

学位論文

頭頸部扁平上皮癌細胞における表現型の可塑性を介した
CD44^{high}細胞の抗癌剤抵抗性のメカニズムの解析

学位申請者

箸方美帆

広島大学大学院医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻

(主指導教員：菅井基行 教授)

2016 年度

目次

I.	緒言	1
II.	実験材料および実験方法	2
	1. 細胞株および細胞培養	
	2. 組織標本	
	3. FACS 解析	
	4. RNA 抽出および RT-PCR (Reverse Transcriptional-Polymerase Chain Reaction) 法	
	5. スフィアコロニーの形成	
	6. マイグレーションアッセイ	
	7. Hoechst 染色を利用した Side population 細胞の検出	
	8. アポトーシス解析	
	9. siRNA による遺伝子ノックダウン	
	10. 蛋白抽出および Western Blotting 法	
	11. ELISA 法による PGE ₂ 産生量の検討	
	12. 蛍光免疫細胞染色法	
	13. 統計解析	
III.	結果	7
IV.	考察	12
V.	結論	15
VI.	謝辞	16
VII.	参考文献	17
VIII.	付図説明	20
IX.	表および図	24

I. 緒言

癌幹細胞は体性幹細胞と類似した癌細胞であり、自己複製能、多分化能、高い腫瘍形成能などの形質を有すると考えられている^{1, 2)}。ヒト癌において、わずかに存在する幹細胞形質を有する癌細胞が治療抵抗性に深く関与している可能性が示唆されている。しかしながら、幹細胞形質を示す頭頸部扁平上皮癌細胞における、治療抵抗性のメカニズムは未だ明らかでない。

ヒト乳癌、大腸癌、脳腫瘍、膵臓癌において、CD44 高発現細胞が癌幹細胞形質を示すことが報告されている^{3, 4)}。また、上皮系細胞が間葉系細胞に変化する上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition:EMT)は癌の浸潤・転移に深く関与すると考えられているが、この EMT 形質も癌幹細胞形質の一つとして注目されている^{5, 6)}。筆者らは先行研究にて、口腔扁平上皮癌において CD44 高発現を示す癌細胞が癌幹細胞形質をもつことを報告してきた^{7, 8)}。また、口腔扁平上皮癌細胞株において CD44 および上皮マーカー-ESA(epithelial specific antigen)を用いて FACS(fluorescence activated cell sorting)解析をおこない、CD44^{high}/ESA^{low}細胞が癌幹細胞形質と EMT 形質の両方を示すことを明らかにした^{7, 8)}。この CD44^{high}/ESA^{low}細胞は、口腔扁平上皮癌の癌幹細胞形質の一つである抗癌剤抵抗性に深く関与していることが予測された。

そこで今回、頭頸部扁平上皮癌細胞から CD44^{high}/ESA^{low}細胞および CD44^{high}/ESA^{high}細胞を sorting し、それらの細胞の抗癌剤抵抗性のメカニズムについて解析をおこなった。

II. 実験材料および実験方法

1. 細胞株および細胞培養

本研究では、American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)より購入した口腔扁平上皮癌由来細胞株 HTB41, Mackenzie 教授(London 大学)より供与された舌扁平上皮癌由来細胞株 LUC4, 当科にて樹立した口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC2 を用いて実験をおこなった. また, GFP (Green Fluorescent Protein)陽性細胞を作成するため, GFP 発現レンチウイルスベクターを SV-40 largeT 抗原安定発現型ヒト胎児腎由来細胞株 293FT (Invitrogen™, Tokyo, Japan)を用いて生成し, 得られたウイルスベクターをそれぞれの細胞にインフュクションした. すべての細胞は, 培養液として 10%牛胎児血清(Fetal Bovine Serum : 以下 FBS と略記) (Biowest, Nuaille, France), 100U/ml ペニシリン (Sigma, St. Louis, MO), 100 μg/ml ストレプトマイシン (Sigma)を含むダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium : 以下 DMEM と略記) (Sigma)を用い, 5%CO₂ 存在下 37°Cで培養した. これら細胞の継代は, 0.05%トリプシン-EDTA (Sigma)処理で細胞を剥離し, 回収しておこなった. また, PGE₂を用いた実験の際には FBS を含有しない DMEM にて 24 時間培養後に実験をおこなった.

2. 組織標本

本研究では, 広島大学病院疫学研究倫理審査委員会の承認のもと, 広島大学病院口腔顎顔面再建外科を受診した患者のうち, 外科的切除術を受けた患者の切除組織の一部を採取し, これを研究に使用した. 採取した組織は液体窒素で凍結し, -80°Cにて保存した.

3. FACS 解析

細胞をトリプシンで単一浮遊にした後, リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate

buffered saline, 以下PBSと略記)で洗浄し, Anti-human CD44-PE-conjugated antibody (BD Bioscience, San Joes, USA), Anti-human ESA-APC-conjugated antibody (ESA) (BD Bioscience)を含むPBSで15分インキュベート後, PBSにて洗浄し, FACS Callibar (BD Bioscience)でフローサイトメトリーをおこない, Cell Quest™ Pro Version 6.1.1 (BD Bioscience)で解析した. 死細胞を除去するために, 7-AAD (BD Bioscience) 1 μ g/mlを使用した. また, CD44およびESAの発現強度を用いてCD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}の3つの細胞集団をsortingした. 組織においては, PBS洗浄後Collagenase A (Roche, Tokyo, Japan), バイオマッシャーを用いて細胞を分離した後に, FACS解析をおこなった.

4. RNA 抽出および RT-PCR (Reverse Transcriptional-Polymerase Chain Reaction) 法

細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA)を用いて Total RNA を抽出した. 逆転写酵素 Rever Tra Ace 1 μ l, 5 \times RT buffer 4 μ l, dNTP 20nM, Random Primers 25pmol, および Ribonuclease Inhibitor 10U 混合液 (TOYOBO, Osaka, Japan)に RNA 1 μ gを加え, 30 $^{\circ}$ C 10分, 99 $^{\circ}$ C 5分, 4 $^{\circ}$ C 5分の逆転写反応で1本鎖 cDNA テンプレート溶液 20 μ lを得た.

PCR反応 (total 20 μ l)は, cDNAテンプレート 1 μ l, 標的遺伝子特異的増幅用プライマーセット (各0.5 μ M), およびSYBR Green PCR Master Mix (TOYOBO)混合液を, サーマルサイクラー (Eppendorf, Hamburg, Germany)で変性95 $^{\circ}$ C 15秒, アニーリング60 $^{\circ}$ C 30秒, エクステンション72 $^{\circ}$ C 40秒のサイクルを40回おこなって標的遺伝子を増幅した. 各標的遺伝子特異的プライマー配列は表1に示す.

標的遺伝子発現量の定性には, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下G3PDHと略記)を内部標準として用いた.

5. スフィアコロニーの形成

24-well microtiter plate (非接触培地) に 2×10^3 個の細胞を播種し、2週間後にスフィアコロニー数を顕微鏡下に測定した。

6. マイグレーションアッセイ

24-well microtiter plate に 2×10^5 個の細胞を播種し、コンフルエントの状態を確認後、 $200 \mu\text{l}$ ピペットチップを用いてプレート表面が一部、均一幅の線状に露出するようスクラッチをおこない、24時間培養後、露出したプレート面に遊走した細胞を顕微鏡下に観察した。

7. Hoechst染色を利用したSide population細胞の検出

細胞をAccutase (PAA Laboratories, Pasching, Austria)にて単一浮遊にした後、5%FBS DMEMを用いて $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、Hoechst 33342 (Invitrogen™)を $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した。コントロールにはVerapamil (Sigma) $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ を追加した。37°Cウォーターバスにて遮光で90分間インキュベートし、2%FBS PBSで遠心洗浄後、FACS Callibarでフローサイトメトリーをおこない、Side population (以下SPと略記) 細胞の割合をCell Quest™ Pro Version 6.1.1で解析した。死細胞除去には7-AAD $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を使用した。

8. アポトーシス解析

細胞を6-well microtiter plate に $5 \times 10^4/\text{ml}$ で24時間培養後、試薬(表2に示す)を添加して48時間後に、CY™5 AnnexinV (5%) (BD Pharmingen, San Diego, USA)および7-AADにて染色し、FACS Callibarでフローサイトメトリーをおこない、Cell Quest™ Pro Version 6.1.1にてアポトーシス細胞を検出した。

9. siRNAによる遺伝子ノックダウン

ABCC2, ABCG2, NR4A2 特異的Stealth RNAi™ (Invitrogen™)をLipofectamine™ 2000 transfection reagent (Invitrogen™)を用いて、細胞に

トランスフェクションし、遺伝子ノックダウンをおこなった。トランスフェクション48時間後に抗癌剤を添加し、アポトーシス解析をおこなった。

10. 蛋白抽出およびWestern Blotting法

細胞培養ディッシュ上の細胞を、PBSにて洗浄後にスクレーパーで回収し、遠心して細胞ペレットにした。Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma)で可溶化し、12000g 15分遠心後、上清をサンプルとした。サンプルの蛋白濃度はProtein Assay (Bio Rad, Philadelphia, PA)を用い、BSA溶液を標準液としてBradford法により定量した。

SDS-PAGEは蛋白20 μ gにbeta-メルカプトエタノール含有5 \times Laemmliサンプルバッファーを添加し、99 $^{\circ}$ C 5分加熱後、10%グラディエントアクリルアミドゲルに展開後、ImmobilonTM PVDF メンブレン (EMD Millipore)に転写し、スキムミルク溶液でブロッキング反応をおこなった。1次抗体反応には各抗体に添付された条件に従った希釈用液で4 $^{\circ}$ C 12時間おこなった。2次抗体反応はECLTM Peroxidase labeled anti-mouse antibody (GE Healthcare Bio-science, Pittsburgh, PA), またはanti-rabbit IgG HRP conjugate (R&D systems, Minneapolis, USA)を10000倍希釈した反応液を用いて、室温で1時間おこなった。シグナル検出にはECLTM Advanced Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Bio-science, Pittsburgh, PA)による化学発光を用い、Las 4000 miniCCD カメラおよびMulti Gauge ソフト (Fuji Film, Tokyo, Japan)で検出および解析をおこなった。

1次抗体にはAnti-Prostaglandin E Receptor EP1 抗体 (Abcam, Cambridge, USA), Anti-Prostaglandin E Receptor EP2 抗体 (Abcam), 抗GAPDH抗体 (EMD Millipore, Billerica, MA) を使用した。

11. ELISA法によるPGE₂産生量の検討

FBSを含有しないDMEMで細胞を24時間培養後、上清およびPGE₂ Monoclonal EIA Kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, UK)を使用して

microplate readerの650nm波長にて測定をおこなった。その数値とStandard Curveを利用してPGE₂産生量を計算した。組織においては、細胞抽出後の上清をタンパク濃度を同量に調整して使用した。

12. 蛍光免疫細胞染色法

チャンバースライド (Matsunami, Osaka, Japan)に播種した細胞を、4%パラホルムアルデヒドPBSにて15分固定後、0.2% Triton X-100PBSおよび1%牛血清アルブミンPBSで膜透過処理とブロッキング反応をおこなった。1次抗体反応は100倍希釈したanti-NR4A2 goat polyclonal antibody (R&D systems), Vimentin Monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)を用いて4℃ 12時間おこなった。蛍光標識反応は、500倍希釈したanti-goat IgG antibody (Invitrogen™)反応液を用いて、室温で1時間おこなった。蛍光励起および位相差画像は蛍光顕微鏡BZ-900 (Keyence, Osaka, Japan)を使用して記録した。

13. 統計解析

全ての検定はサンプル数または症例数を 3 以上で行い、標準偏差は±、サンプル数または症例数は n にて示した。得られたデータの統計的有意性は、2 群間比較に Student's t-test を用いて解析し、P value<0.05 の場合を有意差ありとした。

Ⅲ. 結果

1. 口腔扁平上皮癌組織におけるCD44^{high}およびESA^{low}細胞の検出

口腔扁平上皮癌組織におけるCD44^{high}およびESA^{high}細胞の占める割合を検討するため、口腔扁平上皮癌組織およびコントロールとして正常歯肉上皮を用いて、FACS解析を行った。その結果、正常歯肉はCD44^{high}細胞の割合は1%以下であり、口腔扁平上皮癌組織ではCD44^{high}細胞を10~30%の割合で認めた(図1A)。正常歯肉では0.6%のCD44^{high}/ESA^{high}細胞を認め、これは組織に含まれる上皮細胞を反映しているものと考えられた。また、高分化型の扁平上皮癌組織ではCD44^{high}およびESA^{high}細胞の割合は、中分化~低分化型の扁平上皮癌組織と比較して、高い傾向を示した(図1A)。一方、中分化~低分化型の扁平上皮癌組織では、高分化型と比較してCD44^{high}およびESA^{low}細胞の割合が高かった(図1A)。

さらに、CD44^{high}およびESA^{low}細胞の占める割合とStageおよびリンパ節転移との関係を検討したところ、StageⅢ/Ⅳの症例では、StageⅠ/Ⅱの症例と比較してCD44^{high}およびESA^{low}細胞の割合がやや高い傾向にあった(図1B)。リンパ節転移のある症例では、リンパ節転移のない症例と比較して、CD44^{high}およびESA^{low}細胞の割合は高い傾向にあった(図1B)。

2. 頭頸部扁平上皮癌細胞におけるCD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞のsortingおよびその性状解析

頭頸部扁平上皮癌細胞株HTB41, LUC4, HSC2におけるCD44およびESAの発現をFACSにて解析した。頭頸部扁平上皮癌細胞株において、図2Aに示すように、CD44^{high}/ESA^{low}細胞, CD44^{high}/ESA^{high}細胞, CD44^{low}細胞集団をsortingした。sorting後に各細胞集団の培養を行った結果、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は培養ディッシュ上で線維芽細胞様形態を示し、CD44^{high}/ESA^{high}細胞は上皮様形態を示し、CD44^{low}細胞はCD44^{high}/ESA^{high}細胞と比較して小型の細胞形態を示した(図2B)。以降は、HTB41のデータについて示す。Vimentin, Snail, E-cadherin mRNAの発

現をリアルタイムPCRにて検討したところ、CD44^{high}/ESA^{low}細胞はVimentin, Snailの高発現を示し、CD44^{high}/ESA^{high}細胞はE-cadherinの高発現を示した(図 2 C). スフィアコロニーの形成は細胞の幹細胞性と関係していると考えられており、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は他の細胞と比較してより多くのスフィアコロニーの形成を示した(図 2 D). また、migration assayにて細胞遊走能を検討したところ、CD44^{high}/ESA^{low}細胞では多くの遊走細胞を認めた(図 2 E). さらに、CD44およびESAの発現の経時的変化をFACSにて解析したところ、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は数週間後に親細胞の表現型を再現した(図 2 F). 一方、CD44^{high}/ESA^{high}細胞ではCD44およびESA発現の変化を認めなかった(図 2 F). この結果をふまえて、CD44^{high}/ESA^{low}細胞については、ソーティング後1週間以内に実験を行うこととした.

3. CD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞の抗癌剤抵抗性の検討

薬剤排出に関与するABCトランスポーターによってHoechst33342が排出されることを利用して、排出能が高いサイドポピュレーション細胞(以下SP細胞)の割合をFACSにて解析した(図 3 A). CD44^{high}/ESA^{low}細胞では、他の細胞集団と比較して、8.5%と最も高い割合でSP細胞を認めた.

