

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861909

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における癌幹細胞の治療抵抗性機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cancer stem cells to chemoradio resistance in human oral squamous cell carcinoma

研究代表者

谷口 貴洋 (Taniguchi, Takahiro)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：40444012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. 癌組織中で自己複製能と分化能を有する少数の癌幹細胞(CSCs)は、化学療法や放射線療法に対して抵抗性を有しているがその分子機構は明らかになっていない。この耐性機構を解明のため最初に癌細胞株からのCSCsマーカーの分離・同定を目的として各種細胞株を無血清+EGF/bEGF添加培地にて培養すると、CSCsの比率が増加することを確認した。

2. 口腔腫瘍における細胞増殖と分化度の関連性の検索のため、COX2とKi-67抗体を用いて免疫染色を行い、COX2の発現と腫瘍細胞の局所進展及び分化度との間に相関性が認められることを報告した(Exp Ther Med. 2016)

研究成果の概要(英文)：1. It has recently been reported that cancer stem cells (CSCs) is responsible for tumorigenesis, invasion, metastasis and chemo-radio resistance. We confirmed the increasing number of CSCs according to sphere formation in conditioned serum-free culture medium with epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF).

2. COX-2 was expressed in oral tumors, and significant positive correlation was found between Ki-67 and COX-2 expressions. It may contribute to local extensions by increasing the proliferations of their odontogenic epithelial cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：癌幹細胞 扁平上皮癌 口腔腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌組織中には自己複製能と分化能を有する少数の癌幹細胞 (Cancer stem cells; CSCs) が存在し、これが中心となって癌組織が形成・維持されているということが明らかとなってきている。

(2) 一方で CSCs は再発や転移における主体的役割を果たす細胞であるだけでなく、放射線や化学療法に対して治療抵抗性を有することが報告されている。即ち CSCs は癌の源であり、今後の癌治療における根治的療法に対する標的細胞として捉えられてきているが、その詳細は分子機構は明らかにはなっていないのが現状である。

(3) 本研究代表者は、抗癌剤である docetaxel の口腔扁平上皮癌細胞におけるアポトーシス誘導機構について研究を行い報告している (T. Taniguchi. et al. *Int J Mol Med.* 2005; 15:667-673)、さらに、COX-2 阻害剤による口腔扁平上皮癌の抗癌剤および放射線感受性増強の機構の解析を行ってきた (科学研究費補助金:若手研究(B)平成 20-21 年度、課題番号 20791489)。これらの知見を基に本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 口腔扁平上皮癌の CSCs における治療抵抗性の機構を解明すること。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株の CSCs における、化学療法、放射線療法による細胞増殖因子受容体、細胞の生存やアポトーシス等に関わる MAP キナーゼカスケードおよびアポトーシス関連分子の動きを検索し、治療抵抗性の機構を解明するとともに、新たな分子標的治療薬などを開発すること。

(3) さらに、従来の治療に対して抵抗性を示す CSCs に、効果的に細胞死へ導く方法を見出すことで従来の治療よりも再発率や転移の抑制効果を期待することができようになる。この研究の成果が臨床応用されることで、将来の癌治療の発展 (生存率の向上、癌の根治等) と QOL の向上に寄与することを最終的な目的としている。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株の CSCs における治療抵抗性機構解明のために以下を計画した。

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株からの癌幹細胞マーカー陽性細胞の分離・回収、超免疫不全マウスへの移植による CSCs の確認

(2) CSCs の化学療法や放射線療法抵抗性と細胞シグナル伝達分子の変化の確認

・CSCs の回収については、報告された方法

(Serum free medium に EGF および bFGF を加えたもので培養することで、CSCs の割合が 2% から 40% に増加 Okamoto et al. *Oral Oncol* 2009; 45:633-639) を用いて確認後・回収を行う

(3) 細胞シグナル伝達分子の阻害、過剰発現が治療抵抗性に与える影響の計測

・lipofection 法による導入か、すでに報告のある (*Mol Ther.* 2004 Jul; 10(1):162-171.)

