

機関番号：32202  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26462621  
研究課題名(和文) 頭頸部癌幹細胞の生物学的活性亢進の機序の解明

研究課題名(英文) Biology of head and neck cancer stem cell

研究代表者

西野 宏 (NISHINO, HIROSHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50245057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌細胞の表面マーカーについて検討した。頭頸部癌細胞株5株(舌癌)全てにCD44rich細胞を多数認めた。しかしCD133rich細胞は1株にのみ同定された。手術切除2試料(舌癌)ではCD44rich細胞が多い試料と少ない試料に別れた。次に手術切除4試料(声門上癌2、下咽頭癌1、舌癌1)でCD44vとALDH1A1について検討した。2試料にCD44vrich細胞を多く認めた。ALDH1A1rich細胞はいずれの試料にも一定の割合で認めた。以上より頭頸部癌幹細胞の表面マーカーとしてはCD44、CD44v、ALDH1A1が候補としてあげられると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigate about surface marker of head and neck cancer stem cell. At the first, we studied expression of CD44 or CD133 in five cell line (tongue squamous cell carcinoma). CD44richcell was detected in all cell lines. CD133richcell was detected in only one cell line, and the number of CD133richcell was small. Next step, we studied expression of CD44 or CD133 in two surgical resection samples. CD44richcell was many detected in one sample, but in the other sample CD44richcell was poorly detected. CD133richcell was few detected. So at further studies, we studied about expression of CD44v or ALDH1A1 as stem cell marker in four surgical resection samples. In two of four samples CD44vrichcell was detected, but in other two samples CD44vrichcell was poorly detected. ALDH1A1richcell was detected at about 20% of all sorted cells in all samples. Expression of ALDH1A1 was detected at stable rate. CD44, CD44v, and ALDH1A1 may be suitable marker of head and neck cancer stem cell.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：癌幹細胞 頭頸部癌 CD44 ALDH1A1

## 1. 研究開始当初の背景

1983年に日本で承認された cisplatin は現時点でも頭頸部癌化学療法のキーとなる薬剤となっている。その後抗 EGFR 抗体 cetuximab が2008年に日本で承認され、2017年には抗 PD-1 抗体 nivolumab が認可された。癌細胞の DNA に作用する薬剤、細胞の情報伝達に関する薬剤、さらには癌宿主の免疫に関する薬剤が開発された。しかしながら、再発癌の生存率中央値は4~6か月である。癌細胞の細胞周期、抗癌薬耐性の機序、癌免疫からの逃避の様々な機序が癌が存在する癌組織微小環境に働くからである。これらの治療に抵抗を示す代表的な細胞が癌幹細胞であると言われている。癌幹細胞は細胞周期が arrest の状態であり、放射線治療及び抗癌薬に抵抗性を示すことが知られている。生き残った癌幹細胞は分化を開始し、癌幹細胞と通常の癌細胞に分裂してゆく。すなわち癌幹細胞を制御しなくては癌治療成績の向上は望めない。多くの癌種でこの癌幹細胞の研究は進んでいるが、頭頸部癌幹細胞の研究は途上である。頭頸部癌幹細胞の研究を行うために適切な表面マーカーをまず選択することが重要である。

## 2. 研究の目的

頭頸部癌幹細胞の適切な表面マーカーを探索することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1)癌細胞株

癌細胞株は金沢大学医学部感覚運動病態学 近藤悟医学博士および吉崎智一医学博士により供与された。全て舌癌より樹立された細胞株である。

HSC-2, HSC-3, HSC4, OSC-19, OSC-20

### (2)手術検体からの癌細胞分離

自治医科大学臨床研究倫理審査委員会の承諾後（臨A14-094号）に行われた。同意を得られた患者の切除手術検体より試料を採取した。

### 癌組織より癌細胞の分離

1. Tumor Dissociation Kit Human(Miltenyl Biotec), と gentleMACS™Octo Dissociation with Heaters (Miltenyl Biotec)を使用。
2. 癌組織より1cm3角の癌組織を採取。
3. 脂肪及び壊死組織を除去。
4. 5mm角程度に裁断した癌組織をCチューブに入れる。
5. Cチューブ：4.7mL の1%BSA/RPMI1640+ Tumor Dissociation Kit, Human (Enzyme H 200  $\mu$  L, Enzyme R 100  $\mu$  L, Enzyme A 25  $\mu$  L)
6. Cチューブを gentleMACS™Octo Dissociation with Heatersに設置。
7. 機器の分散プログラム 37ChTDK3を実施。
8. 分散後のサンプルに RPMI1640を数mL加え、70  $\mu$  mのフィルターに通す。
9. 300×g 4°C 7分 遠心。
10. 10.上清を取り除く。
11. 11.RPMI1640を数mL加え、70  $\mu$  mのフィルターに通す。
12. 12.回収した細胞を RPMI1640に懸濁する。
13. 13.氷上で下記の操作を行う

14. 14.遠心 (1,500rpm, 4°C, 5分) →上清除去→1 mL St. Buffer ×2
15. 15.遠心 (1,500rpm, 4°C, 5分) →上清除去
16. 16.1×10<sup>6</sup> cells/100 μLとしてチューブに分注

採取された試料は9試料(舌癌3試料、咽頭癌6試料)であった。

### (3)フローサイトメトリー

#### 試薬

- ST-Buffer:  
PBS(-)47.5mL+5%FBS2.5mL
- hFc-Block 5 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- trypsin

#### 抗体

- hcCD44-FITC 5 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- hcCD130-APC 5 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- hcCD130-PE 5 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- hcCD44v-FITC 5 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- Mouse IgG2B Alexa Fluor 488-conjugated I 5 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- ALDH1A1 Rabbit PE 2 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- Rabbit IgG XP Isotype Co 2 μL/1×10<sup>6</sup> cells
- DRAQ7 0.1~0.2 μL/1×10<sup>6</sup> cells

#### 染色

1. St. Buffer 995 μL + Fc-Block 5 μL作成
2. 上記を各チューブに100 μLずつ添加

3. 10分間 4°C 暗所でインキュベーション
4. チューブに抗体を添加
5. 50分間 4°C 暗所でインキュベーション 15~20分毎にタッピング
6. 1,500rpm, 4°C, 5分→上清除去
7. St. Buffer 100 μL添加→1,500rpm, 4°C, 5分→上清除去 ×2
8. St. Buffer 250~500 μL添加ピペッティング
9. DRAQ7 0.1 μL添加
10. 10.セルストレーナーに通してFACSチューブに入れる
11. 氷上に入れてセルソーティング

#### 機器

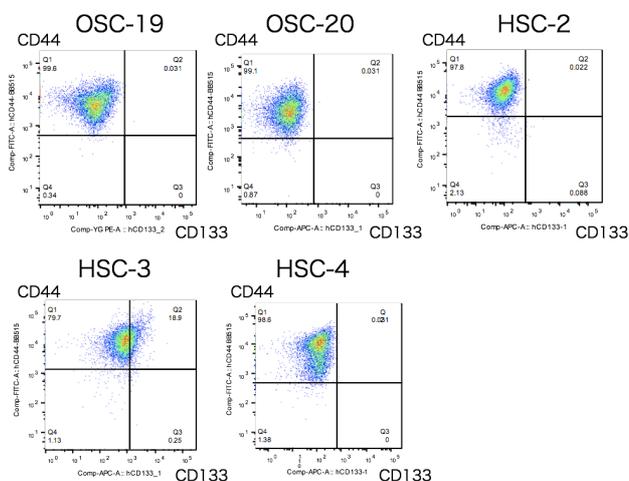
- BD FACSMelody™セルソーター (BD)

## 4. 研究成果

### (1)細胞株

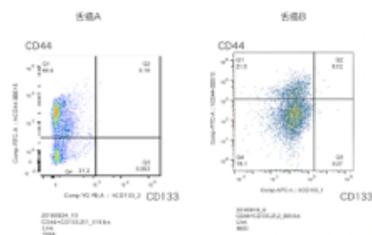
全ての細胞株にCD44<sup>rich</sup>細胞を認めた。

HSC-3のみにCD133<sup>rich</sup>細胞を認めた。

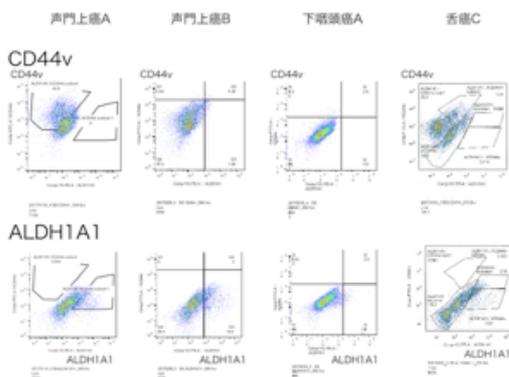


### (2)手術検体試料

舌癌 2 組織で CD44 と CD133 を検討した。いずれも CD44<sup>rich</sup> 細胞を認めた。しかし CD133<sup>rich</sup> 細胞は認めなかった。



4 組織（声門上癌 2、咽頭癌 1、舌癌 1）で CD44<sup>v</sup> と ALDH1A1 を検討した。CD44<sup>v</sup><sup>rich</sup> を 2 癌組織、非常に少数の CD44<sup>v</sup><sup>rich</sup> を 2 癌組織に認めた。全ての癌組織に ALDH1A1<sup>rich</sup> 細胞を認めた。



他の癌種において癌幹細胞の表面マーカーは検討されている。CD44、CD133、ALDH などが各癌種の表面マーカーとして指摘されている。そこで他の癌種において報告されている CD44 と CD133 について検討を始めた。頭頸部癌細胞株として 5 株検討すると、全ての癌細胞株において CD44<sup>rich</sup> 細胞が 80% 以上と大多数の細胞を占めていた。しかし CD133<sup>rich</sup> 細胞は 1 細胞株において 19% を占めるのみであった。細胞株は一定の条件下に分化増殖する点を考えると、画一的な細胞集団であることが容易に予測される。癌細胞株が一定の増殖を保つことを考えると CD44 は細胞増殖に関与する生物学的活性の指標である可能性がある。

次に実際の手術切除標本で検討してみることとした。すると CD44<sup>rich</sup> 細胞が多い試料と少ない試料が存在した。CD44<sup>rich</sup> 細胞を認めた試料はいずれも舌扁平上皮癌であったが、その割合は約 60% と約 20% と差を認めた。癌細胞株と異なり、実際の癌組織では癌細胞の多様性が存在することがわかった。このことは、癌細胞株での研究結果と実臨床における癌治療結果との相違を生じている原因と考えられた。CD133 に関しては、CD133<sup>rich</sup> 細胞の同定は困難であった。これらの結果より頭頸部癌細胞の生物学的活性の指標として CD133 を使用することは不適切と判断し、次の検討に進行した。

次に CD44 のサブタイプとしての CD44<sup>v</sup> と ALDH1A1 を指標として、手術切除試料から分離した癌細胞の表面マーカーを検討した。CD44<sup>v</sup><sup>rich</sup> 細胞が認められる試料が 2 試料、ほとんど認められない試料が 2 試料存在した。CD44<sup>v</sup><sup>rich</sup> 細胞を認めた試料では全細胞に占める割合は約 40% および 66% と高率であった。ALDH1A1<sup>rich</sup> 細胞は全ての試料で存在が確認できた。7% から 20% と差は存在するが全ての試料で確認ができた。

今までの結果より頭頸部癌細胞の生物学的活性の指標としての細胞表面マーカーは CD44、CD44<sup>v</sup>、ALDH1A1 が適切であると考えられた。今後 CD44<sup>rich</sup> 細胞と CD44<sup>low</sup> 細胞、CD44<sup>v</sup><sup>rich</sup> 細胞と CD44<sup>v</sup><sup>low</sup> 細胞、ALDH1A1<sup>rich</sup> 細胞と ALDH1A1<sup>low</sup> 細胞のそれぞれの生物学的活性の差を、腫瘍形成能、細胞周期、浸潤能、転移能を検討する。

## 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 4 件)

- ① Kamochi H, Sarukawa S, Uda H, Nishino H, Yoshimira K. Orbitomaxillary reconstruction using a combined latissimus dorsal mucocutaneous and scapular angle osseous flap. J Oral Maxillofac Surg、査

- 読有、1巻、2016、e1-e6
- ② 上村佐恵子、島田茉莉、伊藤真人、西野宏、睡眠時無呼吸を契機に発見された小児橋本病症例、小児耳鼻、査読有、37巻、2016、pp45-54
- ③ 西野宏、IL-6 と癌細胞活性、耳鼻免疫アレルギー、査読無、34巻、2016、pp13-18
- ④ Sarukawa S, Noguchi T, Sunaga A, Uda H, Nishino H, Sugawara Y. Mandibular reconstruction based on the concept of double arc reconstruction. 査読有、J Craniofac Surg、26巻、2015、pp539-542

〔学会発表〕(計3件)

- ① 加持秀明、去川俊二、杉浦康史、野口秀忠、西野宏、森良之、菅原康志、吉村浩太郎、軟部組織充填に用いた腭骨弁の有用性。第40回日本頭頸部癌学会、2016年6月9日～10日、ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
- ② 去川俊二、加持秀明、杉浦康史、野口秀忠、菅原康志、森良之、西野宏、吉村浩太郎、補綴を目標にした上下顎再建。第40回日本頭頸部癌学会、2016年6月9日～10日、ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
- ③ 西野宏、藤井博文、CDD`耐性再発頭頸部扁平上皮癌に対する weekly PTX and Cmax の検討。第54回日本癌治療学会学術集会、2016年10月20日～22日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西野宏 (NISHINO Hiroshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50245057

### (2)研究分担者

高野澤美奈子 (TAKANOSAWA Minako)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50316543

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )