

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461694

研究課題名(和文) SP細胞を標的とした皮膚癌幹細胞同定と解析：癌根治への新戦略

研究課題名(英文) Identification and characterization of skin cancer stem cells

研究代表者

村尾 和俊 (MURAO, Kazutoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授

研究者番号：40363171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚有棘細胞癌では腫瘍全体の1～2%の割合で癌幹細胞候補であるSP細胞が存在していた。この結果は化学発癌SCCを用いたマウスの結果とほぼ同様であった。SP細胞とnon-SP細胞との腫瘍増殖能の検討は、フローサイトメトリーで回収できたSP細胞の数が最高640と少なく、免疫抑制マウスへの移植実験、in vitroでのspheroid assay、三次元培養皮膚モデルでもうまくできなかった。このためCD98の発現を次に検討した。SCCでは2/3の症例で浸潤部もしくは腫瘍辺縁部でCD98が発現していた。SP細胞においては2/3ほどがCD98を発現していた。

研究成果の概要(英文)：There was a distinct population called side population cells about 1 to 2 % of human SCC cells, which was almost identical results with chemically induced mouse SCC. To determine the capacity of tumorigenesis of SP cells, I sorted 640 SP cells and non-SP cells, and tried to compare their tumorigenicity by in vitro assay, but non worked well. Next, I investigated the expression of CD98 in human SCC. About two third of SCC cells expressed CD98. To determine the relationship between SP cells and CD98 expression, I performed dual staining of Hoechst dye and CD98. Most of SP cells expressed CD98. I could not detect any SP cells in melanoma cell line or dermatofibrosarcoma protuberans cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚癌 有棘細胞癌

1. 研究開始当初の背景

なぜ癌を克服することができないのか？
 従来、癌とは正常な細胞に複数の遺伝子異常が蓄積し、これがクローナルに増殖することで生じ、各々の癌細胞はいずれも同等の悪性度、生物学的態度を有すると考えられてきた (clonal expansion)。しかし近年、正常組織が組織特異的幹細胞を頂点としたヒエラルキーを有しているように、癌にも癌幹細胞が存在し、癌幹細胞が癌組織の維持・増殖を担っているとする“癌幹細胞説”が注目を浴びている。つまり、わずかに存在する癌幹細胞のみが限られた分化と自己複製を繰り返しながら癌を維持するのであり、癌の大部分を構成する非癌幹細胞は、自己複製能はなく、最終的に増殖能を失い、癌の維持すらできない、とする考えである (図1)。癌幹細胞は通常は分裂を停止した G0 期にあるため盛んに分裂する細胞をターゲットとした既存の化学療法などには耐性を示し、再発・転移を起こす原因になると考えられる。つまり、癌を根絶するには、癌を構成する大多数の癌細胞を標的にするのではなく、癌幹細胞を標的にしなければならない。

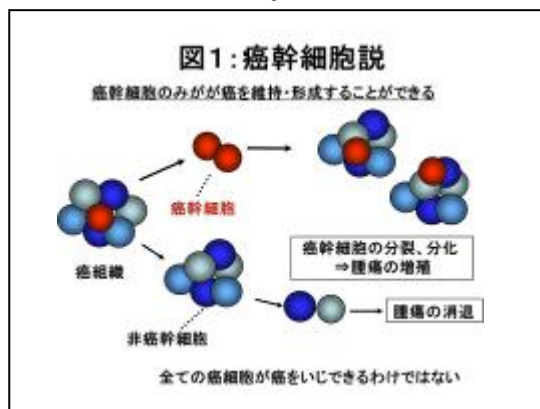


図1: 癌幹細胞説

血液系の腫瘍で最初に見つかった癌幹細胞はその後様々な固形癌からも同定され、癌幹細胞を中心とした発癌メカニズムの解明、癌幹細胞を標的とした新規治療法の研究が盛んに行われている。しかし、皮膚癌の幹細胞研究はほとんど進んでいない。大きな理由は皮膚癌における癌幹細胞特異的細胞表面マーカーが得られていないことにある。癌幹細胞同定には癌が由来している組織幹細胞の細胞表面マーカーが応用される。しかしヒト皮膚に関しては幹細胞をとらえる明らかな特異的なマーカーが確立していないため、癌幹細胞を特異的に捕える事ができていないのである。最近になり有棘細胞癌 (CD133) と黒色腫 (ABCB5, CD20) で癌幹細胞の候補が報告されたもののまだこれらに関してもコンセンサスは得られていない。

私はこれまでにマウス SCC の実験で、機能的な幹細胞マーカーである side population

細胞 (SP 細胞) を用い、マウス SCC の癌幹細胞が SP 細胞であることを同定した。本研究ではこれを応用し SP 細胞を標的として SCC などの癌幹細胞を同定したいと考えた。

2. 研究の目的

SCC は悪性度が高い腫瘍ではないが、時に転移する。有効な化学療法薬が開発されておらず、進行例ではし治療に難渋する。また悪性黒色腫や進行期 SCC、乳房外 Paget 病など皮膚癌においても根治の難しいものは多く、新規治療法の開発が望まれている。皮膚癌幹細胞特異的な分子・経路が同定できれば正常細胞には影響を与えずに癌幹細胞のみをターゲットとした化学療法薬の開発につながりうると考える。また癌幹細胞特異的細胞表面マーカーが同定できれば新たな抗体療法の開発へつながり得ると考える。本研究ではこのために下記の2項目を研究の目的とする。

(1) 皮膚癌、特に SCC を中心に SP 細胞を解析し、癌幹細胞としての性状を有するかどうか、つまり SP 細胞の腫瘍形成能、多分化能を検討する。

(2) SP 細胞に癌幹細胞としての性質が認められれば、SP 細胞を癌幹細胞たらしめる特異的な遺伝子経路・分子を特定する。

以上により皮膚癌根治を目指す新たな治療法開発へ向けた基礎実験にすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 癌幹細胞の同定には①腫瘍を形成し維持する能力があること、②自己複製能があること、③半永久的に分裂する能力があること、を証明する必要がある。本研究では SP 細胞をはじめとするターゲット細胞群をフローサイトメトリーで sorting し、これらについて①～③について検討する。まずターゲット細胞群と非細胞群とを sorting し、連続移植実験によって腫瘍形成能を検討する。ついで移植により二次性腫瘍が得られたら、フローサイトメトリーでこの二次性腫瘍をさらに解析し、移植した SP 細胞が SP 細胞自身と non-SP 細胞をも作り出しているかどうかを検討する (自己複製能、分化能の検討)。これには *in vivo* grafting assay システムという、シリコンチャンバーを用いた移植方法でマウスに移植する事で検討する (図2)。これらの移植実験で癌幹細胞が同定できれば、ついでそれらの細胞群からマイクロアレイ解析を行い分子レベルで両群の決定的な違いを来す分子の同定を試みる。分子が選択できれば、siRNA などのノックダウン法を用いて遺伝子をノックダウンし、実際に腫瘍形成のなどに影響があるかどうかを検討する。

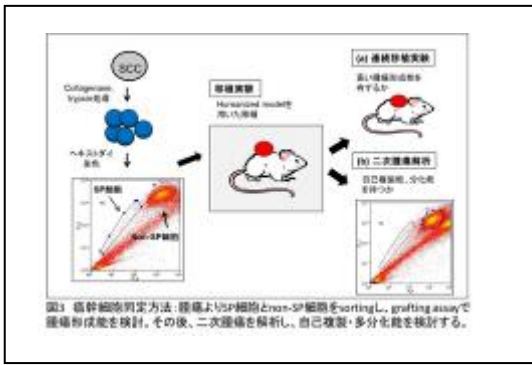


図2：研究方法概略

4. 研究成果

(1) 皮膚有棘細胞癌における SP 細胞

ヒト SCC の細胞株である HSC-1, 5, SCC-o を培養・増殖し、これを nude mouse もしくは NNOD/SCID マウスに移植し、担癌マウスを作製した (図3)。この SCC が十分に大きくなったところで腫瘍を採取し、single cell にしたあと SP 細胞を調べた。いずれの cell line にも腫瘍全体の 1~2% というごくわずかな数で SP 細胞が存在していた (図4)。この SP 細胞の腫瘍全体に対する割合は、以前行った化学発癌モデルでのマウス SCC の結果とほぼ同様であった。

次に手術サンプルより得たヒト SCC 組織を同様に免疫抑制マウスに移植し担癌マウス



図3：SCC マウス

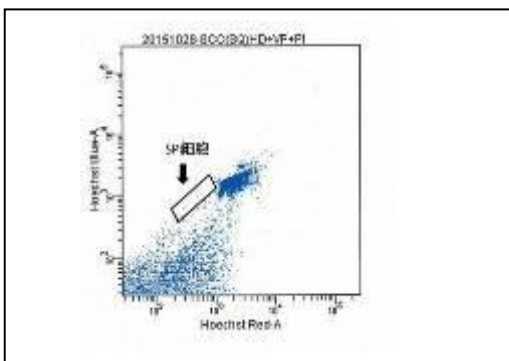


図4：フローサイトメトリーで解析した SCC における SP 細胞

を作製した。しかし、手術サンプルから得た腫瘍はマウスへの生着に非常に時間がかかった。マトリゲルや Gelform を用いた移植方法も試みたが、腫瘍生着促進にはならなかった。また、生着した場合でも皮下で角化をおこしてしまい、SP 細胞解析に十分な細胞数を得ることは難しかった。

(2) SP 細胞の腫瘍形成能

SP 細胞に非 SP 細胞より強い腫瘍形成能があるかどうかを検討するため、SP 及び非 SP 細胞を FACS によって回収しマウスへの移植実験を行った。しかし、いずれの細胞群もマウスへは生着せず、比較検討はできなかった。そこで、*in vitro*

の方法で検討することにした。まず spheroid assay を行った。しかし、いずれの群も spheroid 形成は見られず評価できなかった。このためさらにコラーゲンゲルを用いた三次元培養での評価を試みた。しかし unsorted の SCC では腫瘍形成が見られるものの SP 細胞、非 SP 細胞では腫瘍形成は起こらなかった (図5)。コントロールの無選択 SCC 細胞では腫瘍を形成するには最低 10,000 の腫瘍細胞を要したが、sorting で回収できた SP 細胞

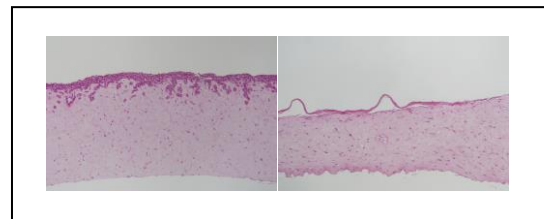


図5：三次元培養による腫瘍能検討。左、10万 SCC 細胞。右、680SP 細胞。

は最高 640 細胞であった。おそらく、これらの SP 細胞実験がうまくいかなかった原因として、SCC から回収できた SP 細胞数が少なすぎてそれぞれの assay で腫瘍を形成できなかったのではないかと考える。

今回経験した問題に対しては、今後さらに humanized したマウス model や *in vitro* の assay 系を確立する必要性があると考えられる。

(3) 悪性黒色腫、隆起性皮膚線維肉腫における幹細胞の検討

悪性黒色腫の cell line である SK-MEL をもちいて免疫抑制マウスに腫瘍を形成し、SP 細胞を解析したが、ほとんど SP 細胞は検出されなかった。また当科で樹立した隆起性皮膚線維肉腫の cell line を用いて SP 細胞を検討したが、この cell line でも SP 細胞は検出されなかった。

(4) SCC における CD98 の役割

SCC における SP 細胞の細胞数があまりにも少なかったため、異なる分子をターゲットに幹細胞の同定を試みることにし、CD98 を選んだ。CD98 は表皮基底層に発現する蛋白で、インテグリン β 鎖の細胞内末端と結合して、細胞伸展、生存、増殖を制御する接着シグナルを媒介する。皮膚における transient amplifying cell の新たなマーカーとしても知られているし、種々の癌種において癌幹細胞のマーカーとして報告されている。皮膚においては表皮基底層で発現しており、basal layer の stem cell を含む細胞群と考えられる。そこで 35 例の SCC と 86 例の SCC *in situ*

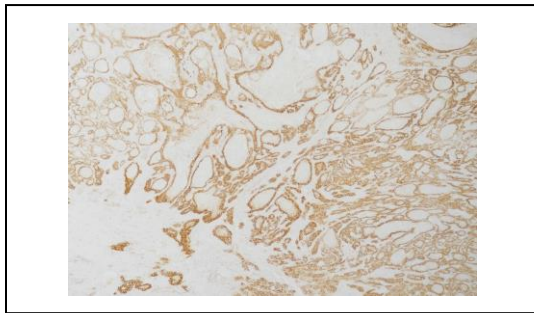


図 6：免疫染色による CD98 発現

の症例について CD98 の発現を免疫染色で検討した (図 6)。SCC では 66%の症例で腫瘍の浸潤先端に強く発現があり、ほぼ全体に発現した症例が 22%、陰性例が 11%であった。SCC *in situ* では日光角化症は全例が強発現し、Bowen 病では強発現、部分的に発現、陰性例がほぼ同等であった (表)。興味深いことに SCC *in situ* から浸潤癌へ進行するに従い CD98 発現が减弱するが、遠隔転移巣では再度 CD98 の発現が見られた例が数例見られた。

SCC (n=25)	n	%	Bowen disease (n=26)	n	%
基底層と浸潤部に発現	23	66%	全層に陽性	20	36
ほぼ全体に陽性	8	22%	強陽性	10	18
強陽性	3	8%	強陽性	10	18
陽性	4	11%	部分的に陽性	5	9
Actinic keratosis (n=26)	n	%	基底層のみ陽性	11	20
陽性	26	100%	陰性	20	36
陰性	0	0%			

表：SCC、SCC *in situ* における CD98 発現

CD98 が SCC の浸潤・転移に大きく関与していることを示唆する所見と思われる。

(5) SP 細胞における CD98 の発現

以上の結果より CD98 細胞は SCC 発症に関与しており、また癌幹細胞の要素を含む可能性が示唆された。そこで SP 細胞における CD98

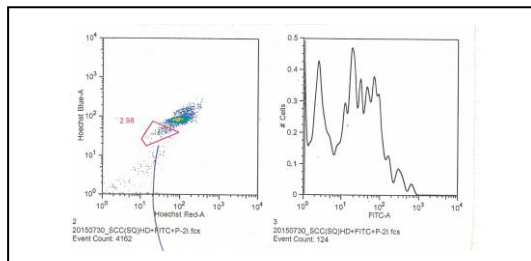


図 7：SP 細胞 (左図、括弧内) における CD98 発現 (右)

の発現を検討した。まず SCC cell line からマウスに SCC を形成し、この腫瘍を解析した。SCC の SP 細胞の 2/3 ほどは CD98 陽性細胞であった (図 7)。しかし CD98 陰性細胞も少なからず存在しており、SP 細胞における CD98 発現の意義については今後検討していく必

要がある。

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 0 件)

該当なし

〔学会発表〕 (計 1 件)

① 村尾和俊、皮膚有棘細胞癌における CD98 発現の検討、第 23 回四国四大学皮膚科研究会、2016 年 7 月 23 日、松山全日空ホテル (愛媛県・松山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村尾 和俊 (MURAO, Kazutoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：40363171