Adenovirus Vector 等による導入を検討

・上記で抵抗性抑制効果のあった分子に関してはノックダウンした細胞を NOD/SCID マウスに移植し、in vivo での効果を検討

(4) 口腔腫瘍における COX-2 の発現と腫瘍細胞増殖との関連性について、免疫組織学的に検討する

(5) 当院手術標本における CSCs マーカーの免疫組織化学的検索と治療結果との関係

・CSCs の指標とされる CD44、CD133、ALDH 等について免疫組織化学染色を行い、化学療法、放射線療法の治療効果および生存率、再発との関係について検討する

(6) リンパ節転移モデルマウスを樹立し、本モデルを用いて転移経路の検出・可視化を行う。さらに転移関連遺伝子の発現の変化について評価する

4. 研究成果

(1) 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、CSCs マーカーとして報告されている CD44、CD133、ALDH 抗体を用いてラベルを行いフローサイトメトリーを用いて陽性細胞率を検索し CSCs を回収したが、いずれのマーカーでも陽性細胞率は低率であった。そのため、Okamoto らの報告に基づいて血清無添加 + EGF/bEGF 添加培地を用いて同様に行った所、大凡 20~30% 台で陽性細胞の回収効率の向上を図ることができた

(2) 本研究と並行して、口腔腫瘍における細胞増殖と分化度との関連性の検索のため、腫瘍標本検体を用いて Cyclooxygenase-2 (COX-2) と Ki-67 抗体を用いた免疫染色を行い、以下の通り報告した

① COX-2 が口腔腫瘍細胞に発現しているおり、その内 70% 以上が中等度以上の発現率であったこと

② COX-2 と Ki-67 との発現率に有意に相関性を認め、COX-2 の発現と腫瘍細胞の局所進展及び細胞分化度との間で相関性が確認されたこと

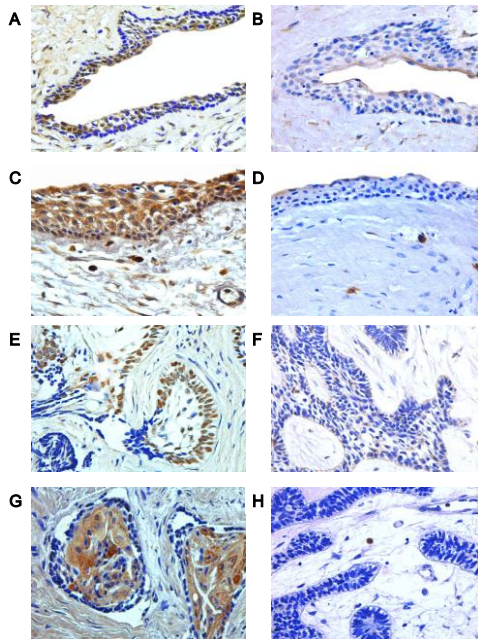


Figure. 1

Fig. 1 口腔腫瘍におけるCOX-2の発現解析

		Oral tumors (n=17)
		No (%)
COX-2		16 (94.1)
	Weak	5 (29.4)
	Mild	9 (52.9)
	Strong	2 (11.8)

Table. 1 口腔腫瘍におけるCOX-2発現率

Oral tumors	
	Ki-67
COX-2	0.656
	$p=0.004$

Table. 2 口腔腫瘍におけるCOX-2とKi-67の発現の相関性

M. A. Alsaegh, H. Miyashita, T. Taniguchi, S. R. Zhu.
Odontogenic epithelial proliferation is correlated with COX-2 expression in dentigerous cyst and ameloblastoma.
Exp Ther Med. 2016. In press

