

Title	頭頸部癌癌幹細胞における血管内皮細胞増殖因子の微小環境としての働きに関する研究
Sub Title	Expression of stem cell markers Oct3/4 and Nanog and its clinical significance in oral tongue squamous cell carcinoma
Author	羽生, 昇(Habu, Noboru)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
Abstract	<p>舌癌は頸部リンパ節転移が生じやすい癌である。後発頸部リンパ節転移と癌幹細胞との関連および、血管内皮細胞増殖因子と頸部リンパ節転移について検討した。RT-PCRにて癌幹細胞関連遺伝子の発現を舌癌細胞株の癌幹細胞様細胞のSP細胞とnon SP細胞で比較した結果、SP細胞でOct3/4, Nanogの発現が高く、また遊走能と浸潤能が高かった。stage I/II舌癌検体に、Oct3/4とNanogの発現を免疫染色にて評価した。多変量解析ではOct3/4発現とVascular invasionが独立相関因子であった。Oct3/4は舌癌の有用な癌幹細胞マーカーと考えられた。</p> <p>In the present study, we aimed to determine the CSC markers in the SP of HNSCC cells along with their functions in cellular behaviors, and to clarify the association of these markers with delayed neck metastasis (DNM). Results : SP were isolated in cell lines examined. Expression levels of Oct3/4 and Nanog were higher in SP cells than MP cells. Additionally, cell migration and invasion abilities were higher in SP cells than MP cells, whereas there was no difference in proliferation. Univariate analysis showed that Expression of Oct3/4 and Nanog, vascular and muscular invasion, and mode of invasion were significantly correlated with DNM. Multivariate logistic regression revealed that Oct3/4 expression and vascular invasion were independently predictive of DNM. Conclusion : These results suggest that Oct3/4 and Nanog represent probable CSC markers in HNSCC, which contribute to the development of DNM in part by enhancing cell motility and invasiveness.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2013～2016 課題番号：25861587 研究分野：頭頸部癌
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861587seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2016
 課題番号：25861587
 研究課題名(和文) 頭頸部癌幹細胞における血管内皮細胞増殖因子の微小環境としての働きに関する研究

 研究課題名(英文) Expression of stem cell markers Oct3/4 and Nanog and its clinical significance in oral tongue squamous cell carcinoma

 研究代表者
 羽生 昇(HABU, NOBORU)

 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

 研究者番号：60365369
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：舌癌は頸部リンパ節転移が生じやすい癌である。後発頸部リンパ節転移と癌幹細胞との関連および、血管内皮細胞増殖因子と頸部リンパ節転移について検討した。RT-PCRにて癌幹細胞関連遺伝子の発現を舌癌細胞株の癌幹細胞様細胞のSP細胞とnon SP細胞と比較した結果、SP細胞でOct3/4、Nanogの発現が高く、また遊走能と浸潤能が高かった。

stage / 舌癌検体に、Oct3/4とNanogの発現を免疫染色にて評価した。多変量解析ではOct3/4発現とVascular invasionが独立相関因子であった。Oct3/4は舌癌の有用な癌幹細胞マーカーと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to determine the CSC markers in the SP of HNSCC cells along with their functions in cellular behaviors, and to clarify the association of these markers with delayed neck metastasis (DNM). Results: SP were isolated in cell lines examined. Expression levels of Oct3/4 and Nanog were higher in SP cells than MP cells. Additionally, cell migration and invasion abilities were higher in SP cells than MP cells, whereas there was no difference in proliferation. Univariate analysis showed that Expression of Oct3/4 and Nanog, vascular and muscular invasion, and mode of invasion were significantly correlated with DNM. Multivariate logistic regression revealed that Oct3/4 expression and vascular invasion were independently predictive of DNM. Conclusion: These results suggest that Oct3/4 and Nanog represent probable CSC markers in HNSCC, which contribute to the development of DNM in part by enhancing cell motility and invasiveness.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞は自己複製機能をもち状況に応じて様々な成熟した組織に分化する能力をもつとされている。生体内における幹細胞は胚性幹細胞との対比で体性幹細胞と称されている。体性幹細胞はいくつかの臓器で証明されているが、主なものは造血細胞で、そのほか脳、皮膚などがある。さらに造血幹細胞と同様な機能を持つ細胞が白血病のなかに存在することが明らかになり、さらに固形癌の中にも自己複製能力の異なるさまざまなタイプの細胞が混在していることが示唆されているようになってきた。近年発達した細胞マーカーの研究やフローサイトメトリーの開発によって体性幹細胞と同様に多分化能と自己複製能を合わせもつ「癌幹細胞」が存在することが明らかになってきた。この細胞群は Hoechst333342 で染色性の弱い細胞群として同定されることから SP(Side population)細胞とよばれている。SP細胞は脳腫瘍、乳癌、膵癌、前立腺癌で存在が明らかになってきた。頭頸部癌では Chen らが存在を報告している (Chen JS et al.; Laryngoscope 116,401-406,2006)

