

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463106

研究課題名(和文) 口腔がん幹細胞ニッチを標的とした新しい治療方法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment strategy targeting for vascular niche of oral cancer stem cell

研究代表者

大廣 洋一(OHIRO, Yoichi)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40301915

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)：1)悪性腫瘍細胞株を用いてがん幹細胞と成熟がん細胞を分離した。2)マウス移植モデルから腫瘍血管内皮細胞(TEC)を分離した。3)CSCとTECとの共培養、およびCSCへのTEC培養上清(TEC-CM)処理をおこなった。これにより、CSCにおいて生存シグナルAktやNF- $\kappa$ Bの活性化がおこることがわかった。CSCにおいていくつかの幹細胞マーカーの発現が変化し、またがん細胞のアポトーシスが阻害されていること示唆された。さらに、高転移性腫瘍組織から分離したTECと共培養した際に、より大きなspheroidを形成し、TECによるanoikis抵抗性が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSC) or matured cancer cells were fractionated from cancer cell lines. Tumor endothelial cells (TEC) were separated from transplanted tumors in vivo model. CSC were co-cultured with TEC or treated with TEC conditioned media (TEC-TM). These experiments revealed that activation of survival signal such as Akt or NF- $\kappa$ B, alteration of expression levels of CSC markers and inhibitory effect against apoptosis were induced in CSC. Furthermore, co-cultivation of CSC with TEC separated from highly metastatic tumor induce the formation of large spheroid or inhibitory effect for anoikis by TEC.

研究分野：外科系歯学

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 がん幹細胞 薬剤抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

(本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ)

(1) 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た。

(2) 申請者は、これまで口腔がんにおいてもがん幹細胞が存在することを一連の研究において明らかにしてきた(戸塚・基盤研究 A 2008-2011)。

(3) 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。

(4) また、近年血管内皮が癌幹細胞の高い生存能、自己複製能といった幹細胞性の維持、促進に関わっていることが示唆されている。(Calabrese C., Cancer Cell, 2007, Yang Zj, Cancer Cell, 2007)

(5) Vascular Niche における血管内皮細胞は癌幹細胞へ栄養、酸素の供給だけでなく、生理活性因子(Angiocrine Factor)を分泌することで癌幹細胞の維持調節を行っていることが知られている。

われわれは、これまでに腫瘍血管内皮細胞では正常血管内皮にくらべ COX2 や SDF-1, IL-6 発現などの様々な Cytokine の発現が亢進していることを報告してきた。(Ohga Hida et al., Am J Pathol 2012, Akiyama, Hida et al, Am J Pathol 2012). このような腫瘍血管が分泌するサイトカインは周囲のがん細胞や周囲の間質細胞にパラクラインによって何らかの作用をもたらす可能性があることも見出している。

また、腫瘍血管内皮細胞の性質ががんの悪性度によって異なることも報告している(Ohga Am J Pathol 2012). これらの成果より、口腔がん幹細胞と口腔がん血管内皮の間にも crosstalk が存在しているのではないかとこのことを着想するにいたった。

口腔がんにおいても、がんの転移と再発は大き

な問題である。これらに影響を及ぼすとされるがん幹細胞の Vascular Niche が果たす役割を解明することで、口腔がん幹細胞 Vascular Niche を破壊し、効率的に口腔がん幹細胞を標的とする治療法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

がん幹細胞は抗がん剤や放射線治療への抵抗性や癌の再発などと密接に関係しており、これらを制御することは重要な問題となっている。近年、がん幹細胞は腫瘍血管の近傍に存在していることが報告されている。しかし、口腔がんにおいてがん幹細胞の住みか(ニッチ)(Vascular Niche)が形成されるメカニズムは不明である。本研究では、口腔がん幹細胞と口腔がん血管内皮細胞との相互作用を解析し、口腔がん幹細胞の維持に腫瘍血管内皮が果たす役割を検討し、口腔がん幹細胞の Vascular Niche を標的とした新しいがん治療法の開発の基盤的研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔癌におけるがん幹細胞 (CSC) と腫瘍血管内皮細胞 (TEC) の局在を解析する。

(2) 口腔癌における CSC の薬剤抵抗性、未分化性の維持ならびに抗 apoptosis 能(anoikis に対する抵抗性)に口腔がん由来 TEC がどのように関与しているかを解明する。

(3) TEC 由来の angiocrine factor の制御ならびに Vascular Niche を制御することで、がん幹細胞を効果的に攻撃できる方法を探る。

## 4. 研究成果

(1) 口腔がん臨床サンプルにおけるがん幹細胞の局在解析: 口腔がんにおけるがん幹細胞の局在を CD133, CD44, ALDH, PSF-1 をもちいた組織免疫染色で明らかにし、腫瘍血管との位置関係を解析した。

(2) がん幹細胞の分離: ヒト舌癌をはじめとして異なる転移能をもつ悪性腫瘍細胞株を用いて CD133, CD44, SP 分画ならびに ALDH 活性など

によりがん幹細胞と成熟がん細胞を分離した。

(3) 腫瘍血管内皮細胞の分離: 上記口腔がん腫瘍株のマウス移植モデルから腫瘍血管内皮細胞を CD31 抗体と CD45 抗体とを用いて FACS aria 2 により CD31+CD45- の分画として分離した。

(4) 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。さらに ALDEFLUOR(商品名)キットを用いて ALDH の活性を計測し, Hoechst

33342 を用いて FACS Aria 2 により Side population を解析する。さらに anoikis 抵抗性を spheroid assay により確認した。

(5) 細胞内活性酸素の測定: 分離・培養したがん幹細胞ならびにがん細胞における細胞内活性酸素を FACS Aria-2 により測定し比較・解析したところ, がん幹細胞により高い活性酸素の蓄積が見られた。

(6) 分離後のがん幹細胞(CSC)と腫瘍血管内皮(TEC)との相互作用解析(薬剤抵抗性) CSC と TEC との共培養, および CSC への TEC 培養上清(TEC-CM)の処理を行い, シスプラチンなどの抗がん剤に対する抵抗性の変化をコントロール群と比較検討した。

(7) 分離後の CSC と TEC との相互作用解析(足場非依存性) CSC と TEC との共培養, および CSC への TEC 培養上清(TEC-CM)の処理を行い, 低血清条件下で spheroid assay をおこない anoikis 抵抗性の変化をコントロール群と比較検討した。

(8) 分離後の CSC と TEC との相互作用解析(未分化性維持) CSC と TEC との共培養共培養, および CSC への TEC 培養上清(TEC-CM)の処理を行い, CSC が non-CSC へ分化せず, 未分化細胞として維持されるかをコントロール群と比較検討する。解析には PCR 法とフローサイトメーターを用いて, がん幹細胞の幹細胞マーカー(CD133, CD44, SP 分画, ALDH 活性)の発現を確認した。

(9) 幹細胞を多く含むがん細胞集団と腫瘍血管内皮(TEC)との相互作用解析(薬剤抵抗性)をおこなった。がん細胞への TEC 培養上清(TEC-CM)の処理を行い, がん幹細胞性集団の生存シグナル Akt や NF- $\kappa$ B の活性化がおこることがわかった。現在 TEC 由来分子の同定を試みている。

(10) がん幹細胞性集団と TEC との相互作用解析(足場非依存性)を解析した。幹細胞集団の多い高転移性腫瘍組織から分離した TEC と, 幹細胞性の少ない低転移性腫瘍組織から分離した TEC とがん細胞を非接着性のプレ-において共培養した。高転移性腫瘍組織から分離した TEC と共培養した際に, 良い大きなスフェロイドを形成し, またがん細胞のアポトーシスが阻害されていることが示唆された。TEC による anoikis 抵抗性が誘導されることが示唆された。

(11) がん幹細胞性集団と TEC との相互作用解析(未分化性維持)を行った。TEC の培養上清により, がん細胞においていくつかの幹細胞マーカーの発現が変化した。その機序に関わる分子について現在検討中である。

## 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 10 件)

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 (査読あり)
2. Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and \*Hida K.: CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836 2015 (査読あり)
3. Ara MN, Hyodo M, Ohga N, Akiyama K., Hida K, Hida Y, Shinohara N, Harashima H. Identification and expression of troponin T, a new marker on the surface of cultured tumor endothelial cells by aptamer ligand. *Cancer Med.* 2014 Aug;3(4):825-34. doi: 10.1002

