

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463050

研究課題名(和文) 口腔癌の浸潤・転移におけるがん幹細胞マーカーの発現と役割

研究課題名(英文) Expression and role of cancer stem cell marker in invasion and metastasis of oral cancer

研究代表者

石田 喬之 (ISHIDA, Takayuki)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：20404501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織の化学放射線療法抵抗性を示す要因としてがん幹細胞が注目されているが、近年、がん細胞が上皮間葉移行(EMT)を起こすことでがん幹細胞様性質を獲得し、浸潤・転移能が亢進する可能性が指摘されている。我々は口腔癌細胞株であるHSC4にsnailを導入しEMTを誘導させ、それらの細胞株がの幹細胞マーカーのmRNA発現量が増加することを確認した。以上のことから口腔癌細胞株においてEMTが誘導されるとがん幹細胞様性質を獲得することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells are attracting attention as a factor showing chemoradiotherapy resistance of cancer tissue, but in recent years cancer cells have acquired cancer stem cell-like properties by causing epithelial mesenchymal transition (EMT). It is pointed out that the metastatic potential may be enhanced. We induced EMT by introducing snail into oral cancer cell line HSC4 and confirmed that the expression level of mRNA of stem cell markers in the cell line increases. These findings suggested that induction of EMT in oral cancer cell lines would acquire cancer stem cell-like properties.

研究分野：口腔外科

キーワード：がん幹細胞 口腔扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の治療成績は向上してきているが、所属リンパ節への転移の有無が最大の予後因子となっている。今後の治療成績の向上のためには頸部リンパ節転移の制御が不可欠であり、そのためには転移のメカニズムを明らかにする必要がある。

がん組織の化学放射線療法抵抗性を示す要因としてがん幹細胞が注目されている。がん幹細胞は正常幹細胞と同様に自己再生能と多分化能を有し、がん組織の発生と維持に関わっていると考えられている。また活性酸素の除去能が高く、抗癌剤や放射線治療に対して高い抵抗性と再発に関連があると考えられている。2003年にヒト乳がんにおいて固形癌で初めてがん幹細胞の存在が示され、頭頸部癌でも2007年にがん幹細胞の存在が示された。

癌細胞が転移を起こすためには周囲組織や血管、リンパ管への浸潤が必要であるが、癌の浸潤・転移能の獲得に上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与していることが報告されている。EMTを起こした癌細胞は E-cadherin など細胞接着因子の発現が低下し、vimentin などの間葉系細胞マーカーの発現が上昇することで間葉系細胞の性質を獲得するが、近年 EMT はがん幹細胞様性質を獲得するための重要なステップではないかとする報告がされている。

がん幹細胞様性質を獲得した癌細胞は正常幹細胞同様に自己複製能と治療抵抗性を獲得するが増殖能が低下する。しかしそのかわり転移能を獲得し転移を起こす。転移した癌細胞は今度は自己複製を行うと共に逆に間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) を起こし、再び高い増殖能を再び持ち、転移巣を形成するというモデルが提唱されている。

申請者は以前、低酸素環境が口腔癌細胞株の Notch シグナルを活性化することで口腔癌細胞株に EMT を誘導し走化能と浸潤能が亢進することを明らかにした (Oncology letters 6: 1201-1206, 2013)。また Notch シグナルとは別経路として低酸素環境で誘導される HIF-1 と HIF-2 がそれぞれ幹細胞マーカーである Bmi1 Oct-4 を活性化することにより EMT やがん幹細胞様性質が誘導されることが示されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は口腔癌細胞におけるがん幹細胞マーカー発現と EMT 誘導浸潤・転移能の関連を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株 HSC4 に間葉系細胞マーカーである snail を導入し、EMT 誘導株 (snail-HSC4) を作製。スクラッチアッセイとマトリゲルチャンバーアッセイを行い HSC4 と HSC4 snail の遊走能、浸潤能を比較する。マイクロアレイでがん幹細胞マーカーの発現の違いを調べた。

(2) 上皮細胞は接着することで増殖することが可能となるが、浮遊培養でスフィア (細胞塊) が形成できるということは間葉系性質を持っているということ、がん幹細胞様性質を持っているということになる。

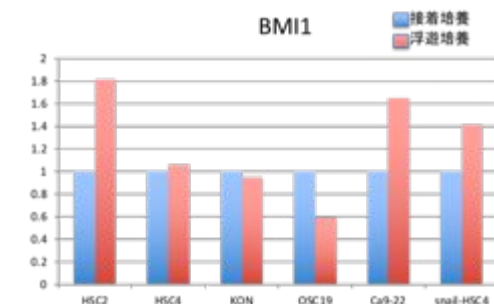
そこで口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2, HSC4, snail-HSC4, KON, OSC19, Ca9-22 の浮遊培養を行いスフィア形成能を比較した。また、がん幹細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR で比較した。

## 4. 研究成果

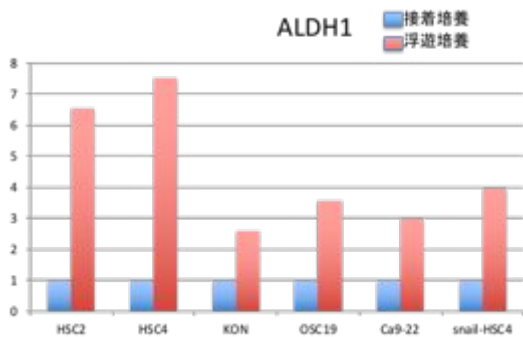
(1) HSC4 と比較し snail-HSC4 の遊走能、浸潤能の亢進を認めた。マイクロアレイ検査でがん幹細胞マーカーである ALDH1 の発現亢進を認め、snail 発現亢進により EMT が誘導され、がん幹細胞マーカー発現亢進がすることが明らかとなった。

(2) 全ての口腔扁平上皮癌細胞株でスフィア形成能を認めた。また snail-HSC4 は HSC4 と比較しスフィア形成の亢進を認めた。このことから snail 導入により引き起こされる EMT が、がん幹細胞様性質を誘導する可能性が示唆された。

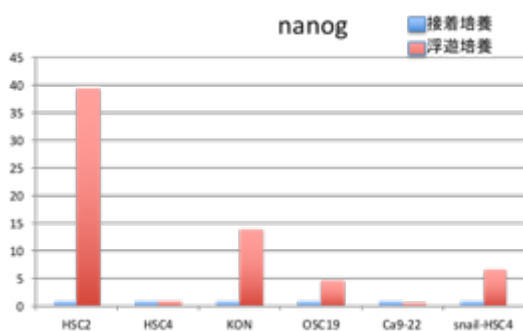
次に口腔癌細胞株のがん幹細胞マーカーである BMI1、ALDH1、nanog、SOX2 の mRNA の発現を接着培養と浮遊培養で比較した。



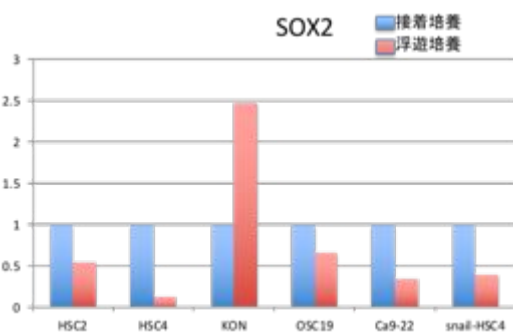
BMI1: HSC2, Ca9-22, snail-HSC4 で発現亢進を認めた。



ALDH1: 全ての細胞株で発現亢進を認めた。



Nonog: HSC2, KON, OSC19, snail-HSC4 で発現亢進を認めた。



SOX2: KON で発現亢進を認めたがそれ以外の細胞では発現抑制を認めた。

(3) 当科で根治的治療を行った口腔扁平上皮癌症例の生検切片を用いて幹細胞マーカーである Bmi1 の免疫組織学的染色を行ったところ、正常口腔粘膜上皮では有棘層細胞のみに発現し、癌組織では癌細胞のほとんどの核に発現していた。また、癌組織に隣接する異型口腔粘膜上皮の基底層細胞の核の染色を認めた。

以上の結果より口腔扁平上皮癌において snail が誘導する EMT ががん幹細胞様性質の獲得と関連す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4件)

Takayuki Ishida, Hiroshi Hijioka, Kenichi Kume, Takuya Yoshimura, Akihiko Miyawaki, Etsuro Nozoe, Shigeaki Suenaga, Hiroko Indo, Hideyuki J. Majima, Norifumi Nakamura. A diagnosis system for detecting cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Collective consideration of the results of multiple imaging modalities. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 査読有, 29(3): 210-216, 2017.

Yoshimura T, Ishida T, Tanaka K, Dr, Kitazono I, Kume K, Hijioka H, Semba I, Nakamura N, Tanimoto A. Cystadenocarcinoma of minor salivary gland arising in the upper lip: A surgical case of and inadequate cytology specimen rendering conclusive diagnosis difficult. Pathology -Research and Practice, 査読有, 9:64-68, 2017.

Hijioka H, Suzuki H, Kazuhide Nishihara, Miyawaki A, Ishida T, Semba I, Nakamura N. Primary intraosseous squamous cell carcinoma in association with recurrent ameloblastoma of the mandible. A case report. J Oral Maxillofacial Surgery Oral Pathology Oral Medicine, 査読有, 27:693-697, 2015

Miyawaki A, Hijioka H, Ishida T, Nozoe E, Nakamura N, Oya R. Intraoperative frozen section histological analysis of resection samples is useful for the control of primary lesions in patients with oral squamous cell carcinoma. Molecular and Clinical Oncology, 査読有, 3(1): 55-62, 2015.

[学会発表](計4件)

石田喬之、比地岡浩志、宮脇昭彦、嶋香織、久米健一、品川憲穂、本庄希江、野村綾子、野添悦郎、仙波伊知郎、中村典史：口腔扁平上皮癌症例におけるリンパ節転移予測因子としての budding score の有用性の評価。第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会，2018年1月25-26日，新潟

石田喬之、比地岡浩志、宮脇昭彦、末永重明、嶋香織、久米健一、品川憲穂、本庄希江、野添悦郎、馬嶋秀行、仙波伊知郎、中村典史。舌扁平上皮癌 T1・T2 症例における頸部リ

リンパ節転移予測因子の検討. 第 35 回日本  
口腔腫瘍学会総会・学術大会(2017)

石田喬之、比地岡浩志、吉村卓也、久  
米健一、野添悦郎、中村典史:当科にお  
ける口腔扁平上皮癌の臨床統計学的検討,  
第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会,  
2016 年 1 月 21 日-22 日, 横浜

石田喬之, 比地岡浩志, 宮脇昭彦, 久  
米健一, 吉村卓也, 末永重明, 野添悦郎,  
馬嶋秀行, 中村典史:当科における頸部  
リンパ節転移の診断基準の構築とその  
評価, 第 68 回 NPO 法人 日本口腔科学会  
学術集会, 2015 年 5 月 7 日-9 日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石田 喬之(Takayuki Ishida)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号:20304501

### (2)研究分担者

吉村 卓也(Takuya Yoshimura)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・医員  
研究者番号:30726758

中村 典史(Norifumi Nakamura)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授  
研究者番号:60217875

久米 健一(kenichi Kume)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号:60650067

比地岡 浩志(Hiroshi Hijioka)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師  
研究者番号:70305150