(2) 癌病巣の中に存在する癌幹細胞が放射線治療や化学療法によってアポトーシスを受けて、残存し再発をきたす。また原発巣から離脱して血管やリンパ管を移動して転移をきたすと考えられている。このように癌幹細胞は薬物治療耐性であると考えられる。蛍光色素を排泄する細胞群である SP細胞は同様に、薬物耐性をもつと考えられる。また癌幹細胞は細胞周期の静止期維持を行うことでも、化学療法や放射線の耐性を生じているといわれている。癌幹細胞の存在の確認やその耐性機構の解明は新たな癌治療に応用できるとして注目されている。癌幹細胞の転移との関係の解明に注目した。

これら癌幹細胞は、実際にはどこに存在するのだろうか。

(3) 正常な組織幹細胞は、ニッチ(微小環境)とよばれる特殊な環境下で近接する細胞からの刺激によって未分化状態を維持されているように、癌幹細胞もニッチによって腫瘍内で維持されていると考えられている。ニッチには、酸素を供給する血管細胞、癌細胞の間を埋める癌間質細胞、免疫細胞など様々に構成されている。

血管新生を誘導する血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor(VEGF)などの血管新生因子が豊富に存在し血管新生阻害剤も多く開発されている。そこでニッチの中でもとくに VEGF に注目し癌幹細胞とニッチとの関係に着目した。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌に癌幹細胞が存在するかどうかについて検討する。癌幹細胞様細胞(SP細胞)の存在を確認後、癌幹細胞関連遺伝子やEMT関連遺伝子においてSP細胞とNon SP細胞との間に差がある遺伝子はなにかを検討する。また癌幹細胞の亢進している機能について検討する。臨床検体における同関連遺伝子の発現とその臨床的意義について、転移を中心に明らかにする。また血管内皮細胞増殖因子 VEGF,血管内皮細胞増殖因子受容体 VEGFR と、リンパ節転移との関係についても検討する。

3. 研究の方法

(1) In Vitro

舌扁平上皮癌細胞株 SAS, SCC4, HSC4 を用いた。FlowcytometryにてSP細胞の存在の確認を行った。SP細胞とnon SP細胞を sortingして癌幹細胞関連遺伝子とEMT関連遺伝子について RT-PCR を行い比較した。癌幹細胞マーカーの Oct3/4, Nanog の免疫細胞染色を行った。

SP細胞の機能の解明に、増殖能・遊走能・浸潤能 assay を行った。

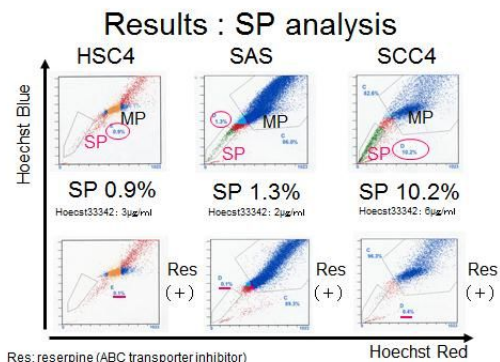
(2) 臨床検体

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科で初回治療として舌部分切除を行った、stage I/II 舌扁平上皮癌症例の Oct3/4 と Nanog の発現を免疫組織化学染色にて評価し、後発頸部リンパ節転移(delayed neck metastasis: DNM)との関係について検討した。また臨床病理学的因子は病理医によって評価した。DNM との相関関係について統計学的検討を行った。

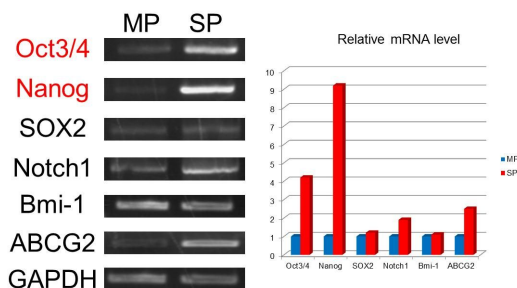
また stage / / / 舌扁平上皮癌症例の VEGF-C と VEGFR-R3 の発現を免疫組織化学染色にて評価し、頸部リンパ節転移との関係について統計学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 舌癌扁平上皮癌細胞株 SAS, SCC4, HSC4 を flowcytometryにて sortingした結果, SPは1.3%,10.2%,0.9%それぞれ認められ, ABC transporter 阻害剤を投与するとSPが消失することから, SP細胞が存在することが考えられた。すなわち癌幹細胞様細胞の存在が頭頸部扁平上皮癌にも存在すると考えられた。



RT-PCRにて癌幹細胞関連遺伝子の発現をSP細胞とnon SP細胞と比較するとSP細胞で転写因子Oct3/4、NanogやNotch1、ABCG2の発現が高かった。

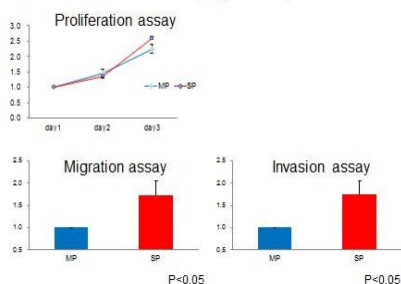


蛋白の発現を確認するのに免疫細胞染色を行うと、Oct3/4、NanogではSP細胞がnon SP細胞より染色強度が高く、蛋白においても発現が高いことが確認された。

これらからSP細胞とnon SP細胞との間で癌幹細胞関連遺伝子のOct3/4、Nanogが頭頸部扁平上皮癌に有用なマーカーではないかと考えられた。

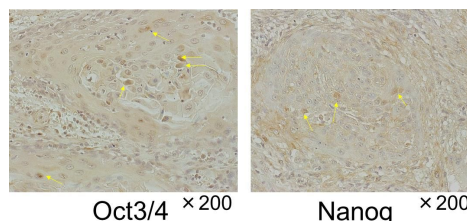
SP細胞の機能としては、SCC4の遊走能および浸潤能はSP細胞がnon SP細胞より高く、増殖能は両者に有意差を認めなかった。癌幹細胞は遊走能や浸潤能が高いことが示唆された。

Results :proliferation,migration,invasion-SCC4



*Vitro*の結果では頭頸部扁平上皮癌には癌幹細胞様細胞のSP細胞が存在し、そのマーカーにはOct3/4、Nanogが有用であり、SP細胞は遊走能や浸潤能が高いことが示された

(2) Stage I/II舌扁平上皮癌症例50例のOct3/4とNanogの免疫組織染色は、DNM陽性13例中Oct3/4発現は8例に認められ、Nanog発現は13例中7例に認められた。



DNMとの間の相関関係について単変量解析を行うとOct3/4、Nanogの発現との間に有意な相関が認められた。

Univariate analysis of immunohistochemical expressions and DNM

Immunohistochemistry	DNM - (n=37)	DNM + (n=13)	p value
Oct3/4 negative	33	5	0.001
Oct3/4 positive	4	8	
Nanog negative	34	6	0.001
Nanog positive	3	7	

Fisher's exact test

臨床病理学的因子では、vascular invasion, muscular invasion, mode of invasionがDNMとの間に単変量解析で相関関係を認めた。単変量解析で相関関係を認めたOct3/4染色陽性、Nanog染色陽性、vascular invasion, muscular invasion, mode of invasionの5項目についてSPSSを用いて多変量解析を行うと、Oct3/4染色陽性、vascular invasionがDNMと相関関係を認めた。

Stage I / II / III 舌癌検体ではVEGF-C・VEGF-R3発現がともに約42%認められ、頸部リンパ節転移と正の相関が認められた。

(3) *Vitro*および臨床検体の結果から、頭頸部扁平上皮癌には癌幹細胞様細胞が存在し、それらはOct3/4を指標としていること、そして癌幹細胞は転移に関与し、その機序には遊走能・浸潤能が関与している可能性が示された。

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1件)

Noboru Habu, Yorihiisa Imanishi, Koji Sakamoto, Seiji Shigetomi, Hiroyuki Ozawa, Masato Fujii, Kaoru Ogawa.

Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I oral tongue squamous cell carcinoma

BMC Cancer (2015) 15:730

DOI 10.1186/s12885-015-1732-9

査読あり

〔学会発表〕(計4件)

(1) Noboru Habu, Yori-hisa Imanishi, Koji Sakamoto, Ryoichi Fujii, Seiji Shigetomi, Hiroyuki Ozawa, Masato Fujii, Kaoru Ogawa.

American Association for Cancer Research
2016.4.17-21. New Orleans(USA)

Expression of stem cell markers Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage / tongue squamous cell carcinoma

(2) 羽生昇, 今西順久, 小澤宏行, 藤井正人, 小川郁.

第74回日本癌学会. 2015.10.8-10. 国立京都国際会館(京都府京都市)

Expression of stem cell markers Oct3/4 and Nanog and its clinical implications for delayed neck metastasis in tongue carcinoma

(3) 羽生昇, 今西順久, 坂本耕二, 藤井良一, 重富征爾, 藤井正人, 小川郁.

第51回日本癌治療学会学術集会. 2013.10.24-26. 国立京都国際会館(京都府京都市)

頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞様細胞の存在とその臨床的意義に関する検討

4) 羽生昇, 今西順久, 坂本耕二, 藤井良一, 重富征爾, 藤井正人, 小川郁.

第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術集会. 2013.5.16-18. ロイトン札幌(北海道札幌市)

頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞様細胞の存在とマーカーの発現に関する検討

〔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

羽生 昇 (HABU NOBORU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 60365369