

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861523

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞マーカーCD44 isoform変化は悪性度を規定する

研究課題名(英文) Cancer stem cell marker CD44 isoform changes in head and neck squamous cell carcinoma to define the grade

研究代表者

川崎 洋平 (Kawasaki, Yohei)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：00644072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線療法は頭頸部癌において生命予後の改善に大きな貢献をしてきた。しかし、中には放射線耐性のものもあり、そこには癌幹細胞の存在が示唆されている。頭頸部癌幹細胞のマーカーとしてはCD44が広く知られている。放射線照射によって、CD44に変化が生じているのかを検討した。5つの細胞株に60Gyの照射を行い、前後でisoformの変化をフローサイトメーターで確認したところ、CD44stdは減少、CD44v6は不変又は増加、CD44v3は増加していることがわかった。今後このisoformの変化が悪性度に寄与しているのかを詳細に検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Radiation therapy has been a major contribution to the improvement of life prognosis in head and neck cancer. However, There is also something of radiation resistance in, there is the existence of cancer stem cells has been suggested. It is widely known CD44 as a marker of head and neck cancer stem cells. By radiation, it was examined whether there occurs a change in CD44. The five cell lines was subjected to irradiation 60Gy, was confirmed by flow cytometer change of isoform before and after, CD44std decrease, CD44v6 is unchanged or increased, CD44v3 was found to have increased. It is necessary to consider in detail whether the change of this isoform contributes to malignancy in the future.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：癌幹細胞 CD44 放射線

1. 研究開始当初の背景

(1)頭頸部扁平上皮癌における放射線療法は、その予後改善に大きな役割を果たしている。感受性の良いものは放射線のみで根治可能である。一方で、放射線耐性の扁平上皮癌もしばしば経験する。明らかに効果のないものや、肉眼的に消失したと思われたものでもすぐに再発したる所に転移巣を作りだすものもある。そこに癌幹細胞というものの存在が関与しているのではないかと考える。現在、癌幹細胞マーカーとして有名なのがCD44という表面マーカーである。CD44には約20種類以上のisoformが解明されている。しかし、SCIDマウスに癌細胞を皮下移植して作らせた固形癌を抗CD44モノクローナル抗体で染色しても、ほぼ全てが陽性となってしまう。癌幹細胞はCD44isoformの発現を詳細に検討していく必要があると考えた。また、放射線を照射することでisoformの変化が起こり、悪性度が増すものや低悪性度になるものが出てくるのではないかと考えた。

(2)治療に先だつての予後因子マーカーの特定も重要である。放射線療法と手術療法を施行された頭頸部扁平上皮癌60例の生検検体を用意している。臍細胞で発見されたREG- (Regenerating gene)とその予後の関連が述べられており、抗REG-モノクローナル抗体で染色したものと5年生存率を比較検討する事も同時に行った。

2. 研究の目的

(1)日常診療と同じく、頭頸部扁平上皮癌細胞株に60Gyの放射線照射を行う。照射前と後のCD44isoformの変化をフローサイトメーターで調べる。照射によって上昇するisoformと減少するisoformが出てくると思われ、それが癌の悪性度に寄与するのかを調べる。

(2)食道癌ではREG-の発現は放射線感受性が高まると言われるが、肺扁平上皮癌や胃癌などでは5年生存率が下がると言われる。頭頸部扁平上皮癌とREG-の発現が5年生存率と関係があるかを調べる。REG-が予後因子となるかを確認する。

3. 研究の方法

(1)ヒト口腔底扁平上皮癌細胞株HO-1-u-1, 上顎歯肉扁平上皮癌細胞株Sa3, ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC2, ヒト舌扁平上皮癌細胞株HSC3, ヒト舌扁平上皮癌細胞株HSC4の5種類をRPMI1640で培養した。75mmフラスコを用いて、毎日2Gyの照射を行った。Sub confluentの状態を維持して施行した。その後、何度か継代を行い照射後の再発癌または治療抵抗性癌と見立てた。

(2)未照射の株と、60Gy照射後の株をAnti-Human CD44v3(RSD), Anti-Human CD44 std(e-Bio), Anti-CD44 Variant6(RSD)を用いてラベリングしてフローサイトメーターで発現を調べた。

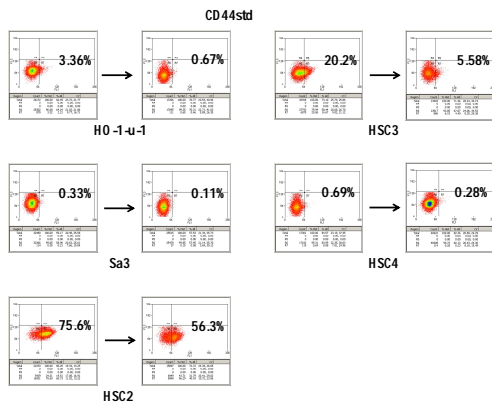
(3)24-Well invasion assay kitと96-well cell transformation kit, 24-Well migration kit(CELL BIOLABS, INC)で浸潤能と遊走能を評価する。

(4)SCIDマウスに同所移植し、造腫瘍能・転移能を調べる。

(5)生検検体を抗REG-モノクローナル抗体で染色して、Image Jで蛍光強度を解析して5年生存率と比較する。

4. 研究成果

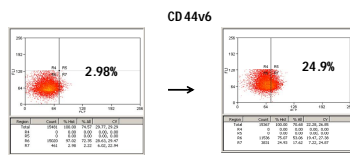
(1)CD44stdについて



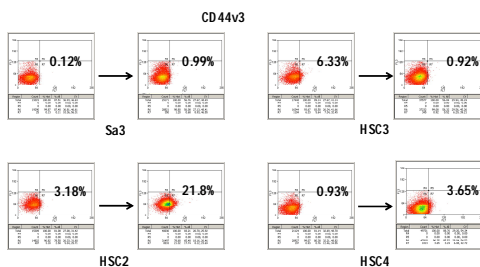
放射線照射を行うと、**全ての細胞株で CD44std の減少が確認**できた。

CD44v6 について

HSC2 のみ大幅な発現上昇をみる事ができた。HO-1-u-1, Sa3, HSC3, HSC4 ではわずか数%の発現のみで、照射前後で変化はなかった。



CD44v3 について



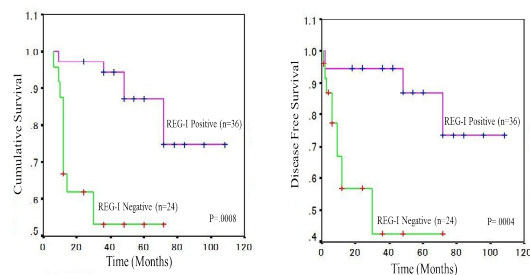
HO-1-u-1 は 1%台で前後に変わりなかった。**HSC2 は CD44v3 の発現の上昇**をみたが、**HSC3 は逆に減少**した。Sa3, HSC4 は**上昇**していた。

この様に**照射前後で、isoform の変化が起こっていることがわかった**が、特に HSC2 は全ての isoform で変化が大きかった。現在、invasion assay と migration assay を繰り返し検討を重ねているところである。どの isoform が悪性度を規定しているのかは、それらの実験と併せてソーティングも行い決定すべきである。**照射後に、CD44std が減少していく事にどのような意味があるのか、また照射後に上昇傾向にある CD44v3 が重要な役割を演じている事が予想され、今後は CD44v3 の役割を中心に検討を重ねていきたい。**

(REG- について)

生検検体を抗 REG- 抗体で染色し、Image J で 0~9 で点数化し、6 以上を positive とした。

REG- 発現と5年生存率



REG- の発現が高ければ予後が良いことがわかり、予後マーカーの1つとして有用である事が示唆された。

Erika P. Reategui *et al.*
Characterization of CD44v3 containing
isoforms in head and neck cancer, *Cancer
Biology & Therapy* 5:9, 1163-1168, 2006

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)

Yasufumi Omori, Yohei Kawasaki, *et al.*
Cytoplasmic connexin32 and
self-renewal of Cancer Stem Cell:
Implication in Metastasis
HEPATOCELLULAR CARCINOMA
BASIC RESEARCH 235-252 (2012) 査読
有

Yohei Kawasaki *et al.* Cytoplasmic
accumulation of connexin32 expands
cancer stem cell population in human
HUH7 hepatoma cells by enhancing its
self renewal
INT. J. Cancer 128, 51-62 (2011) 査読有

Kohei Honda, Yohei Kawasaki, *et al.*
Sentinel lymph node biopsy using
computed tomographic lymphography in
patients with early tongue cancer
Acta Oto-Laryngologica; early online, 1-6
査読有

[学会発表](計 5 件)

第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会、5 月、
東京

川寄洋平、モハメドアボシャニフ、他
(2015) 頭頸部扁平上皮癌における REG
の発現と予後

第 73 回日本癌学会、9 月、横浜
モハメドアボシャニフ、川寄洋平、他
(2014) 頭頸部癌における REG の発現と
予後の関係

第 38 回日本頭頸部癌学会、6 月、東京

川寄洋平、モハメドアボシャニフ、他
(2014) 頭頸部癌における REG の発現の
意義

第 24 回日本頭頸部外科学会、1 月、高松
川寄洋平、本田耕平、他 (2014) 下咽頭原
発腺様嚢胞癌の 1 例

第 25 回日本フローサイトメトリー学会
学術集会、7 月、東京

川寄洋平、大森泰文(2015) 頭頸部扁平上皮
癌における CD44isoform の変化は悪性度
を規定する

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

(1)研究代表者

川寄 洋平 (KAWASAKI Yohei)

秋田大学・大学院医学研究科 耳鼻咽喉科
頭頸部学講座・助教

研究者番号: 00644072