(3) さらに口腔癌のリンパ節転移マウスモデルを用いた転移経路に関する研究では、連携研究者が以下に示す通り、学会での発表・報告を行った

①本研究に用いられたマウスモデルの特徴と新たな口腔癌転移経路の検出法について

- ・一般的にヒトとマウスの細胞の大きさはほぼ同一と言われている。今回リンパ節転移モデルの作成のため、ヒトと同等のリンパ節サイズを有するマウス系統の樹立を行った
- ・マウスモデル; MXH10/MO-*lpr/lpr* mouse
- ・このモデルを用いてリンパ節転移の形成過程についての解析を行った

②リンパ節介在性血行性転移という概念とその可視化について

- ・従来、転移様式にはリンパ行性転移と血行性転移が報告されていた
- ・しかしながら本マウスモデルを用いた解析では、リンパ節周囲の静脈を介しての転移経路の可視化に成功し、リンパ節介在性血行性転移 (Lymph node-mediated hematogenous metastasis) の存在が示唆された

③口腔癌細胞接種後に転移巣を形成するまでの時間について

- ・遠隔転移巣の形成における転移リンパ節の影響を検討するため、腸骨下転移リンパ節を切除した後の肺転移巣を形成するまでの時間について評価
- ・Control に比べて早期に転移リンパ節を切除した群 (転移リンパ節切除後 6 時間&3 日間) で、有意に肺転移形成率の増大が認められた。一方切除後 6 日後では一転して転移形成率が減少した

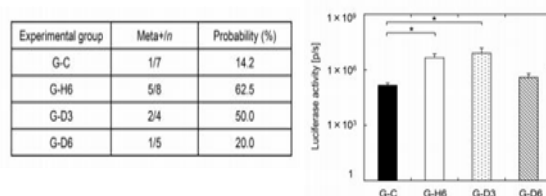


Table. 3 転移リンパ節切除後時間と肺転移率との関係

④癌転移の可視化と各種転移関連遺伝子の発現及びその分子機構との関連

- ・上述のリンパ節介在性血行性転移について、青色色素と蛍光色素を用いてリアルタイムに検出を行い、その同定に成功した
- ・肺転移巣における、リンパ管内皮細胞マーカーの抗体 Anti-human lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 antibody (LYVE-1)を用いた免疫染色を行い、転移リンパ節切除後 3 日間で生じた肺転移層巣で陽性の発現が認められた

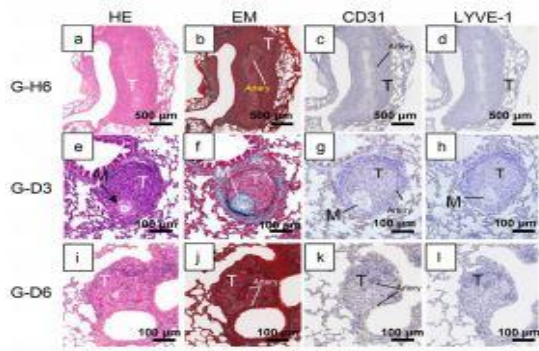


Fig.4 肺転移巣における LYVE-1 抗体を用いた免疫組織染色結果

T.Kodama, S Mori et. al.
BBRC. 2015;460. 543-548
J Immunol Methods. 2013; 389. 69

以上より本研究では、リンパ節介在性血行性転移という新たな転移経路の存在を証明すると共に、転移リンパ節がその重要な起始点となり得ることが示唆された

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 1 件)

①Mohammed Amjed Alsaegh, Hitoshi Miyashita, Takahiro Taniguchi, Sheng Rong Zhu. Odontogenic epithelial proliferation is correlated with COX-2 expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. **Experimental and Therapeutic Medicine.** 査読有 2016. In press.

[学会発表] (計 1 件)

①H.Miyashita et. al. Emerging concept of oral cancer metastasis induced from analysis of a cancer metastasis model. **The 22nd International Conference on Oral and maxillofacial Surgery (ICOMS)** 2015.10.27-30. Melbourne (Australia).

[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

谷口 貴洋 (TANIGUCHI Takahiro)
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：40444012

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

宮下 仁 (MIYASHITA Hitoshi)
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：70372323