- /cam 4.260. Epub 2014 May 9. PubMed PMID: 24810801 (査読あり)
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*. 2014 May;105(5):560-7. doi: 10.1111/cas.12394. Epub 2014 Apr 19. PubMed PMID: 24602018 (査読あり)
  5. Alam MT, Nagao-Kitamoto H, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Taketomi A, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*. 2014 Dec;105(12):1533-40. doi: 10.1111/cas.12549. PubMed PMID: 25283635. (査読あり)
  6. Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Ohiro Y, Totsuka Y, 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*. 2014 Apr;31(4):1547-54. doi: 10.3892/or.2014.3017. PMID: 24534848 (査読あり)
  7. Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Hida Y., Kitayama K., Kawamoto T., Osawa T., Suzuki Y., Shinohara N., Nonomura K., Shindoh M., \*Hida K. : The F-prostaglandin receptor is a novel marker for tumor endothelial cells in renal cell carcinoma, *Pathol Int*, 63(1), 37-44, 2013 DOI: 10.1111/pin.12031 (査読あり)
  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 (査読あり)
  9. 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 (査読あり)
  10. 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 (査読あり)

(学会発表) (計 14 件)

1. 大麿洋一: 反復処置法による角化嚢胞性歯原性腫瘍の治療. 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 日口外誌 61 (総会特別号): p64, 2015 年 10 月 16-18 日, 「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」.
2. 北條敬之, 間石奈湖, Mohammad T Alam, 秋山廣輔, 大賀則孝, 進藤正信, 樋田泰浩, 藤澤俊明, 樋田京子: ROS による biglycan 発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.10, 「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」.
3. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本(永尾)宗子, Mohammad Alam T., 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.8, 「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」.
4. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, The European Cancer Congress 2015, 2015.9.27 「Vienna, Austria」
5. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31, 「北海道大学学術交流会館(北海道・札幌)」.
6. Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Shinohara N., Taketomi A. : Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31, 「北海道大学学術交流会館(北海道・札幌)」.
7. 北條敬之, 間石奈湖, 秋山廣輔, 大賀則孝, 進藤正信, 樋田泰浩, 藤澤俊明, 樋田京子: 活性酸素種による Biglycan 発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31, 「北海道大学学術交流会館(北海道・札幌)」.
8. 大麿洋一: エナメル上皮腫に対する反復処置法について. 第 69 回日本口腔外科学会学術集会, プログラム・抄録集 p122, 2015 年 5 月 13-15 日, 「大阪国際会議場(大阪府・大阪市)」.
9. 大麿洋一: 反復処置法による角化嚢胞性歯原性腫瘍の治療, 日口外誌 60 (総会特別号): 65, 2014. 第 59 回日本口腔外科学会総会, 2014 年 10 月 17-19 日, 「幕張メッセ(千葉県・千葉市)」.
10. 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, 23-27, September, 2014, 「Prague (Czech Republic)」.

11. Torii T, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Hojo T, Ohiro Y, Ono M, Totsuka Y, Tei K, Hida Y, Shindoh M, Sato Y and Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. The 18th International Vascular Biology Meeting, 14-17, April, 2014 「都メッセ(京都府・京都)」.
12. Ohiro Y, Totsuka Y and Tei K: Dredging Method - A Conservative Approach for the Treatment of Keratocystic Odontogenic Tumor. 第 26 回台湾口腔外科学会学術大会, 8-9, March, 2014, 「Tainan(Taiwan)」.
13. 大廣洋一, 栗林和代, 足利雄一, 小野貢伸, 進藤正信, 鄭 漢忠: 局所進行口腔癌における術前 DOC・CDDP 併用放射線療法の有用性. 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 プログラム・抄録集:222, 2014. : 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2014 年 1 月 23, 24 日, 「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)」.
14. Torii C, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Hojo T, Ohiro Y, Ono M, Totsuka Y, Tei K, Hida Y, Shindoh M, Sato Y and Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor in oral squamous cell carcinoma.抄録掲載なし, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 「パシフィコ横浜(神奈川・横浜)」.

〔図書〕(計 1 件)

1. 樋田京子, 大賀則孝, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田泰浩: 腫瘍血管内皮細胞の多様性, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 ~ 慢性炎症とがん, 5(1), 北隆館, 158-164, 2016(分担執筆)

〔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

大廣 洋一(OHIRO, Yoichi)  
北海道大学・歯学研究科(研究院)・講師  
研究者番号: 40301915

### (2) 研究分担者

秋山 廣輔(AKIYAMA, Kousuke)  
北海道大学・遺伝子制御研究所・客員研究員  
研究者番号: 10609100  
鄭 漢忠(TEI, Kanchu)  
北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 80180066

### (3) 連携研究者

なし( )

研究者番号: