胞亜株及び EMT 亜株などからなる細胞パネルを作成した。しかしながら、他の OSCC 細胞株である HSC-3 株からは上記と同様な方法ではがん幹細胞亜株/EMT 亜株の分離は達成できなかった。これは細胞株の Heterogeneity の違いに基づくものと考えられるが、詳しい理由は不明で、今後の課題である。

(2) 親株/がん幹細胞/EMT 株における Wnt/ $\beta$ -catenin と Akt/GSK-3 シグナル経路の解析

UMSCC81B 親株、UMSCC81B-SP 細胞及び UMSCC81B-Fb 細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路を免疫蛍光染色で検討したところ、いずれの細胞も  $\beta$ -catenin の局在は細胞膜であり、核移行像はほとんど認められなかった。またいずれの細胞とも  $\beta$ -catenin の核移行に関与するタンパク Rap1 の発現 (RT-PCR 法) もほとんど認められなかった。さらに OSCC の外科切除材料を用いて  $\beta$ -catenin の発現を免疫組織学的に検討したところ、角化型 OSCC における  $\beta$ -catenin の発現は上記細胞株と同様、ほぼ例外なく細胞膜であり、細胞質や核での発現は殆ど認められず、ごく一部の OSCC 例に例外的に核内蓄積が認められたにすぎなかった。このことから、当初の予想に反して、UMSCC81B 親株、がん幹細胞亜株、及び EMT 亜株を含め大部分の OSCC では  $\beta$ -catenin は大腸がんのように核移行を介した転写制御には関与しておらず、主として細胞接着に関与している可能性が示唆された。

以上から当初の予想とは異なり、UMSCC81B 細胞の EMT 亜株である UMSCC81B-Fb 細胞における PI3K/Akt/GSK-3 経路の恒常的活性化に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路が EGFR シグナルの代償経路として関与している可能性

及びその逆の可能性も殆どないものと考えられた。

上記した様に、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路が少なくとも今回作成した OSCC 細胞株パネルにおいて、またおそらく大部分の OSCC において、がん幹細胞形質や EMT 発現には重要な役割を果たしている可能性は少ないと判断されたため、これ以上の解析は中止し、以後研究は OSCC のがん幹細胞形質維持や EMT 形質発現に関わっている可能性が示唆される Podoplanin の機能解析を中心に行なった。

(3) がん幹細胞マーカーである Podoplanin の OSCC のがん幹細胞ならびに EMT における役割の解析 (図 1、図 2)

Podoplanin は OSCC においてがん幹細胞形質と浸潤転移に関与していることが報告されているがその詳細は明らかではない。上記 UMSCC81B 親株、がん幹細胞形質を示す UMSCC81B-SP 亜株及び EMT 形質を示す UMSCC81B-Fb 亜株などを用いて Podoplanin の機能解析を行った。その結果、親株及び UMSCC81B-SP 細胞においては TGF- $\beta$ /Smad2 経路によりその発現が制御されていることが判明した。また Podoplanin は Sodium butyrate や Trichostatin などの HDAC 阻害剤により発現が抑制され、分化が促進されること、さらに siRNA による Podoplanin のノックダウンにより分化が促進され、増殖が阻害されることから Podoplanin ががん幹細胞形質の維持に重要な役割を果たしていることが判明した。一方、EMT 形質は Podoplanin 発現の強弱によって有意な影響を受けず、Podoplanin 非依存的であることも明らかになった。

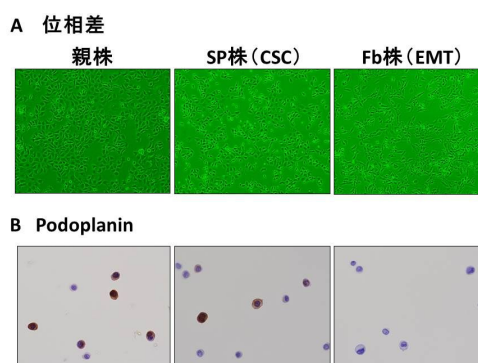
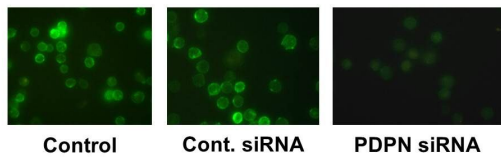
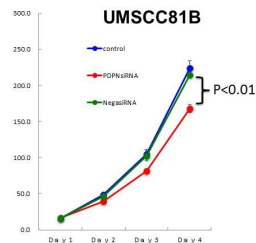


図1 UMSCC81B細胞パネル

### A Podoplanin expressions



### B Cell growth inhibition



### C

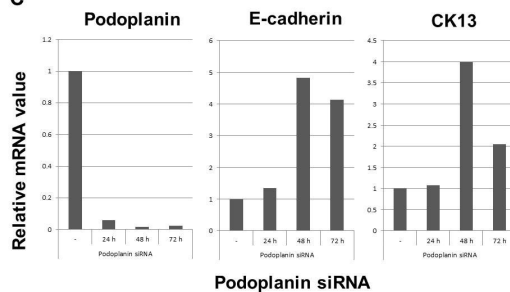


図2 Podoplaninノックダウンによる細胞分化と増殖への影響

Podoplanin の発現は正常扁平上皮では幹細胞が存在するとされる基底細胞のみに認められること、また口腔がんでは角化型扁平上皮がん比べ、血行性転移能やリンパ行性転移能が高い低分化型扁平上皮がんが発現が高いことなど、がん幹細胞や転移と密接な関連があることが臨床的にも知られている。

以上のことから Podoplanin は OSCC のがん幹細胞維持に中心的な役割を果たし、口腔がんの浸潤転移に関与している可能性が強く示唆されたのに対し、EMT には殆ど関与していないものと考えられた。従来、がん幹細胞形質と EMT 形質には密接な関連があることが示唆されていたが、今回の結果からがん幹細胞形質と EMT は OSCC においては区別して考える必要があると思われた。

今後の方向; Podoplanin に対する抗体薬などによる Podoplanin 阻害はがん幹細胞を標的とする口腔がんに対する新しい治療法になりう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 14 件)

Tsuji C, Watanabe H, Nakayama H, Goto M, Kurita K: A Case of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in a Patient with Subpontic Osseous Hyperplasia. *Case Rep Dent.* 2017; Article ID: 9659761. DOI: 10.1155/2017/9659761. 査読有

Watanabe H, Kurita K, Nakayama A, Umemura E, Ogita M, Goto M, Ariji E: Computed Tomographic Estimation of Particulate Cancellous Bone and Marrow Weight for Successful Transplant in Unilateral Cleft Lip and Palate Patients. *Cleft Palate Craniofac J.* 2017 May; 54(3): 327-333. DOI: 10.1597/15-193. 査読有

Makihara H, Inaba H, Enomoto A, Tanaka H, Tomono Y, Ushida K, Goto M, Kurita K, Nishida Y, Kasahara K, Goto H, Inagaki M: Desmin phosphorylation by Cdk1 is required for efficient separation of desmin intermediate filaments in mitosis and detected in murine embryonic/newborn muscle and human rhabdomyosarcoma tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep; 478(3): 1323-1329. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.122. 査読有

Makihara H, Goto M, Watanabe H, Sugita Y, Ariji Y, Maeda H, Kurita K: Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders of the minor salivary gland: a case report. *Oral and Maxillofacial Surgery Cases.* 2016 Sep; 2(3): 27-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.omsc.2016.08.001>. 査読有

Goto M, Hanai N, Ozawa T, Hirakawa H, Suzuki H, Hyodo I, Kodaira T, Ogawa T, Fujimoto Y, Terada A, Kato H, Hasegawa Y: Prognostic factors and outcomes for salvage surgery in patients with recurrent squamous cell carcinoma of the tongue. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2016 Mar; 12(1): e141-8. DOI: 10.1111/ajco.12087. 査読有

Goto M, Saito T, Kuroyanagi N, Sato H, Watanabe H, Kamiya N, Kurita K, Shimozato K: Intraosseous lymphoma of the oral and maxillofacial regions: Report of our experiences, involving some difficult cases to be diagnosed. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology.* 2016

Jan; 28(1): 41-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2015.05.013>. 査読有

Saito T, Nakanishi H, Mochizuki Y, Ito S, Ito Y, Misawa K, Yatabe Y, Yamamichi K, Kondo E. Preferential HER2 expression in liver metastases and EGFR expression in peritoneal metastases in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015 Oct;18(4):711-9. DOI: 10.1007/s10120-014-0417-4. 査読有

Ariji Y, Goto M, Fukano H, Sugita Y, Izumi M, Ariji E: Role of intraoral color Doppler sonography in predicting delayed cervical lymph node metastasis in patients with early-stage tongue cancer: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Feb; 119(2): 246-53. DOI: 10.1016/j.oooo.2014.10.021. 査読有

Nakata S, Tanaka H, Ito Y, Hara M, Fujita M, Kondo E, Kanemitsu Y, Yatabe Y and Nakanishi H. Deficient HER3 expression in poorly-differentiated colorectal cancer cells enhances gefitinib sensitivity. *Int J Oncol*. 2014 Oct;45(4):1583-93. doi: 10.3892/ijo.2014.2538. 査読有

Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y and Nakanishi H. Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric cancer*, 2014,17(3):450-62. DOI: 10.1007/s10120-013-0290-6. 査読有

Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H. New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. *Gastric cancer*.2014;17(3):497-507. DOI: 10.1007/s10120-013-0316-0. 査読有

Yusa A, Toneri M, Masuda T, Yamamoto S, Okochi M, Ito S, Kondo N, Iwata K, Ichinosawa Y, Kinuta S, Honda H, Arai F, Nakanishi H. Development of a New Rapid Isolation Device for circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Palladium Filter and Its Application for Genetic Analysis. *PLoS One*. 2014 Feb 11;9(2):e88821. DOI: 10.1371/journal.pone.0088821. 査読有

Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H,

Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*.2014;110(2);469-478. DOI: 10.1038/bjc.2013.748. 査読有

Murakami H, Ito S, Tanaka H, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H. Establishment of New intraperitoneal paclitaxel-resistant gastric cancer cell lines and comprehensive gene expression analysis. *Anticancer Res*. 2013;33(10):4299-307. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

後藤満雄、宮地 斉、落合栄樹、渡邊 哲、宮部 悟、齋藤輝海、欄 真一郎、中西速夫、下郷和雄：口腔扁平上皮癌における Podoplanin 発現とがん幹細胞形質との関連に関する実験的検討．第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会．2017 年 1 月 26 日～27 日、福岡国際会議場 福岡県福岡市．

Goto M, Makihara H, Ohta M, Maseki S, Hasegawa Y, Yoshida K, Nakanishi H, Kurita K: Role of podoplanin expression and its potential as a targeting molecule for oral squamous cell carcinomas. 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. 2015 Oct 27-30, Melbourne Australia.

Goto M, Makihara H, Ohta M, Abe A, Maseki S, Nakanishi H, Kurita K: Biological significance and regulation of podoplanin expression in oral squamous cell carcinomas. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 96th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition. 2014 Sep 8-13, Honolulu, Hawaii USA.

〔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：  
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

後藤 満雄 (GOTO, Mitsuo)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：60645191

##### (2) 研究分担者

中西 速夫 (NAKANISHI, Hayao)  
愛知県がんセンター・遺伝子病理診断部・  
医長  
研究者番号：20207830

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )