

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：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463028

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした光線免疫療法による低侵襲口腔癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of minimum-invasive oral cancer therapy using photo-immunotherapy targeted on cancer stem cells

研究代表者

館原 誠晃 (Tatehara, Seiko)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90380089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔癌のがん幹細胞を標的とした光線免疫療法(PIT)の開発を目的に行った。近赤外線照射装置およびフタロシアニンと抗CD44v9抗体の複合体(F-antiCD44v9)を作製した。ヒト口腔癌細胞株にF-antiCD44v9を作用させた後に近赤外線を照射する(PIT)とがん細胞膜が破壊され徐々に死滅することを確認した。しかし、固形がんに近い状態で培養した口腔癌細胞に対してはPITの抗腫瘍効果はみられなかった。

研究成果の概要(英文)： The aim of this research was to develop photo-immunotherapy (PIT) targeting in cancer stem cells of oral cancer. The equipment for irradiation of near-infrared light and the phthalocyanine-anti CD44v9 antibody composite (F-antiCD44v9) were prepared. We performed the PIT using F-antiCD44v9 on human oral observed that PIT destroyed the cell membrane of cancer cells by PIT. However, PIT did not have anti-tumor effect on the cancer cells which forms the spheroids like a solid cancer.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 低侵襲治療 光線免疫療法 がん幹細胞 標的癌治療

1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対する治療法は外科療法、放射線療法、化学療法を主として、これらの単独または併用により行われている。しかし、これらの治療はいずれも副作用が多く、外科切除後には、咀嚼、嚥下や構音障害などを伴い、化学療法では白血球減少による免疫機能低下を背景として他の疾患を惹起するほか、癌の再発・転移を引き起こす原因ともなり得る。また、超高齢化社会が進行するわが国においてはできるだけ低侵襲の治療法の確立・開発がきわめて重要な課題である。がん研究においては、がん組織は均一な細胞集団ではなく、がん幹細胞とそれが種々の程度に分化した多くのがん細胞の不均一な集団であり、この集団のうち分化したがん細胞集団は放射線療法や化学療法により死滅するが、がん幹細胞はこれらの治療において抵抗性を示し、後の再発・転移の原因となることが示された。さらに、頭頸部がんのがん幹細胞は、CD44 バリエーションの1つである CD44v9 を高発現していることが報告された。そこで CD44v9 発現したがん幹細胞様細胞を標的とする治療法を開発することにより特異性が高く、根治的ながん治療法の開発に繋がると考え、このがん幹細胞を標的にした光線免疫療法を開発することとした。

2. 研究の目的

本研究は、がん幹細胞を標的とした低侵襲かつ根治的な口腔癌に対する新たな光線免疫療法を開発を目的とした。まず頭頸部癌のがん幹細胞様細胞に高発現している CD44v9 抗原に対する抗体と近赤外線に反応して殺細胞効果を示す化合物との複合体（抗 CD44v9 抗体結合化合物）を作製し、その殺細胞効果を *in vitro* にて検討する。また、口

腔癌細胞移植モデルを用いて本光線免疫療法の効果および腫瘍周囲の正常組織への影響および全身的副作用などの有無について検討し、抗 CD44v9 抗体結合化合物を用いた新たな光線免疫療法の確立を試みるとともに、がん幹細胞を標的にした低侵襲かつ根治的な口腔癌治療の確立を目指した基盤研究を行う予定であった。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔癌細胞株における CD44v9 発現についての免疫細胞化学的検討

ヒト口腔癌細胞 (HSC-3, HSC-4, SAS) は理化学研究所より購入した。通法の培養条件下において各ヒト口腔癌細胞株を培養し、CD44v9 の発現について細胞免疫染色法を用いて行った。抗ヒト CD44v9 抗体 (コスモ・バイオ) と 2 次抗体として抗ラット IgG 抗体 (Alexa Fluor 568 : Thermo Fisher) を用いて細胞免疫染色を行った。その後、蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X700) にて観察した。

(2) 近赤外線装置の作製

光線免疫療法はフタロシアニンの温熱効果を利用した治療法である。フタロシアニンの温熱は 690 nm の波長の近赤外線を照射することにより得られる¹⁾。そこで LED を用いて近赤外線を発する装置を開発した (図 1)。装置は、ピーク波長 691 nm、半値全幅 24 nm、放射照度で 5-26.8 mW/cm² とした。

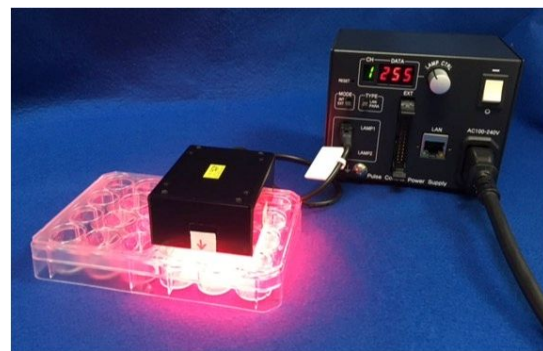


図 1 . 近赤外線装置

(3)近赤外線が正常細胞およびがん細胞に影響

正常細胞として上皮細胞の cell line である RT7 細胞⁽¹⁾、がん細胞としては、口腔がん細胞株 (HSC-3, HSC-4, SAS) を用いた。各細胞を 2.5×10^3 cells/cm² で播種し、培養開始 24 時間後にフェノールレッドフリー-medium に交換した。近赤外線を露光量 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 J/cm² で照射した。照射後 0, 1, 3, 5, 7 日目にクリスタルバイオレット法を用いて細胞の増殖能を測定した。

(4)フタロシアニン-抗ヒト CD44v9 抗体 (F-antiCD44v9)の作製

フタロシアニン (IRDye® 700DX, LI-COR Bioscience) と抗ヒト CD44v9 モノクローナル抗体を混和して 2 時間インキュベートした⁽¹⁾。吸光度測定により抗ヒト CD44v9 抗体結合化合物の濃度を確認した。

(5) F-antiCD44v9 の結合能の検討

CD44v9 が高発現していたヒト口腔癌細胞株 (SAS) を 2.5×10^3 cells/cm² で 48 well-plate に播種し、24 時間培養後に培養液中に F-antiCD44v9 を 1,2,4,8 mg/ml で添加して 3 時間後に蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X700)にて観察した。

(6)ヒト口腔がん細胞に対する殺細胞効果の検討

CD44v9 を発現していたヒト口腔癌細胞株 (HSC-3, HSC-4 SAS)を 2.5×10^3 cells/cm² で播種し、培養後 2 日目に培養液中に F-antiCD44v9 を 1,2,4,8 mg/ml で加え 3 時間培養した後に培養液を除去し、PBS で洗浄後フェノールレッドフリー-medium に交換した。近赤外線を照射 (2.0 J/cm^2) し、蛍光顕微鏡を用いて細胞形態の変化を観察することにより殺細胞効果の有無を検討した。

(6) 3 次元培養したがん細胞に対する PIT による殺細胞効果の検討

上記ヒト口腔癌細胞株を 1,000 cells/well で PrimeSurface 96 (S-BIO SUMILON)に播種し、24 時間培養した。次に上記方法と同様に PIT を行い、細胞の生死を Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay kit (Lonza)にて検討した。

4 . 研究成果

(1)ヒト口腔癌細胞株による CD44v9 の発現
各ヒト口腔癌細胞株 (HSC-3, HSC-4, SAS) において、各口腔癌細胞の細胞膜は赤色蛍光を示し、CD44v9 陽性であった (図 2)。

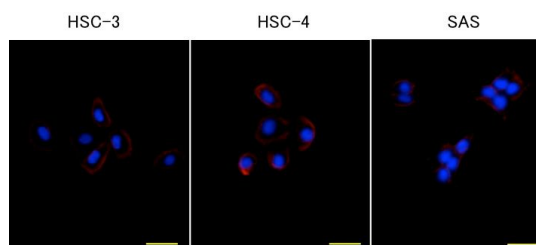


図 2 . ヒト口腔癌細胞における CD44v9 の発現
赤色蛍光 : CD44v9 陽性 blue:核、bar=100 μm

(2)近赤外線による各ヒト口腔癌細胞株への影響

近赤外線の露出量を 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 J/cm² として照射したところヒト口腔癌細胞株および上皮細胞の Cell Line (RT7)の細胞形態は変化せず、また各細胞の増殖にも影響を及ぼさなかった。

(3)F-antiCD44v9 の結合能

F-antiCD44v9 は各口腔癌細胞のがん幹細胞に結合していることを蛍光顕微鏡にて観察した (図 3) antiCD44v9 抗体による細胞免疫染色時と同様の発現パターンが認められた。つまり、細胞膜に赤色蛍光を認めた。このことからフタロシアニンが anti-CD44v9 抗体に結合していることが示された。

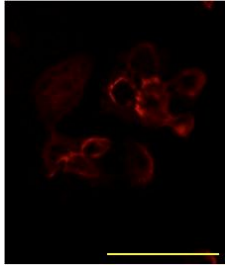


図3 . F-antiCD44v9 による口腔癌細胞への結合。赤色蛍光は細胞膜上で観察された。bar=100 μm .

(4) ヒト口腔がん細胞に対する殺細胞効果

各ヒト口腔癌細胞株に対して PIT を行い、蛍光顕微鏡下に PIT 前後の細胞形態を観察した。PIT 後、細胞間の結合がなくなり、さらに細胞膜は徐々に破壊されていく像を確認した(図 4)。PIT 後 1 日目に培養皿上に存在した細胞はすべて消失していた。この結果より、CD44v9 を target にした PIT の殺細胞効果を有していることが示唆された。

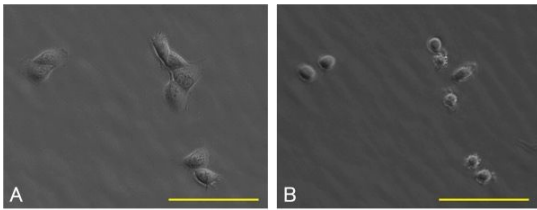


図4 . 口腔癌細胞株に対する PIT の効果 A : PIT 前の SAS 細胞、 B : PIT 直後 SAS 細胞 bar= 100 μm

(5) 3次元培養したがん細胞に対する PIT の殺細胞効果

次に *in vivo* において固形がんに近い状態で PIT 効果の有無を検討するためにヒト口腔癌細胞のスフェロイドを用いて行った。口腔癌細胞にスフェロイドに対して PIT を行ったところ、スフェロイドの形状は変化せず、また live/dead による 2 重染色したところスフェロイドは red に染色されず green のみ染色された(図 5)。この結果から、細胞がスフェロイドになることで細胞環境(細胞-細胞相互作用、増殖因子、サイトカインなど)に変化を生じ、target 細胞への効果が減少したことが示唆された。

以上の結果から、分化および増殖した癌細

胞に対する抗腫瘍効果を有する低侵襲治療と併用することにより抗腫瘍効果が向上することが考えられる。今後も本治療法の確立に向けてさらなる研究を行う予定である。

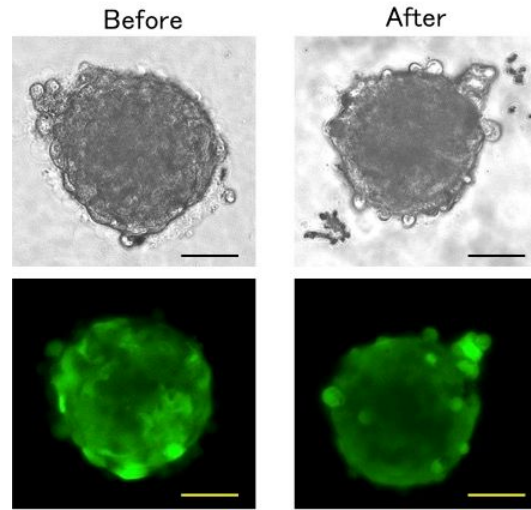


図5 . 口腔癌細胞のスフェロイドに対する PIT の効果。PIT3 日後の位相差顕微鏡像および LIVE/DEAD 2 重染色像を示す。Green 染色は生細胞を Red 染色は死細胞を示す。bar =100 μm

引用文献

Umeki H, Tokuyama R, Ide S, Okubo M, Tadokoro S, Tezuka M, Tatehara S, Satomura K. Leptin promotes wound healing in the oral mucosa. PLoS One. 17, 2014, e101984.

Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. Nat Med. 6, 2011, 1685-1691.

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

館原 誠晃 (TATEHARA, Seiko)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：90380089

(2) 研究分担者

井出 信次 (IDE, Shinji)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：00611998

徳山 麗子 (TOKUYAMA, Reiko)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：20380090

里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：80243715

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

梅木 泰親 (UMEKI, Yasuchika)
田所 晋 (TADOKORO, Susumu)
竹部祐生亮 (TAKEBE, Yusuke)
横田 利夫 (YOKOTA, Toshio)