

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861929

研究課題名(和文) 口腔癌幹細胞を標的とした分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the molecular target therapy that assumed oral cancer stem cell a target

研究代表者

濱田 正和 (Hamada, Masakazu)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：80506361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規の分子標的薬の開発には目覚ましいものがある。しかし、口腔癌に対する分子標的治療は開発が遅れている。そこで、治療に抵抗して生残り、再発の原因となる癌幹細胞を治療対象とし、新たな分子標的をターゲットとした研究を進めて行くことが重要である。癌幹細胞マーカーとしてCD44陽性細胞を抽出し、sphere形成が出来ること確認した。Safingolによる細胞死は、抗酸化剤で抑制されることから、活性酸素が関与すること、その過程にendo Gのミトコンドリアから核へのトランスロケーションが関係することが分かった。Endo Gは口腔癌に対する分子標的となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in a molecular target therapy are remarkable. However the molecular target therapy for oral cancer is delayed. So it is important to study new molecular target, such as cancer stem cell, which have resistance for cancer treatment and is the cause of any recurrence. We isolated CD44(+) cells as cancer stem cell marker, the formation of sphere cells could be observed. Antioxidant prevent the apoptosis of oral SCC cells by safingol. These results suggest that H2O2 is involved in the nuclear translocation of the mitochondrial factor of endo G. Endo G may be useful as a molecular target in cases of oral SCC.

研究分野：口腔癌

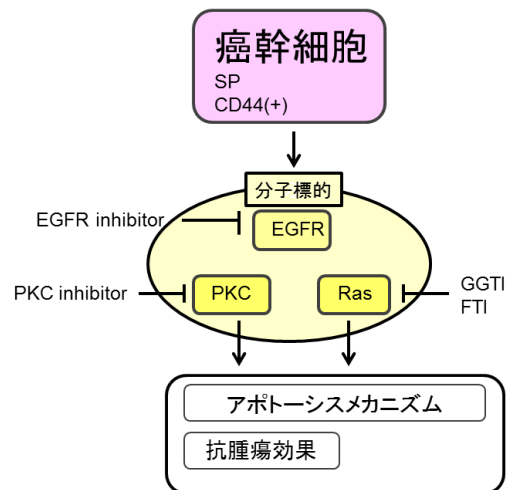
キーワード：癌幹細胞 分子標的治療

### 1. 研究開始当初の背景

新規の分子標的薬の開発には目覚ましいものがある。しかし、口腔癌に対する分子標的治療は他領域の悪性腫瘍に比べて開発が遅れており、まだ始まったばかりである。大きな期待が持たれた EGFR をターゲットとした分子標的治療も、従来の治療を大きく凌駕する結果は得られていない。そこで、治療に抵抗して生残り、再発の原因となる癌幹細胞を治療対象とし、新たな分子標的をターゲットとした研究を進めて行くことが重要である。癌幹細胞は組織再生への応用を期待される組織幹細胞と同様、自己複製能を有して癌細胞を供給し、癌組織を維持するもので、1994年にヒト急性骨髄性白血病において初めて報告され、癌幹細胞のマーカとして CD24、CD34、CD44、CD133、CD166などが現在知られている。頭頸部癌では2007年に癌幹細胞としての性格を示す細胞群が報告されて、CD44が癌幹細胞マーカとして知られている。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、これまで分子標的として発癌プロモーターの細胞内受容体であるプロテインキナーゼ C(PKC)に着目し、その阻害剤である safinol による口腔癌細胞の caspase 非依存的アポトーシスを明らかにしてきた。今回、これら新規の分子標的薬の作用メカニズムを口腔癌の癌幹細胞を用いた研究を行うことを目的とした。



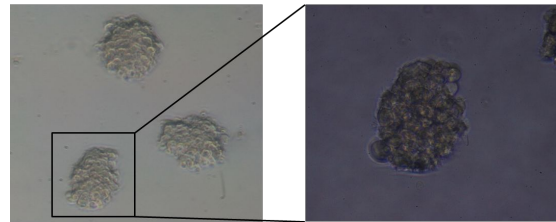
### 3. 研究の方法

各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いた。癌幹細胞マーカである CD44 陽性細胞の抽出は MAC 社の CD44 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて行った。Sphere Formation assay は無血清培地に bFGF(Fibroblast Growth Factor-Basic human)、EGF(Epidermal Growth Factor)を各々 20 ng/ml 加え、Ultra-Low Attachment 6 well plate(Corning, NY)にて、培養を行い、観察を行った。薬剤は safinol、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、抗酸化剤である NAC、PEG-catalase を用いた。生死細胞はトリパンブルー色素排除

試験法にて判定し、アポトーシス細胞は Annexin V 染色にて検出した。Endo G の検出をイムプロット法、蛍光免疫染色は共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

### 4. 研究成果

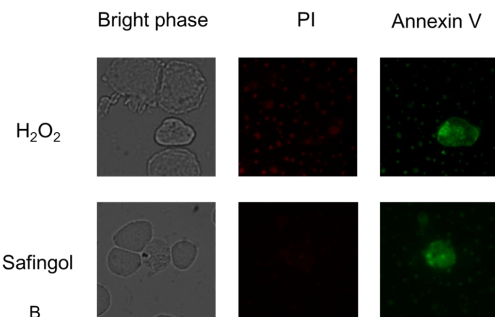
(1) 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用い、MAC 社の CD44 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて CD44 細胞を抽出し、Sphere 形成能を見たところ、Sphere 形成が起こることを確認した。



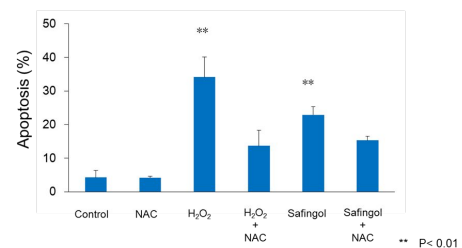
(2) また、各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いて、PKC 阻害剤 safinol による endoG を介する caspase 非依存的アポトーシスにおける活性酸素種(ROS)の役割を検討した。

safinol または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理すると、アポトーシスの誘導がみられた。抗酸化剤で前処理すると、この作用は阻害された。

A

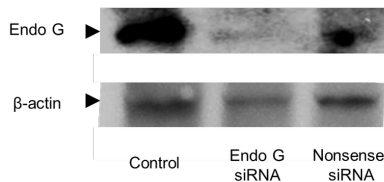


B

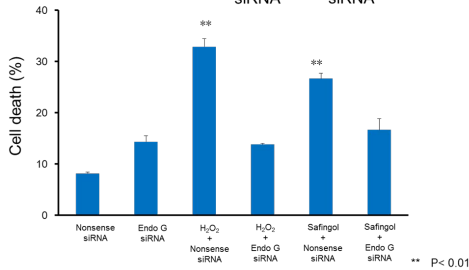


endo G siRNA をトランスフェクションした細胞では、saferingol または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるアポトーシスは抑制された。

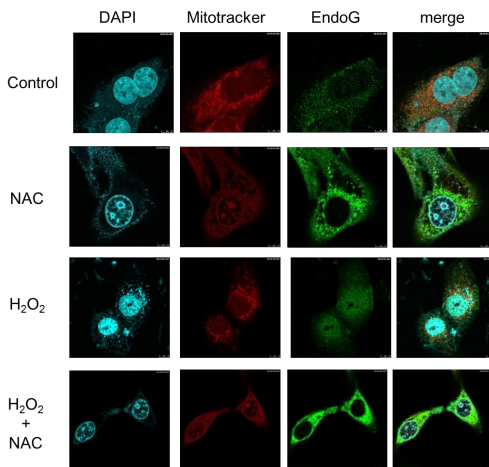
A



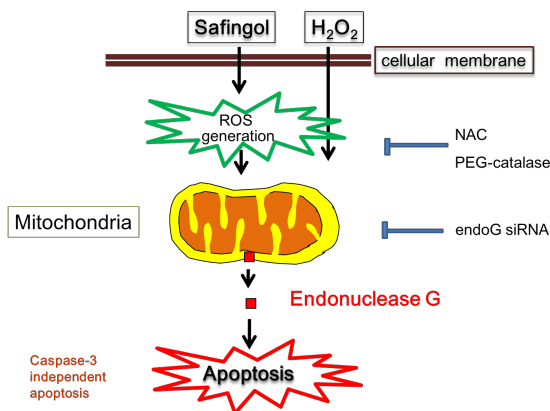
B



saffingol または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理すると、endo G のミトコンドリアから核へのトランスロケーションがみられた。NAC で前処理すると、この作用は阻害された。



以上のことから、saffingol による細胞死は、抗酸化剤で抑制されることから、活性酸素が関与すること、その過程に endo G のミトコンドリアから核へのトランスロケーションが関係することが分かった。Endo G は口腔癌に対する分子標的となると考えられた。



## 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 6 件)

Takahashi G, Meshii N, Hamada M, Iwai S, Yura Y. Sequence of a fusogenic herpes simplex virus, RH2, for oncolytic virotherapy. *J Gen Virol.* (査読有) 94: 726-737, 2013. DOI: 10.1099/vir.0.044834-0.

Meshii N, Takahashi G, Okunaga S, Hamada M, Iwai S, Takasu A, Ogawa Y, Yura Y. Enhancement of systemic tumor immunity for squamous cell carcinoma cells by an oncolytic herpes simplex virus. *Cancer Gene Ther.* (査読有) 20: 493-498, 2013. DOI: 10.1038/cgt.2013.45.

Takeshita A, Iwai S, Morita Y, Niki-Yonekawa A, Hamada M, Yura Y. Wnt5b promotes the cell motility essential for metastasis of oral squamous cell carcinoma through active Cdc42 and RhoA. *Int J Oncol.* (査読有) 44: 59-68, 2014. DOI: 10.3892/ijo.2013.2172.

Inaba H, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A. Porphyromonas gingivalis promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cell Microbiol.* (査読有) 16: 131-145, 2014. DOI: 10.1111/cmi.12211.

Hamada M, Miki T, Wakabayashi K, Iwai S, Yonekawa A, Yura Y. Combinational effect of a geranylgeranyltransferase-1 inhibitor and PKC inhibitor on human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg Med and Pathol.* (査読有) 26: 122-127, 2014. DOI: 10.1016/j.ajoms.2012.12.009

Hamada M, Wakabayashi K, Masui A, Iwai S, Imai T, Yura Y. Involvement of hydrogen peroxide in saffingol-induced endonuclease g-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* (査読有) 15: 2660-2671, 2014. DOI: 10.3390/ijms15022660.

[学会発表](計 11 件)

三木依子, 濱田正和, 岩井聡一, 由良義

明 超音波照射が抗体薬 Cetuximab の口腔扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果に及ぼす影響 日本口腔科学会 2013.5.23. 栃木

Hamada M, Iwai S, Niki-Yonekawa A, Yura Y. PKC inhibitor safinol as a candidate for the treatment of oral SCC cells with geranylgeranyltransferase I inhibitors 日本癌学会 2013.10.4. 横浜

竹下彰範、岩井聡一、仁木敦子、森田祥弘、濱田正和、奥長秀介、岩上隆紀、中澤光博、由良義明 Wnt5bはCdc42とRhoAを介して口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能を亢進する 日本口腔外科学会 2013.10.11. 福岡

竹下彰範、岩井聡一、仁木敦子、森田祥弘、濱田正和、岩上隆紀、由良義明 Wnt5bは口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能を亢進する 日本口腔組織培養学会 2013.11.23-24. 東京

榊井 敦史、濱田 正和、高須 彩子、岩井聡一、由良 義明 Safingol による口腔扁平上皮癌細胞の傷害におけるオートファジーの関与 日本口腔科学会 2014.5.9. 東京

榊井敦史、濱田正和、若林健、高須彩子、岩井聡一、由良義明 口腔扁平上皮癌細胞に対する活性酸素を介したendonuclease Gによるアポトーシス誘導機構 日本頭頸部癌学会 2014.6.12. 東京

Yura Y, Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S: Low-intensity ultrasound as a method to improve the effect of oncolytic virotherapy on oral cancer. The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Annual Meeting, September 8-13 (11), 2014, Hawaii Convention center, Honolulu, USA

Masui A, Hamada M, Wakabayashi K, Iwai S, Yura Y: Induction of apoptosis and autophagy of oral squamous cell carcinoma cells by safinol. The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Annual Meeting AAOMS Annual Meeting, September 8-13 (11), 2014, Hawaii Convention center, Honolulu, USA

濱田正和、若林健、榊井敦史、岩井聡一、今井智章、由良義明 口腔扁平上皮癌細胞

に対する活性酸素を介した Endonuclease Gによるアポトーシス誘導機構 日本口腔外科学会 2014.10.17. 千葉

榊井敦史、濱田正和、高須彩子、若林健、岩井聡一、由良義明 PKC 阻害剤 safinol によるアポトーシスとオートファジー誘導に関する検討 日本口腔外科学会 2014.10.18. 千葉

榊井敦史、濱田正和、高須彩子、若林健、岩井聡一、由良義明:PKC 阻害剤 safinol によるオートファジーの誘導に関する検討 日本口腔組織培養学会 2014.11.15. 福岡

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

濱田 正和 (HAMADA MASAKAZU)

大阪大学・歯学部附属病院・招へい教員

研究者番号：80506361