

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791603

研究課題名（和文）舌がん癌幹細胞の頸部リンパ節転移機構への関与

研究課題名（英文） Association of neck metastasis with tongue cancer stem cells.

研究代表者

近藤 悟（KONDO SATORU）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70436822

研究成果の概要（和文）： Side population (SP)法、スフェロイド培養法を用いて舌癌細胞株 OSC19 から癌幹細胞様集団と非癌幹細胞様集団に分取し、ヌードマウスの舌に移植し頸部転移の頻度を検討した。癌幹細胞様細胞は非癌幹細胞様細胞に比し少ない細胞数でも舌に腫瘍を形成した頸部リンパ節転移を起こした。しかし非癌幹細胞様細胞集団でも細胞数を増やすことで舌の腫瘍形成、頸部リンパ節転移を起こすことが判明した。この事から癌幹細胞様細胞集団にだけ癌幹細胞性があるのではなく非癌幹細胞様細胞集団の中にもある程度の癌幹細胞の性質を持つ細胞集団が含まれていることが示唆された。舌癌組織の免疫染色において、CD44 および ABCG2 が舌癌の癌幹細胞転移マーカーの候補となったが予後因子とはならなかった。これらを制御することで癌幹細胞性を介した頸部転移のコントロールを目的とした新規治療の開発につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Using side population method and spheroid cultivating method, we have sorted cancer stem like cell (CSC) and non-CSC from tongue cancer cell line, OSC19. We transplanted the CSC and non-CSC to tongue of nude mouse and determined frequency of neck metastasis. CSC formed more tumor of tongue and neck metastasis than non-CSC. However, non-CSC could form neck metastasis by increasing of cell the number of cells transplanted. Upon with these findings, we concluded that both CSC and non-CSC have phenotype of cancer stem cells. By analysis with immuno-histochemistry with tongue cancer tissues, CD44 and ABCG2 were determined as candidates of CSC-metastatic marker although the expression does not relate with worse prognosis. Suppression of phenotypes of CSC may control neck metastasis of tongue cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：舌がん、癌幹細胞、頸部リンパ節転移、分化、スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

舌癌は進行すれば予後不良でありその予後因子の一つである頸部リンパ節転移を制御することが重要である。近年頭頸部癌領域でも癌細胞の源となる「癌幹細胞」様細胞が証明されつつある。本研究では最初に舌癌における「癌幹細胞」の存在を証明するとともにその性質について検討するとともに最終的にその「癌幹細胞」が頸部転移に関与するのかについて検証した。

2. 研究の目的

舌癌においてこの癌幹細胞の同定のみならず、果たして舌癌の予後を左右する頸部転移機構とこの癌幹細胞は関与するのかを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) 舌癌細胞における癌幹細胞の同定

樹立された舌癌細胞株 OSC19 を用い同定した。

A) SP 細胞解析：生体細胞染色が可能なヘキスト 33342 を用いて、停止期にある細胞 (side population; SP 細胞) とそれ以外の非 SP 細胞にフローサイトメーターを用いて 2 つの細胞分画に分けた。

B) 無血清培地での癌細胞の培養：上皮成長因子と繊維芽細胞増殖因子を無血清培養液に添加することで 1 つの細胞が培養プレートに非接着性に球状に増殖しコロニーを形成する。このスフェロイド培養法を用い癌幹細胞を樹立した。

同定した細胞はウェスタンブロッティングならびに real-time PCR 法により蛋白レベル、mRNA レベルで、代表される癌幹細胞マーカーの変化につき検討した。そして寒天培地での腫瘍形成能を評価した。

また、同定した癌幹細胞および非癌幹細胞をヌードマウスの舌に局所移植し頸部転移能を評価した。

2) 舌癌原発巣組織ならびに頸部転移巣の癌幹細胞マーカーの免疫組織学的検討：パラフィンブロックを免疫組織学的に検討した。具体的には ABC トランスポーターの代表である BCRP/ABCG2, 幹細胞マーカーとして CD44, CD133, nanog, nestin を免疫染色法にて評価を行った。

3) 舌癌癌幹細胞のヌードマウスへの局所移植と頸部転移巣形成：頸部転移巣成立後、ヌードマウスの舌腫瘍および頸部転移巣をパラフィン固定後、ヒト舌癌組織で評価した癌幹細胞マーカーに関して免疫組織学的に検討した。原発巣、ならびに頸部転移巣を評価することで癌幹細胞自身が頸部転移巣に移動してきたのか、あるいは癌幹細胞より分化した癌細胞が移動してきたのかを評価した。

4. 研究成果

1) Side population 法を用いた移植実験では、SP 細胞は非 SP 細胞に比して少ない細胞数でも舌に腫瘍を形成し、頸部リンパ節転移を起こした。しかし非 SP 細胞集団でも細胞数を増やすことで舌での腫瘍形成、頸部リンパ節転移を起こすことが判明した。このことから SP 細胞集団にだけ癌幹細胞性があるのではなく非 SP 集団の中にもある程度の癌幹細胞の性質を持つ細胞集団が含まれていることが示唆された。

2) スフェロイド培地で 2 週間生育した OSC19 の方が少ない細胞数で舌に腫瘍を形成することが可能であり頸部リンパ節転移率も格段に上昇した。しかしながら通常培地で生育した OSC19 でも細胞数を増加させれば腫瘍形成、頸部リンパ節転移が起こった。

3) 舌癌 43 症例の原発巣および頸部転移巣のパラフィン包埋切片を用いて、免疫染色法を用いて舌癌の癌幹細胞マーカーとして報告されている CD44, CD133, ABCG2, CD117 などの発現の有無につき検討を行った。初診時より頸部転移を持つ例とそうでない例、初診時に頸部転移がなかった例で後に頸部転移が起こった症例に分けて検討を行った。

CD44 の発現は原発巣で強く病期によって発現に差異がはなかった。また頸部転移リンパ節内にも CD44 の発現が認められ、CD44 を発現している癌細胞が直接頸部リンパ節へ移動していることが示唆された。また後発頸部リンパ節にも強く CD44 が発現しており頸部リンパ節転移において重要な働きをしていることが示唆された。

薬剤トランスポーターの ABCG2 は同様に舌癌癌幹細胞のマーカーの候補として報告されている。ABCG2 は原発巣および頸部リンパ節に発現を認め病期および T 分類が進むにつれ有意に発現が上昇する傾向を認めた。

グリオーマなどの癌幹細胞のマーカーとして報告されている CD133 についても検討を行った。舌癌においては諸家の報告と異なり原発巣においても頸部リンパ節転移巣においても CD133 の有意な発現は認めることはなかった。しかし、上記いずれのマーカーも予後に影響を及ぼさなかった。

4) 以上の結果から、ヌードマウス内に OSC19 の移植によって移植された SP 細胞および非 SP 細胞によって形成された頸部リンパ節および原発巣を摘出し RNA を抽出した。RNA 抽出後、上記の癌幹細胞マーカーをリアルタイム定量 PCR 法にて検討したところ、SP 細胞の移植によって形成された原発巣および頸部リンパ節では非 SP 細胞から形成された原発巣および頸部転移巣よりも ABCG2, CD44 が強い発現を認めることが判明した。以上の結果

から CD44 および ABCG2 が舌癌の癌幹細胞のマーカーの一つとして考えられこれらを制御することで癌幹細胞性を介した頸部転移のコントロールを目的とした新規治療の開発につながると考えられた。

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 9 件)

1. Wakisaka N, Hirota K, Kondo S, Sawada-Kitamura S, Endo K, Murono S, Yoshizaki T. Induction of lymphangiogenesis through vascular endothelial growth factor-C/vascular endothelial growth factor receptor 3 axis and its correlation with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 2012 (in press). 査読有
DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.003
2. Ito M, Maruyama Y, Murono S, Wakisaka N, Kondo S, Hatano M, Nakanishi S, Miwa T, Yoshizaki T. Efficacy and safety of garenoxacin in the treatment of upper respiratory tract infections. *Auris Nasus Larynx* 2012 (in press). 査読有
3. Kondo S, Wakisaka N, Muramatsu M, Zen Y, Endo K, Murono S, Sugimoto H, Yamaoka S, Pagano JS, Yoshizaki T. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Cancer Stem/Progenitor-like Cells in Nasopharyngeal Epithelial Cell Lines. *J Virol* 85: 11255-11264, 2011. 査読有
DOI:10.1128/JVI.00188-11
4. Horikawa T, Yoshizaki T, Kondo S, Furukawa M, Kaizaki Y, Pagano JS. Epstein-Barr virus latent membrane

protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 104: 1160-1167, 2011. 査読有
DOI: 10.1038/bjc.2011.38

5. Sugimoto H, Ito M, Hatano M, Kondo S, Suzuki S, Yoshizaki T. Roles of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Otol Neurotol* 32: 483-7, 2011. 査読有
DOI: 10.1097/MAO.0b013e31820d9654

6. Muro S, Nakanishi Y, Inoue D, Ozaki K, Kondo S, Wakisaka N, Matsui O, Yoshizaki T. Pseudoaneurysm of the lingual artery after concurrent intra-arterial chemotherapy with radiotherapy for advanced tongue cancer. *Head Neck* 33: 1230-2, 2011. 査読有
DOI: 10.1002/hed.21372

7. Muro S, Hirota K, Kondo S, Wakisaka N, Furukawa M, Yoshizaki T. An extremely rare case of large Delphian node metastasis preceding primary laryngeal cancer. *Auris Nasus Larynx* 36: 614-7, 2009. 査読有
DOI:10.1016/j.anl.2009.01.010

8. Endo K, Kondo S, Shackelford J, Horikawa T, Kitagawa N, Yoshizaki T, Furukawa M, Zen Y, Pagano JS. Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration. *Oncogene* 28: 1725-35, 2009. 査読有
DOI:10.1038/onc.2009.20

9. Wakisaka N, Kondo S, Muro S, Minato H, Furukawa M, Yoshizaki T. A solitary fibrous tumor arising in the

parapharyngeal space, with MRI and FDG-PET finding. *Auris Nasus Larynx* 36: 367-371 2009. 査読有
DOI:10.1016/j.anl.2008.05.010

[学会発表] (計4件)

1. 近藤 悟、Epstein Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Initiates Cancer Progenitor Cells in Epithelial Cell Lines、第59回日本ウイルス学会、2011年9月11日、札幌コンベンションセンター(北海道)
2. 近藤 悟、中西 庸介、遠藤 一平、脇坂尚宏、室野 重之、吉崎 智一、EBVにより上咽頭癌幹細胞は誘導されるか?—第二報—、第35回日本頭頸部癌学会、2011年6月9日、ウインクあいち(愛知)
3. 近藤 悟、脇坂 尚宏、遠藤 一平、室野重之、古川 亙、吉崎 智一、Epstein Barr ウィルス LMP1 による上皮系細胞における癌前駆細胞形質の誘導、第69回日本癌学会、2010年9月23日、大阪国際会議場(大阪)
4. 近藤 悟、室野 重之、古川 亙、吉崎 智一、進行口腔癌に対する浅側頭動脈経由持続動注化学療法、第33回頭頸部癌学会、2009年6月12日、ロイトン札幌(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 悟 (KONDO SATORU)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 70436822

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし