

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861748

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮がん幹細胞の治療抵抗性の克服

研究課題名(英文) Mastery of treatment resistant cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

梅村 直己 (UMEMURA, Naoki)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：80609107

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)：口腔扁平上皮癌細胞におけるがん幹細胞の治療抵抗性の克服を目指し、口腔扁平上皮癌細胞株をシスプラチン化学療法剤を含む培養液で培養し続けて、シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌細胞を作成した。その結果、シスプラチンに耐性を有する口腔扁平上皮癌細胞は、シスプラチンだけでなく他の薬剤に対しても耐性を有していた。さらに多剤耐性口腔扁平上皮癌細胞を解析をしたところ、がん幹細胞マーカーであるCD44の発現が上昇していた。また、ABCG2も発現しており、薬剤排出能が上昇していた。これらのことから、薬剤に対する治療抵抗性獲得とがん幹細胞の発現とABCG2の発現には何らかの関連があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to master treatment resistant cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. Firstly, we developed cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cells that were maintained with media including cisplatin chemo reagent. In the results, the cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cells held resistance characteristics not only to cisplatin but also to 5FU, doxorubicin, and other chemo reagents. Furthermore, when we analyzed characteristics of cancer stem-like cells in the multidrug-resistant oral squamous cell carcinoma cell, expression levels of CD44-which is known as a marker of cancer stem cells-were increased. Furthermore, expression levels of ABCG2, which is known as an ABC transporter, were also increased, and the function of drug ejection was elevated. These results indicated there are correlations between the acquisition of multi-drug resistance, the function of drug ejection, and cancer stem marker CD44.

研究分野：生化学

キーワード：がん幹細胞 口腔扁平上皮癌 化学療法

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は毎年アメリカで 5 万人が罹患し、全世界で 60 万人が罹患している [American Cancer Society. 2009]。頭頸部扁平上皮癌に対する治療は他の悪性疾患と同様に放射線療法と外科手術が根治治療であるが、呼吸、摂食、嚥下、構音などの生存に必須な機能を多く有する頭頸部という部位の性質もあり、治癒率は 30% 未満と報告されている。また化学療法に耐性を示すケースが多く、再発、転移を起こしやすく、予後不良である [Argiris A. et al: lancet 2008 May 17; 371(9625): 1695-709]。

一方、近年、注目されている「がん幹細胞仮説」によると、現在広く用いられている悪性腫瘍に対する治療戦略では、再発・転移の恐れや、多剤耐性がんの出現を完全に止めることが出来ない。2006 年のアメリカがん学会 (American Association for Cancer Research: AACR) で提唱された「がん幹細胞仮説」では、がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) と名付けられた亜集団のより、悪性腫瘍の形成および増殖が促進され、かつ、この細胞群は正常細胞由来の幹細胞の性質を多く受け継いでいると考えられている。さらに腫瘍組織のがん細胞の不均一は従来の確率論モデルから腫瘍組織中の腫瘍形成能の高い「がん幹細胞」から不均一が派生すると考えられる階層性モデルが考えられるようになった [Clarke M. et al: Cancer Res 2006, 66, 19, 9339-44]。

「がん幹細胞仮説」提唱後、多くの研究者により、がん幹細胞マーカーとなる表面抗原が探求された。その中で頭頸部扁平上皮癌においては Prince らの報告で、腫瘍細胞内の CD44 陽性分画細胞は頭頸部扁平上皮癌腫瘍組織内の自己複製能と多分化能を有し、腫瘍原生であるがん幹細胞であると発表された [Prince M. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. 2007, 104, 973]。さらに、Davis らにより頭

頸部扁平上皮癌の CD44 陽性細胞は CD44 陰性細胞に比べて、有意に腫瘍移行能を有し腫瘍転移能があることを *in vitro*, *in vivo* の双方で証明した [Davis S. et al: Head Neck Surg. 2010, 136, 1260-1266]。また、原発腫瘍組織内の CD44 陽性細胞の割合と治療後の予後不良とが高い相関を示し、がん幹細胞マーカーである CD44、CD24、Oct4 や integrin-b1 の発現と放射線治療に対する抵抗性が相関することが報告された [Koukourakis M. et al: Br. J. Cancer. 2012, 106, 846-853]。

このように頭頸部扁平上皮癌の腫瘍内 CD44 陽性細胞ががん幹細胞と考えられている。がん幹細胞は放射線治療や抗がん剤に対する治療抵抗性を保有することから、臨床的な腫瘍の悪性度と関連し、腫瘍の再発や転移においては中心的な役割があると考えられており、将来はがん幹細胞を標的とした治療薬、治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究成果により、口腔扁平上皮癌内の CD44 陽性細胞はがん幹細胞の特徴を有し、CD44 を標的とした治療で腫瘍の再発を抑制できることが示唆された。本研究はそこから、口腔扁平上皮癌の治療抵抗性における CD44 の役割とそのメカニズムを明らかにすることで、口腔扁平上皮癌の治療抵抗性の克服を目指すことを目的とする。

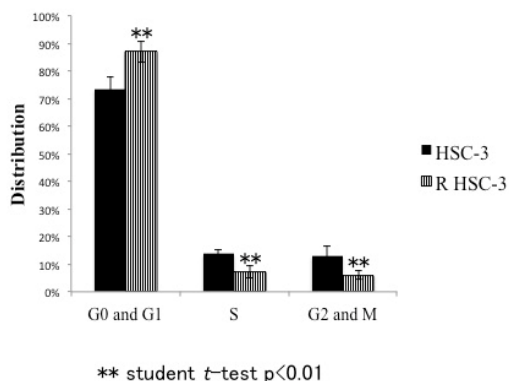
3. 研究の方法

すでに作成済みの口腔扁平上皮癌細胞株の CD44 ノックダウン細胞株と新たに多剤耐性株を作成し、それらの細胞株を用いてがん幹細胞マーカーとがん幹細胞の特徴とを検証し、化学療法剤に対する耐性獲得とがん幹細胞との関係を明らかにする。

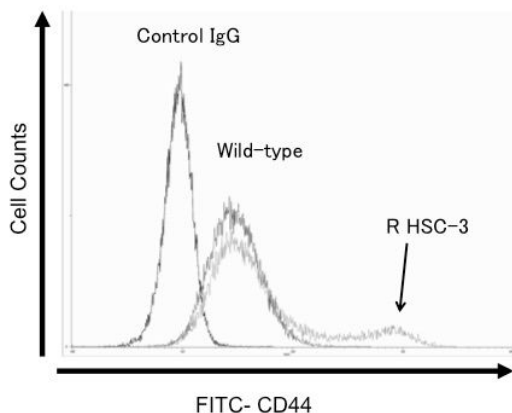
4. 研究成果

1. 口腔扁平上皮癌細胞株から CD44 ノックダウン細胞を作成し、親細胞株と CD44 ノックダウン細胞との比較を行った。その結果、親細胞とノックダウン細胞には細胞増殖速度に有意な差はなかった。その一方で CD44 ノックダウン細胞は薬剤に対する感受性が上昇し、アポトーシスに誘導されやすくなった。

2. 一方、我々は化学療法剤であるシスプラチンを細胞培養液に加え、継続的に培養し、シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌細胞を作成した。さらにシスプラチン耐性口腔扁平上皮癌細胞から 5 FU、ドセタキセルなどの多剤耐性獲得口腔扁平上皮癌細胞を作成した。その結果、多剤耐性口腔扁平上皮癌細胞は細胞増殖速度がやや遅くなり、細胞周期解析に置いて G1 期の割合が有意に増加した(下図)。



また、がん幹細胞マーカーである CD44 の発言が増加しており、薬剤によるアポトーシスへの抵抗性と CD44 の発現との関連が示唆された(下図)。



さらに、癌細胞において、薬剤を細胞内から細胞外へと排出する ABC 輸送porter の一つ ABCG2 の発現が上昇しているのをウエスタンブロットティング法にて確認した。これらのことから、がん幹細胞マーカーである CD44 は薬剤排出機能の更新と関連していることが示唆された。我々の研究により、がん幹細胞マーカーである CD44 は細胞周期の G1 期の割合を増加させる一方で、薬剤排出ポンプである ABCG2 を誘導し、それにより口腔扁平上皮のがん幹細胞は化学療法剤への抵抗性を保持している可能性が示唆された。

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)

- (1) Sumi S, Umemura N, Takayama E, Ohkoshi E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Inagaki T, Kawaki H, Sumitomo S, Kondoh N. 「Metastasized murine oral squamous cell carcinoma cells induce intratumoral polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells.」 *Oncol Rep.* 2017 May;37(5):2897-2904. doi: 10.3892/or.2017.5575. Epub 2017 Apr 11. 査読あり
- (2) Yamali C, Gul HI, Ozgun DO, Hiroshi SS, Umemura N, Kazaz C, Gul M. 「Synthesis and Cytotoxic Activities of Difluoro-Dimethoxy Chalcones.」 *Anticancer Agents Med Chem.* 2017 Mar 27. doi: 10.2174/1871520617666170327123909. 査読あり
- (3) Ohkoshi E, Umemura N. 「Induced overexpression of CD44 associated with resistance to apoptosis on DNA damage response in human head and neck squamous cell carcinoma cells.」 *Int J*

Oncol. 2017 Feb;50(2):387-395. doi:
10.3892/ijo.2016.3821. Epub 2016 Dec
28. 査読あり

- (4) Umemura N, Ohkoshi E, Tajima M,
Kikuchi H, Katayama T, Sakagami H.
「Hyaluronan induces odontoblastic
differentiation of dental pulp stem cells
via CD44.」 Stem Cell Res Ther. 2016
Sep 20;7(1):135. doi:
10.1186/s13287-016-0399-8. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 村上浩一、本木雅大、大越絵実加、梅村直己、上田條二 「頭頸部扁平上皮癌の
CD44 過剰発現は細胞周期 G2/M 期の
DNA 修復シグナル経路による mitotic
catastrophe に拮抗する」 第 136 回 日
本薬学会年会、パシフィコ横浜、横浜、
2016-03-26_2016-03-29
- (2) 梅村直己、坂上 宏 「Hyaluronan
induces odontoblastic differentiation of
dental pulp stem cells via CD44」 第
57 回歯科基礎医学会学術大会、新潟コン
ペンションセンター、新潟、
2015-09-11_2015-09-13
- (3) Naoki Umemura, Hiroshi Sakagami
「 CD44-targeted chemotherapy
inhibits tumor recurrence in Head and
Neck squamous cell carcinoma」 19th
World congerss on advances in
oncology and 17th internationall
symposium on moleculer medicine,
Metropolitan hotel, Athenes, Greece,
2014-10-09_2014-10-11
- (4) 梅村直己、坂上宏 「腫瘍内浸潤マクロフ
ァージは解糖系亢進と共に免疫抑制能を
保持する」 第 56 回歯科基礎医学会学術
大会、福岡国際会議場、福岡、
2014-09-25_2014-09-27

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 直己 (UMEMURA Naoki)
朝日大学・歯学部・助教
研究者番号: 80609107

(4) 研究協力者

大越 絵実加 (OHKOSHI Emika)
青森大学・薬学部・准教授