続いて、各種抗癌剤(cis-diamminedichloro-platinum(II)(Cisplatin), Docetaxel Trihydrate(Docetaxel), 5-Fluorouracil(5-FU), anti-EGFR monoclonal antibody(抗EGFR monoclonal抗体)により誘導されるアポトーシス細胞の割合をFACSにて解析した. Cisplatin存在下でCD44^{high}/ESA^{low}細胞は最も高い抵抗性を示し、またCisplatinの排出に関与しているABCC2 mRNAの高発現を認めた(図 3 B). また、siRNAを用いてABCC2をノックダウンするとCisplatinによるアポトーシス細胞の割合は有意に増加した(図 3 B). このことから、CD44^{high}/ESA^{low}細胞のCisplatinに対する高い抵抗性には、ABCC2が関与していることが示唆された. また、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は最も高いDocetaxel抵抗性を示し、Docetaxel排出に関与しているABCG2 mRNAの高発現を認めた(図 3 C). また、ABCG2をノックダウンするとDocetaxelによるアポトーシス細胞の割合は有意に増加した(図 3 C). この結

果から、CD44^{high}/ESA^{low}細胞のDocetaxelに対する高い抵抗性には、ABCG2が関与していることが示唆された。5-FUにより誘導されるアポトーシスを解析したところ、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は他の細胞と比較して、最も高いアポトーシス抵抗性を示した(図 3 D)。5-FUの分解に関与するDPDのmRNA発現を検討した結果、CD44^{high}/ESA^{low}細胞で有意に高い発現を示した(図 3 D)。また、5-FU存在下でDPD inhibitor であるCDHPを加えることにより、CD44^{high}/ESA^{low}細胞のアポトーシス細胞の割合は増加した(図 3 D)。このことから、CD44^{high}/ESA^{low}細胞の5-FU抵抗性には、DPDが関与していることが示唆された。抗EGFR monoclonal抗体により誘導されるアポトーシスを検討したところ、CD44^{high}/ESA^{high}細胞では他の細胞と比較して、アポトーシス細胞の割合の増加を認めた(図 3 E)。また、EGFR mRNAの発現はCD44^{high}/ESA^{high}細胞で最も高く、CD44^{high}/ESA^{low}細胞では著明に減弱していた(図 3 E)。以上の結果から、CD44^{high}/ESA^{high}細胞における抗EGFR monoclonal抗体に対する感受性には、EGFRの高発現が関与していることが示唆された。

4. 高濃度5-FU存在下でアポトーシス抵抗性を示す細胞集団の検討

HTB41細胞を用いて、高濃度5-FU存在下での細胞集団の変化について検討した。80%以上のアポトーシスを認める高濃度の5-FUを添加した結果、最も高いアポトーシス抵抗性を示すCD44^{high}/ESA^{low}細胞のみの生存が確認できた(図 4 A)。続いて、このCD44^{high}/ESA^{low}細胞を継続培養し、経時的变化をFACS解析したところ、数週間後に親細胞の表現型を再現した(図 4 B)。

5. PGE₂により誘導されるアポトーシス抵抗性の検討

液性因子によるアポトーシス抵抗性の変化を検討するため、PGE₂を用いて検討を行った。PGE₂添加により、CD44^{high}/ESA^{high}細胞の5-FUにより誘導されるアポトーシス細胞の割合は有意に減少した。一方、CD44^{high}/ESA^{low}、CD44^{low}細胞では、明らかなPGE₂添加による影響を認めなかった(図 5 A)。また、CD44^{high}/ESA^{high}細胞の5-FUにより誘導されるアポトーシス細胞の割合は、PGE₂

受容体であるEP1,EP2レセプターのインヒビター添加により有意に増加した(図 5B). また, EP1, EP2は全ての細胞において発現を確認できた (図 5C). 以上の結果から, CD44^{high}/ESA^{high}細胞は, 5-FUにより誘導されるアポトーシスがPGE₂により抑制されることが明らかとなった.

6. CD44^{high}/ESA^{high}細胞における転写因子NR4A2 を介した5-FU抵抗性の検討

CD44^{high}/ESA^{high}細胞において, 転写因子であるNuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2) の発現を検討するため, NR4A2の蛍光免疫染色を行ったところ, NR4A2はCD44^{high}/ESA^{high}細胞の核内に発現を認めた(図 6A). さらに, PGE₂添加後, 3, 6, 12時間後にNR4A2 mRNA発現を検討したところ, CD44^{high}/ESA^{high}細胞のNR4A2 mRNA発現は増加した(図 6B). また, CD44^{high}/ESA^{high}細胞のNR4A2 mRNA発現およびPGE₂添加後の発現をReal time PCRにて行ったところ, PGE₂添加によりNR4A2 mRNAの発現は有意に増加した. 一方, CD44^{high}/ESA^{low}細胞では, PGE₂添加によりNR4A2 mRNA発現の有意な増加は認めなかった(図 6C). また, CD44^{high}/ESA^{high}細胞において, siRNAを用いてNR4A2をノックダウンすると, 5-FUにより誘導されるアポトーシス細胞は有意に増加した(図 6D). さらに, 5-FU及びPGE₂存在下で, NR4A2ノックダウンCD44^{high}/ESA^{high}細胞は, アポトーシス抑制因子であるBcl-2の発現減弱を示し, アポトーシス促進因子であるBaxの発現増加を示した(図 6E). 以上の結果から, CD44^{high}/ESA^{high}細胞において, PGE₂添加により誘導されるNR4A2は, 5-FUによるアポトーシスの抵抗性に関与することが示された.

7. CD44^{high}/ESA^{high}細胞の共培養下でのアポトーシス抵抗性についての検討

5-FU存在下で, GFPを遺伝子導入したCD44^{high}/ESA^{low}細胞とCD44^{high}/ESA^{high}細胞を同一のDish内で共培養し, CD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるアポトーシス細胞をFACSにて解析した(図7A). 共培養下でのCD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるアポトーシス細胞の割合は, 非共培養下と比較して有意に減少した(図7B). さらに, セルカルチャーインサートを用いて同一のメディウム内で両細胞を共培養したと

ころ(図7C), 接触培養時と同様に, CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス細胞の割合は減少した(図7D). 以上の結果から, CD44^{high}/ESA^{low}細胞が産生する何らかの液性因子が, CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性に影響を及ぼしている可能性が示唆された.

8. CD44^{high}/ESA^{low}細胞由来PGE₂により誘導されるCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性の検討

続いて, CD44^{high}/ESA^{low}細胞とCD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるCOX2 mRNA発現とPGE₂産生量を検討したところ, CD44^{high}/ESA^{low}細胞は, 他の細胞と比較して有意に高いCOX2 mRNA発現と, PGE₂産生量を示した(図8A, B). また, CD44^{high}/ESA^{high}細胞にEP1, EP2インヒビターを添加したところ, 5-FUにより誘導されるアポトーシス細胞の割合は軽度増加したが, 有意な変化は認めなかった(図8C). 一方で, EP1, EP2インヒビター存在下で, CD44^{high}/ESA^{low}細胞との共培養を行った際には, CD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるアポトーシス細胞はコントロールと比較して有意に増加した(図8D). このことから, CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性には, CD44^{high}/ESA^{low}細胞が産生するPGE₂が関与する可能性が示唆された.

9. GSK3β阻害剤によるCD44^{high}細胞のアポトーシス抵抗性の変化の検討

5-FU存在下で, GSK3β阻害剤を用いて, LUC4細胞からsortingしたCD44^{high}/ESA^{low}細胞とCD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるアポトーシス細胞の割合を検討した. CD44^{high}/ESA^{low}細胞のアポトーシス細胞の割合はGSK3β阻害剤により有意に増加した(図9A). さらに, GSK3β阻害剤によりCD44^{high}/ESA^{low}細胞はCD44^{high}/ESA^{high}への変化を示した(図9B). また, CD44^{high}/ESA^{high}細胞においても, GSK3β阻害剤により, 5-FUにより誘導されるアポトーシス細胞は有意に増加し(図9C), CD44^{high}/ESA^{high}細胞はCD44^{low}細胞への変化を示した(図9D). 以上の結果から, GSK3β阻害剤により誘導される表現型の変化が, CD44^{high}/ESA^{low}細胞とCD44^{high}/ESA^{high}のアポトーシス抵抗性の減弱に関与することが示された.

IV. 考察

腫瘍の再発や転移には、高い治療抵抗性を示す癌幹細胞が関与していると考えられる。癌幹細胞は自己複製能、多分化能、高い腫瘍形成能などの形質を有し、頭頸部扁平上皮癌においても、CD44^{high}細胞のなかに幹細胞形質をもつ癌細胞が存在することが明らかとなった⁹⁾。CD44は膜貫通型糖タンパク質であり、細胞外マトリックスとの結合を介して細胞内のシグナル伝達に関与しており、腫瘍の増殖、遊走、転移に重要な役割を果たしていると考えられる¹⁰⁾。CD44は固形癌における重要な癌幹細胞マーカーとして用いられているが、癌幹細胞の自己複製能や分化能における機能的な役割は未だ明らかでない。

我々は、口腔癌組織および細胞株において、CD44高発現細胞のなかには、線維芽細胞様形態を示す細胞集団(CD44^{high}/ESA^{low})と上皮様形態を示す細胞集団(CD44^{high}/ESA^{high})の二つの表現型が存在することを明らかとした。CD44^{high}/ESA^{low}細胞は、CD44^{high}/ESA^{high}細胞と比較してVimentinやSnailなどのEMT関連遺伝子を高発現しており、高い遊走能を示した。Sphere forming assayでは、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は他の表現型細胞に比べて明らかに高いコロニー形成能を有していた。これらの結果から、EMT形質を示すCD44^{high}/ESA^{low}細胞は高い幹細胞性をもつと考えられた。さらにCD44^{high}/ESA^{low}細胞は、数週間培養後にCD44^{high}/ESA^{high}細胞が生じ、最終的には親細胞の表現形を認めた。この現象は、同じ遺伝子型をもつ癌細胞集団内で間葉上皮移行が生じ、上皮形質を持つ細胞と間葉形質を持つ細胞がサブポピュレーションを形成して腫瘍組織を再構築することを示唆している。このEMT形質と癌幹細胞形質を併せ持つCD44^{high}/ESA^{low}細胞が、口腔扁平上皮癌の再発や治療抵抗性に重要な役割をもつと考えられる。

今回、CD44^{high}細胞集団の抗癌剤抵抗性を検討したところ、頭頸部癌の化学療法に用いられるCisplatin、5-FUにおいて、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は、他の細胞集団に比べて高いアポトーシス抵抗性を示した。また、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は抗EGFR

monoclonal抗体に対してアポトーシス抵抗性を示し、EGFRの高発現を示したCD44^{high}/ESA^{high}細胞では高いアポトーシス感受性を示したことから、抗EGFR monoclonal抗体に対する抵抗性には、EGFRの発現減弱が関与していることが示された。CD44^{high}/ESA^{low}細胞は種々の抗癌剤に対して特異的なアポトーシス回避経路を有し、高い抗癌剤抵抗性を示すことから、この間葉形質をもつ細胞集団が頭頸部癌化学療法の治療抵抗性に関与していることが強く示唆された。さらに、高濃度5-FU存在下で生存したCD44^{high}/ESA^{low}細胞は親細胞の表現型を再構築したことから、CD44^{high}/ESA^{low}細胞が、口腔扁平上皮癌の再発において重要な役割をもつことが明らかとなった。

PGE₂は、炎症反応に関わる生理活性物質であるプロスタグランジンの一種である。癌の発生や進展には癌の周囲環境における炎症が重要な役割をもつことが知られている¹¹⁾。我々は、PGE₂により誘導されるNR4A2が口腔癌細胞における抗癌剤抵抗性に関与していることを報告した¹²⁾。また、大腸癌においてもNR4A2がアポトーシス抵抗性に関与することが明らかとなっている¹³⁾。NR4A2は転写因子として、細胞増殖、血管新生、DNA修復等の制御に関与しており¹⁴⁻¹⁷⁾、特に癌細胞においてはアポトーシス抵抗性に関与していると考えられる。今回の研究結果からも、NR4A2ノックダウンにより、アポトーシス抑制因子Bcl-2の発現は抑制されたが、アポトーシス促進因子であるBaxの発現は増加した。以上の結果から、CD44^{high}/ESA^{high}細胞の5-FU抵抗性には、外因性のPGE₂により誘導されるNR4A2が重要な役割をもつことが明らかとなった。

さらに今回、最も高いアポトーシス抵抗性を示したCD44^{high}/ESA^{low}細胞が、他の細胞集団に及ぼす影響を検討するため、CD44^{high}/ESA^{low}細胞とCD44^{high}/ESA^{high}細胞の共培養実験をおこなった。その結果、CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス細胞の割合は接触培養時、非接触培養時とも減少した。このことから、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は何らかの液性因子を介してCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性に影響を及ぼしていると考えられた。一方で、CD44^{high}/ESA^{low}細胞は高いCOX2 mRNA発現と、PGE₂産生量を示したことから、CD44^{high}/ESA^{low}細胞由来のPGE₂が他の細胞のアポトーシス抵抗性に関与していると予測し、EPI,

EP2インヒビター存在下で共培養を行い、CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性の変化を検討した。その結果、CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性は有意に減弱したことから、CD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性にはCD44^{high}/ESA^{low}細胞由来のPGE₂供給が関与していることが明らかとなった。このことから、口腔扁平上皮癌において、CD44^{high}/ESA^{low}細胞が自ら高いアポトーシス抵抗性を示すだけでなく、他の細胞集団のアポトーシス抵抗性に関与することにより、腫瘍全体の抵抗性を増加させることが明らかとなった。

従来の化学療法後でみられる腫瘍の再発は、抗癌剤により多くの腫瘍細胞は死滅しても癌幹細胞は生き残るために生じるものと考えられる。癌幹細胞はABCトランスポーター遺伝子（ABCB1, ABCG2）による薬物排泄能が高いため抗癌剤抵抗性を有すると考えられる^{18,19}。さらに、癌幹細胞は静止期にあるため、増殖期をターゲットにした従来の抗癌剤では効果が低いことが予測される。そのため、静止期にとどまる癌幹細胞の分化を促進することをターゲットとする薬剤は、薬剤の感受性も増強すると考えられる。近年、抗癌剤抵抗性を示す癌幹細胞集団に対して、Glycogen synthase kinase 3β (GSK3β)インヒビターを用いた分化誘導療法の有効性が報告されている²⁰⁻²²。GSK3βは細胞周期の進行や細胞増殖を制御することが知られている^{23, 24}。さらに、GSK3βは口腔癌幹細胞の自己複製に重要な役割を担っており、癌幹細胞のマーカー遺伝子としての可能性が示唆される⁸。今回の研究では、5-FU抵抗性を示すCD44^{high}/ESA^{low}細胞において、GSK3β阻害剤を併用したところ、CD44^{high}/ESA^{high}への変化とともにアポトーシス抵抗性の減弱を認めた。さらにCD44^{high}/ESA^{high}細胞においても、GSK3β阻害剤により、CD44^{high}集団から5-FUに感受性を示すCD44^{low}細胞への変化が誘導された。すなわち、GSK3βインヒビターにより、高い抗癌剤抵抗性をもつCD44^{high}/ESA^{low}細胞はCD44^{high}/ESA^{high}細胞へと変化し、さらにCD44^{high}/ESA^{high}細胞をCD44^{low}細胞へと変化させることで、より抗癌剤抵抗性が減弱することが明らかとなった。この結果から、GSK3βインヒビターによるCD44^{low}細胞への誘導は、頭頸部扁平上皮癌における化学療法において有効な補助療法となる可能性が示唆された（図10）。

V. 結論

本研究から，頭頸部扁平上皮癌細胞における $CD44^{high}/ESA^{low}$ 細胞および $CD44^{high}/ESA^{high}$ 細胞が抗癌剤抵抗性に深く関与していることを見出した．さらに，頭頸部扁平上皮癌の抗癌剤治療において， $CD44^{high}/ESA^{low}$ 細胞および $CD44^{high}/ESA^{high}$ 細胞をターゲットとした分化誘導療法が有効である可能性が示唆された．今後， $CD44^{high}/ESA^{low}$ 細胞および $CD44^{high}/ESA^{high}$ 細胞における表現型の可塑性や周囲微小環境に対する応答のメカニズムの解析が，癌幹細胞における抗癌剤抵抗性の制御を理解するために重要であると考えられた．

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えて頂くとともに、御指導、御校閲を賜った広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門口腔外科学 故鎌田伸之教授、基礎生命科学部門細菌学 菅井基行教授、基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学 高田 隆教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲、御助言賜りました応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学 岡本哲治教授、統合健康科学部門公衆口腔保健学 杉山 勝教授、基礎生命科学部門粘膜免疫学 飛梅 圭准教授、応用生命科学部門口腔外科学 武知正晃准教授に深謝いたします。

また、本研究遂行のために御指導頂いた口腔外科学 東川晃一郎講師、重石英生助教、奥井 岳博士を始めとする口腔外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を陰で支えてくれた両親および家族に心より感謝いたします。

VII. 参考文献

1. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM.: Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.: *Cancer Res.*; 66: 9339-9344 (2006)
2. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells.: *Nature.*; 414: 105-111 (2001)
3. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.: *Proc Natl Acad Sci USA.*; 100: 3983-3988 (2003)
4. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C.: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer.: *Stem Cell.*; 1: 313-323 (2007)
5. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T.: Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression.: *Nat Rev Cancer*; 5: 744-749 (2005)
6. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.: *Cell.*; 133: 704-715 (2008)
7. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, Costea DE, Mackenzie IC.: Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative.: *Cancer Res.*; 71: 5317-5326 (2011)
8. Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, Emich H, Rodini CO, Gemenetzidis E, Fazil B, Sugiyama M, Kamata N, Mackenzie IC.: Maintenance of stem cell self-renewal in head and neck cancers requires actions of GSK3 β influenced by CD44 and RHAMM.: *Stem*

Cells.; 31: 2073-2083 (2013)

9. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan J, Dalerba P, Weissman IL, Clarke ML, Ailles LE.: Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma.: Proc Natl Acad Sci USA.; 104: 973-978 (2007)
10. Zoller M.: CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?: Nat Rev Cancer.; 11: 254-267 (2011)
11. Wang MT, Honn KV, Nie D.: Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression.: Cancer Metastasis Rev.; 26: 525–534 (2007)
12. Shigeishi H, Higashikawa K, Hatano H, Okui G, Tanaka F, Tran TT, Rizqiawan A, Ono S, Tobiume K, Kamata N.: PGE₂ targets squamous cell carcinoma cell with the activated epidermal growth factor receptor family for survival against 5-fluorouracil through NR4A2 induction.: Cancer Lett.; 28: 227-236 (2011)
13. Holla VR, Mann JR, Shi Q, DuBois RN. : Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. J Biol Chem.; 281: 2676-2682 (2006)
14. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW.: Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1.: Mol. Endocrinol.; 6: 2129–2135 (1992)
15. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J.: Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast.: Science.; 252: 1296–1300 (1991)
16. Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM.: Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors.: Cell.; 81: 541–550 (1995)
17. Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T.: Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors.: Nature.; 423: 555–560 (2003)

18. Uematsu T, Hasegawa T, Hiraoka Y, Komatsu F, Matsuura T, Yamada A, Yamaoka M.:
Multidrug resistance gene 1 expression in salivary gland adenocarcinomas and oral
squamous-cell carcinomas.: *Int J Cancer.*; 15: 187-194 (2001)
19. Loebinger MR, Giangreco A, Groot KR, Prichard L, Allen K, Simpson C, Bazley L, Navani N,
Tibrewal S, Davies D, Janes SM.: Squamous cell cancers contain a side population of
stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade.: *Br J Cancer.*;
29: 380-387 (2008)
20. Atkins RJ, Dimou J, Paradiso L, Morokoff AP, Kaye AH, Drummond KJ, Hovens
CM.: Regulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) by the Akt pathway in
gliomas.: *Journal of Clinical Neuroscience.*; 19: 1558–1563 (2012)
21. Minamoto T, Mai W, Kyo S, Shakoori A, Miyashita K, Yokoi K, Shimasaki T, Motoo
Y, Kawakami K.: Deregulated GSK3 β sustains gastrointestinal cancer cells by
modulating hTERT and telomerase.: *Cancer Res.*; 72: 2862 (2012)
22. You JS, Kang JK, Seo DW, Park JH, Park JW, Lee JC, Jeon YJ, Cho EJ, Han JW.:
Depletion of Embryonic Stem Cell Signature by Histone Deacetylase Inhibitor in
NCCIT Cells.: Involvement of Nanog Suppression.: *Cancer Res.*; 69 (14): 5716-5725
(2009)
23. Cohen P, Frame S.: The renaissance of GSK3 β .: *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 2: 769-776
(2001)
24. Pap M, Cooper GM.: Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol
3-Kinase/Akt cell survival pathway.: *J Biol Chem.*; 273: 19929-19932 (1998)

VIII. 付図説明

表1

本研究で用いたプライマーの塩基配列を示す.

表2

本研究のアポトーシス解析で用いた試薬を示す.

図1. 口腔扁平上皮癌組織におけるFACSによるCD44^{high}およびESA^{high}細胞の検出

- A. 正常組織および口腔扁平上皮癌組織におけるCD44^{high}およびESA^{high}細胞の割合
- B. 口腔扁平上皮癌組織におけるCD44^{high}/ESA^{low}細胞の割合とStageおよびリンパ節転移との関係

図2. 頭頸部扁平上皮癌細胞におけるCD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞の性状

- A. 頭頸部扁平上皮癌細胞株HTB41, LUC4, HSC2におけるCD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞のFACS sorting
- B. HTB41, LUC4, HSC2におけるCD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞の位相差顕微鏡写真
- C. Real time PCRによるVimentin, Snail, E-cadherinのmRNA発現
- D. スフィアコロニーの形成
- E. マイグレーションアッセイ
- F. CD44^{high}/ESA^{low}およびCD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるCD44およびESAの発現の経時的変化

図3 CD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞における抗癌剤抵抗性

- A. Hoechst染色によるCD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{low}細胞におけるSP細胞の検出
- B. 上段右：Cisplatinによるアポトーシス細胞の検出
上段左：Real time PCRによるABCC2 mRNA発現
下段右：ABCC2 siRNAノックダウン細胞におけるABCC2 mRNA発現
下段左：ABCC2 siRNAノックダウン細胞におけるアポトーシス細胞の検出
- C. 上段右：Docetaxelによるアポトーシス細胞の検出
上段左：Real time PCRによるABCG2 mRNA発現
下段右：ABCG2 siRNAノックダウン細胞におけるABCG2 mRNA発現
下段左：ABCG2 siRNAノックダウン細胞におけるアポトーシス細胞の検出
- D. 上段：5-FUによるアポトーシス細胞の検出
下段右：Real time PCRによるDPDのmRNA発現
下段左：CDHP存在下での5-FUによるアポトーシス細胞の検出
- E. 上段：抗EGFR monoclonal抗体により誘導されるアポトーシス細胞の検出
下段：Real time PCRによるEGFRのmRNA発現

図4. 高濃度5-FU存在下で生存したCD44^{high}/ESA^{low}細胞の表現型の変化

- A. 高濃度5-FU存在下で生存した細胞のCD44およびESAの発現解析
- B. CD44^{high}/ESA^{low}細胞の継続培養による経時的変化

図5. PGE₂により誘導されるアポトーシス抵抗性の検討

- A. PGE₂存在下での5-FUにより誘導されるアポトーシス細胞の検出
- B. PGE₂受容体のインヒビター存在下で5-FUにより誘導されるアポトーシス
- C. Western blotting法によるPGE₂受容体の発現の確認

図6. CD44^{high}/ESA^{high}細胞における転写因子NR4A を介した5-FU抵抗性の検討

- A. CD44^{high}/ESA^{high}細胞の蛍光免疫細胞染色像(green : NR4A2)を示す
- B. CD44^{high}/ESA^{high}細胞のPGE₂添加後のNR4A2のmRNA発現量

- C. CD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{high}/ESA^{high}細胞のPGE₂添加後のNR4A2のmRNA発現
- D. NR4A2 siRNAノックダウンCD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるアポトーシス細胞の検出
- E. NR4A2 siRNAノックダウンCD44^{high}/ESA^{high}細胞におけるアポトーシス関連遺伝子のmRNA発現（上段：Bcl-2, 下段：Bax）

図7. CD44^{high}/ESA^{low}細胞がCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性に及ぼす影響

- A. CD44^{high}/ESA^{low}細胞の蛍光免疫細胞染色像（EGFP; Enhanced Green Fluorescence Protein）および共培養の模式図
- B. 共培養時におけるCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス細胞の割合
- C. セルカルチャーインサートを用いた共培養の模式図
- D. セルカルチャーインサートを用いた共培養時におけるCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス細胞の割合

図8. CD44^{high}/ESA^{low}細胞由来PGE₂により誘導されるCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス抵抗性の検討

- A. 各細胞のCOX2のmRNA発現
- B. 各細胞のPGE₂産生量の検討（培養後24時間）
- C. SC-51089, AH-6809存在下でのCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス細胞の割合
- D. SC-51089, AH-6809存在下でのCD44^{high}/ESA^{high}細胞のアポトーシス細胞の割合（セルカルチャーインサートを用いた共培養時）

図9. GSK3βインヒビターによるCD44^{high}/ESA^{low}細胞のCD44^{high}/ESA^{high}細胞への移行

- A. CD44^{high}/ESA^{low}細胞の5-FUおよびGSK3βインヒビターを添加した際のアポトーシス細胞数の割合

- B. CD44^{high}/ESA^{low}細胞の5-FUおよびGSK3βインヒビターを添加した際の、CD44およびESAをマーカーとしたFACS解析
- C. CD44^{high}/ESA^{high}細胞の5-FUおよびGSK3βインヒビターを添加した際のアポトーシス細胞の割合
- D. CD44^{high}/ESA^{high}細胞の5-FUおよびGSK3βインヒビターを添加した際の、CD44およびESAをマーカーとしたFACS解析

図10. CD44^{high}/ESA^{low}細胞およびCD44^{high}/ESA^{high}細胞のCD44^{low}細胞への誘導によるアポトーシス抵抗性の減弱

IX. 表および図

表1.

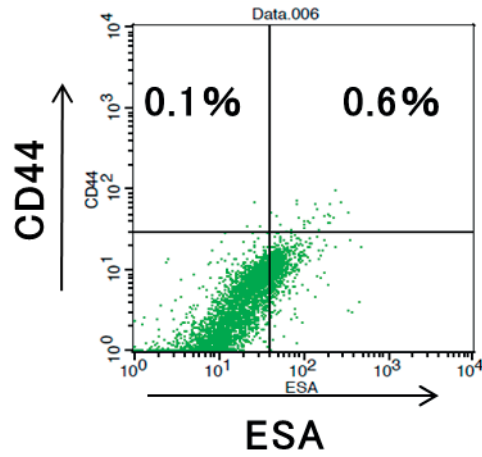
Gene symbol	Primer sequences
Vimentin	Sense: 5'-CCC TCA CCT GTG AAG TGG AT-3' Anti-sense: 5'-GAC GAG CCA TTT CCT CCT TC-3'
Snail	Sense: 5'-CAA GGA ATA CCT CAG CCT GG-3' Anti-sense: 5'-CAT CTG AGT GGG TCT GGA GG-3'
E-cadherin	Sense: 5'-GAA CGC ATT GCC ACA TAC AC-3' Anti-sense: 5'-AGC ACC TTC CAT GAC AGA CC-3'
ABCC2	Sense: 5'-TGA GCA AGT TTG AAA CGC ACA T-3' Anti-sense: 5'-AGC TCT TCT CCT GCC GTC TCT-3'
ABCG2	Sense: 5'-GCT GCA AGG AAA GAT CCA AG-3' Anti-sense: 5'-TCC AGA CAC ACC ACG GAT AA-3'
DPD	Sense: 5'-TTG AGA GCT GTG ACC TCC ATT GCT-3' Anti-sense: 5'-TCT GAA TGG CAC TGC ATA CCT GGA-3'
EGFR	Sense: 5'-GAG AGG AGA ACT GCC AGA A-3' Anti-sense: 5'-GTA GCA TTT TAT GGA GAG TG-3'
NR4A2	Sense: 5'-GTC TCA GCT GCT CGA CAC G-3' Anti-sense: 5'-TTT TGC ACT GTG CGC TTA AA-3'
Bcl-2	Sense: 5'-CCC TGT GGA TGA CTG AGT AC-3' Anti-sense: 5'-GCA TGT TGA CTT CAC TTG TG-3'
Bax	Sense: 5'-GGC CCA CCA GCT CTG AGC AGA-3' Anti-sense: 5'-GCC ACG TGG GCG TCC CAA AGT-3'
Cox2	Sense: 5'-TTG CTG GAA CAT GGA ATT ACC-3' Anti-sense: 5'-TGC CTG CTC TGG TCA ATG-3'
G3PDH	Sense: 5'-GTG AAC CAT GAG AAG TAT GAC AAC-3' Anti-sense: 5'-ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'

表 2.

試薬	製品会社	濃度
5-fluorouracil(5-FU)	Merck, Darmstadt, Germany	25 μ g/ml
5-chloro-2, 4-dihydropyridine(CDHP)	Tokyo Kayaku kogyo, Tokyo, Japan	5mM
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma	5ng~15ng/ml
SC-51089	Enzo Life Sciences	10 μ g/ml
AH-6809	Cayman Chemical, Michigan, USA	10 μ g/ml
H-89	Enzo life science	1 μ g/ml
N-(4-Methoxybenzyl)-N'-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl) urea (GSK3 β inhibitor)	Merck	200nM
cis-diamminedichloro-platinum(II)(Cisplatin)	LKT Laboratories, St.Paul, USA	10 μ g/ml
Docetaxel Trihydrate(Docetaxel)	LKT Laboratories	1 μ g/ml
anti-EGFR monoclonal antibody	Merck	2.5 μ g/ml

A

正常組織



口腔扁平上皮癌組織

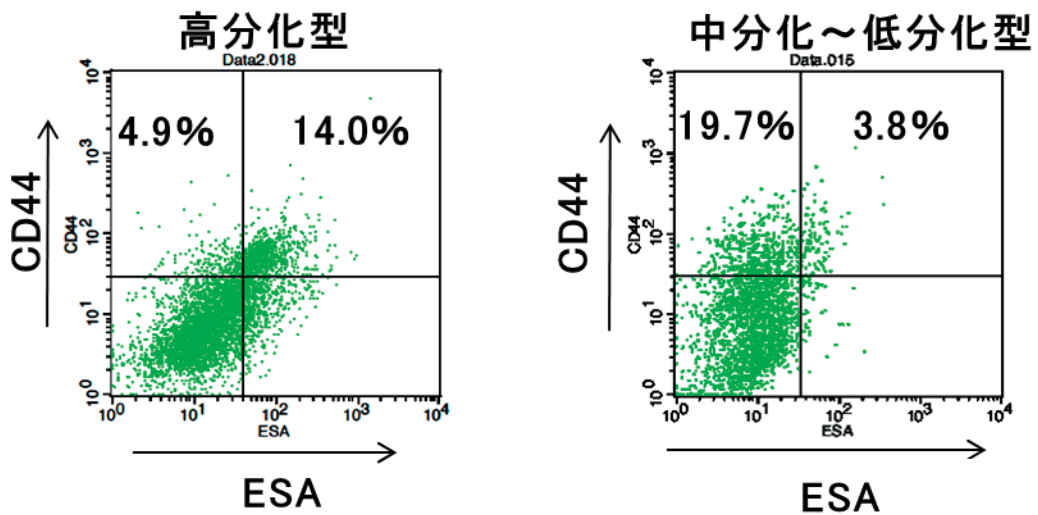


図1

B

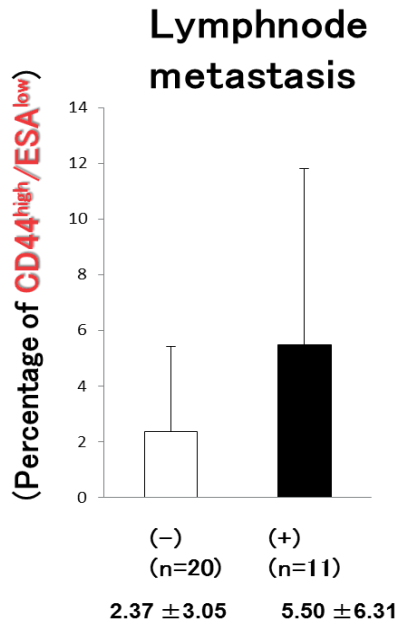
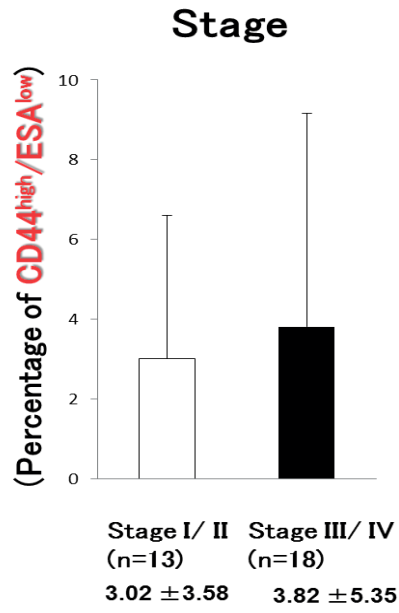


図1

A

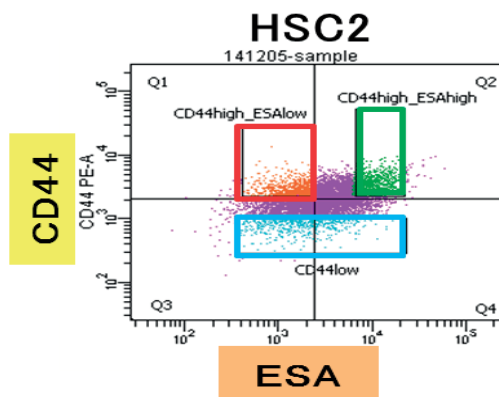
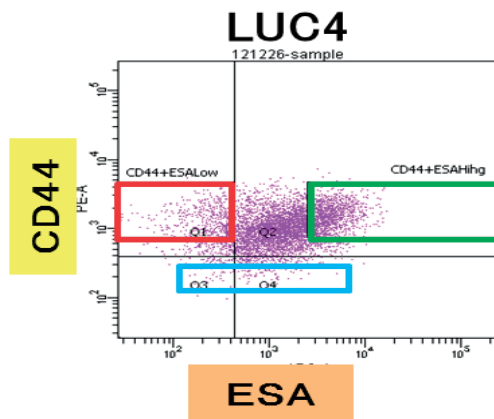
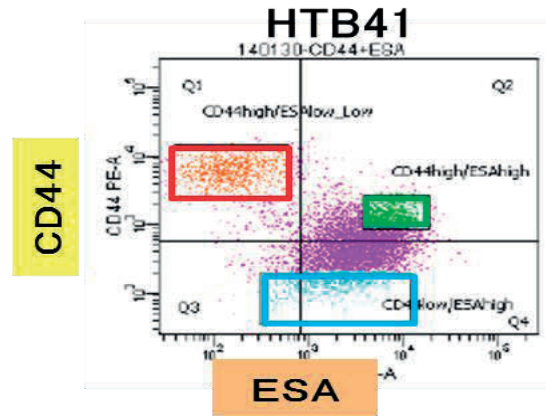


図2

B

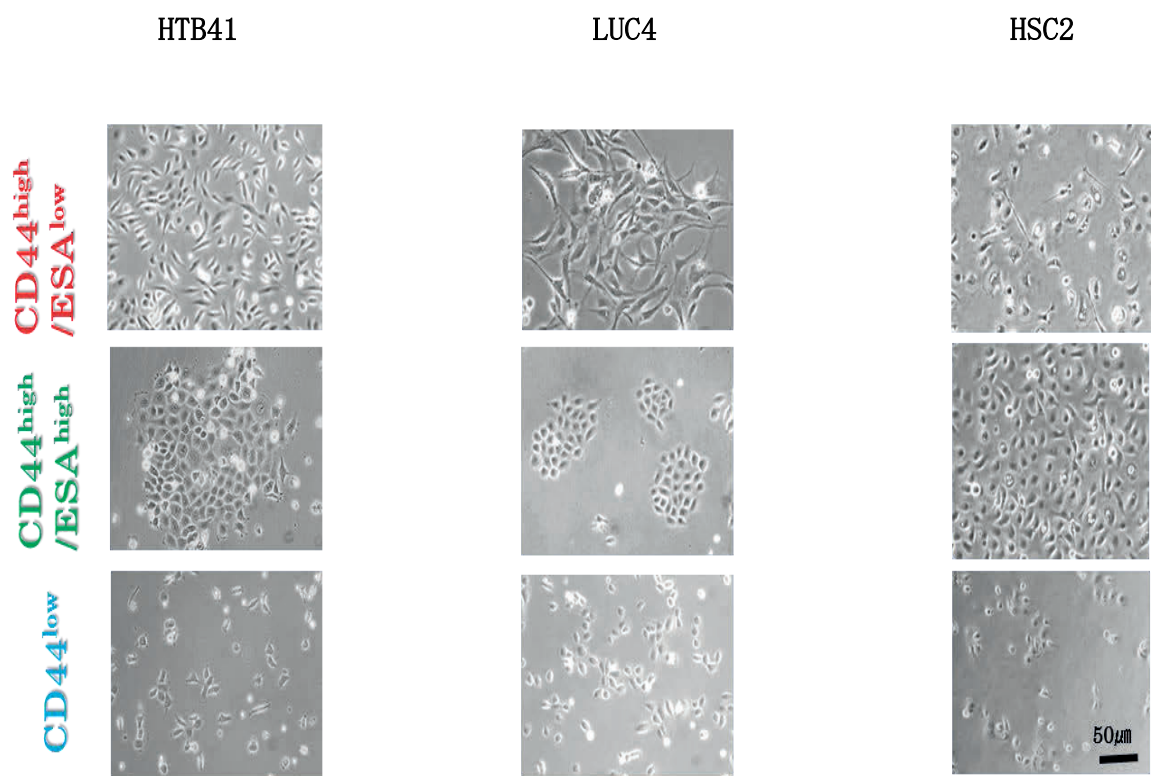


図2

C

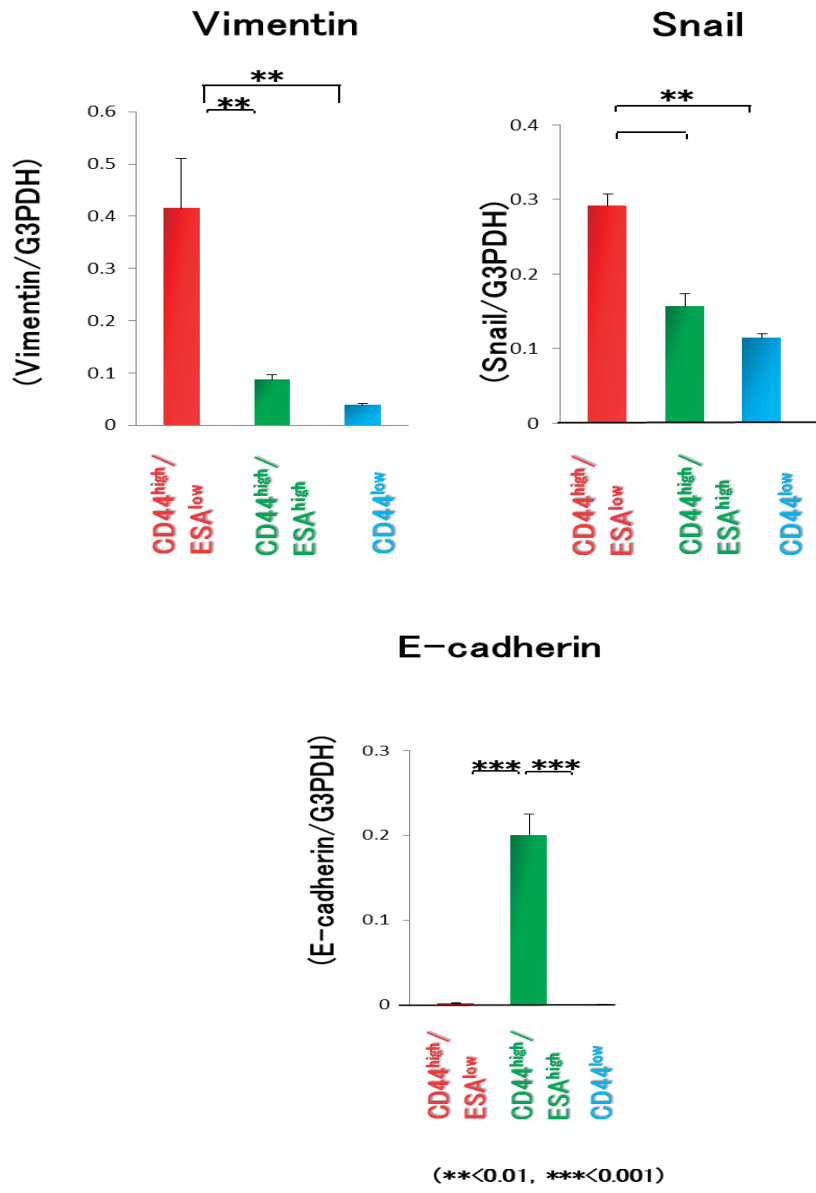
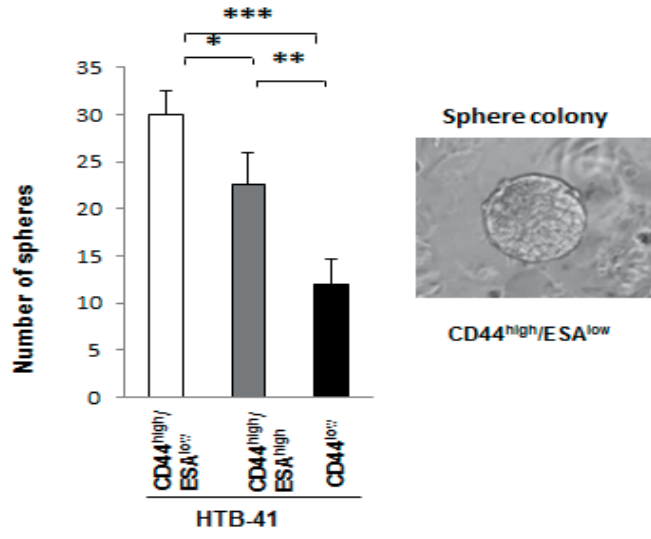


Figure 2

D



E

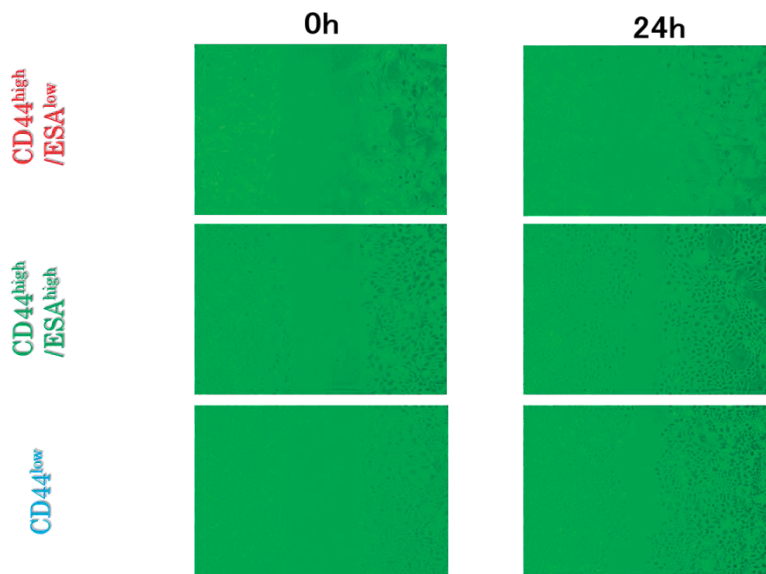


図2

F

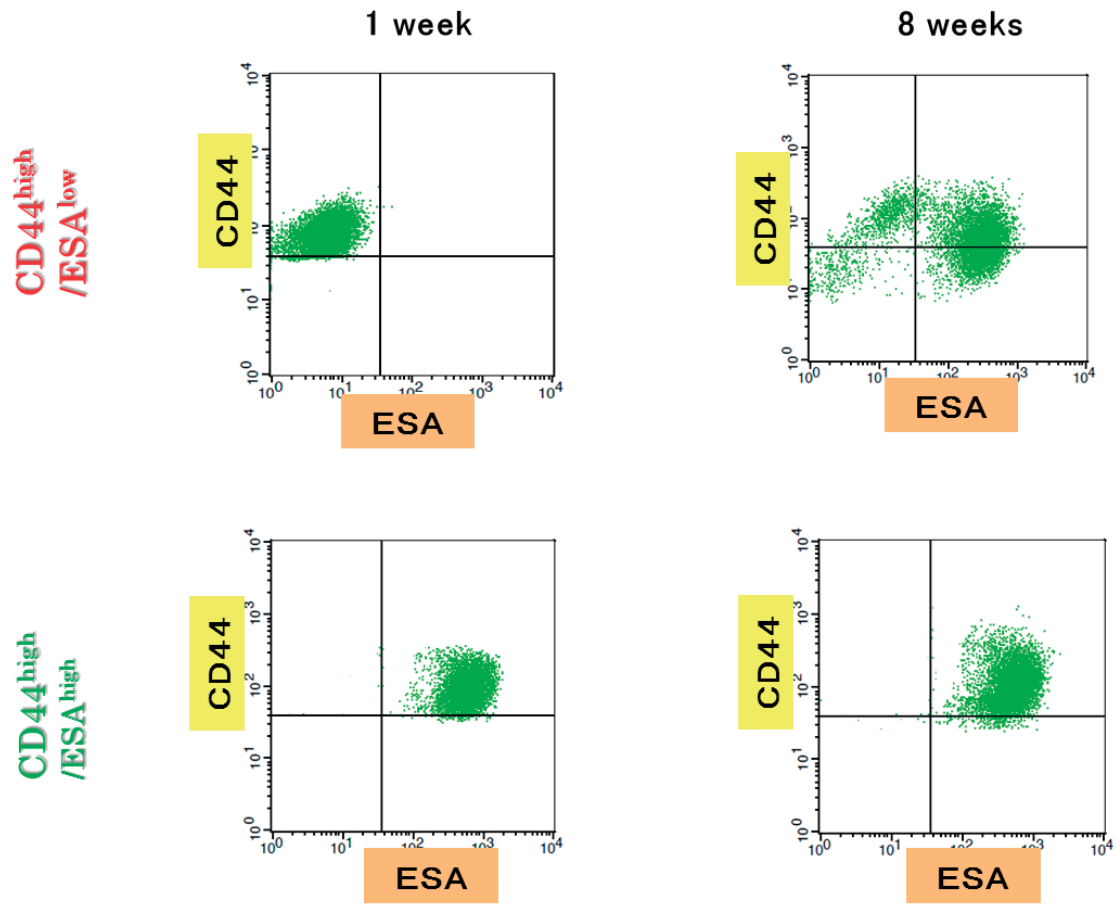


図2

A

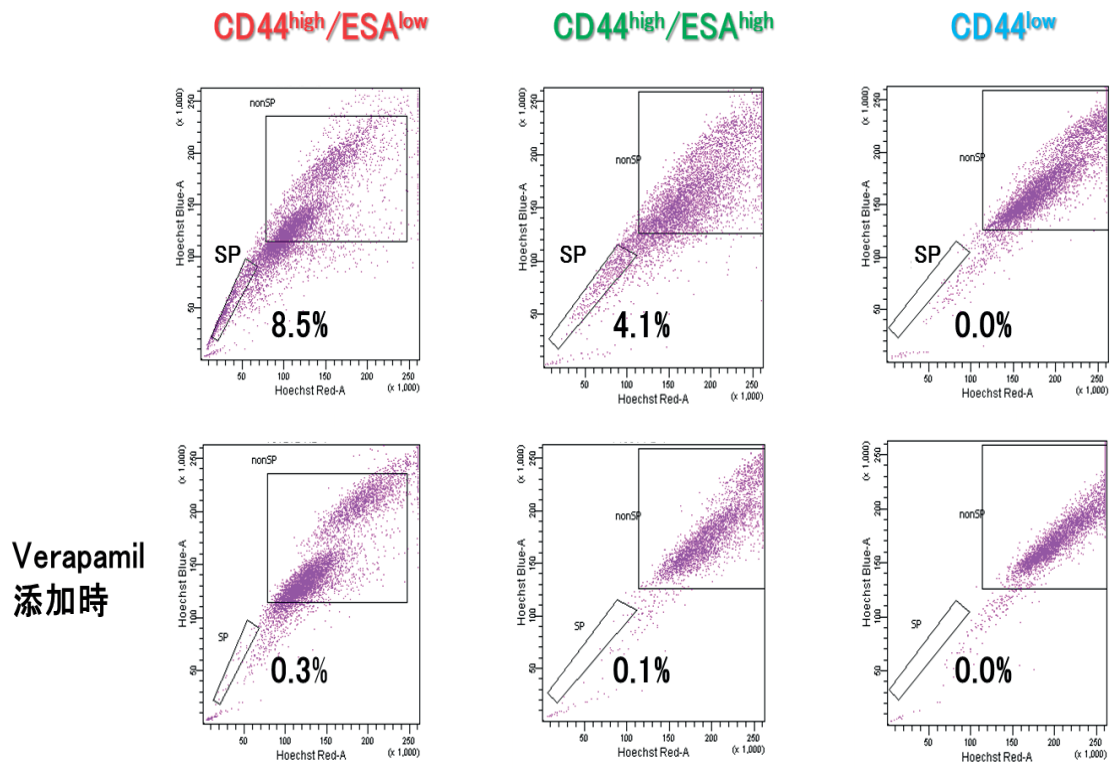
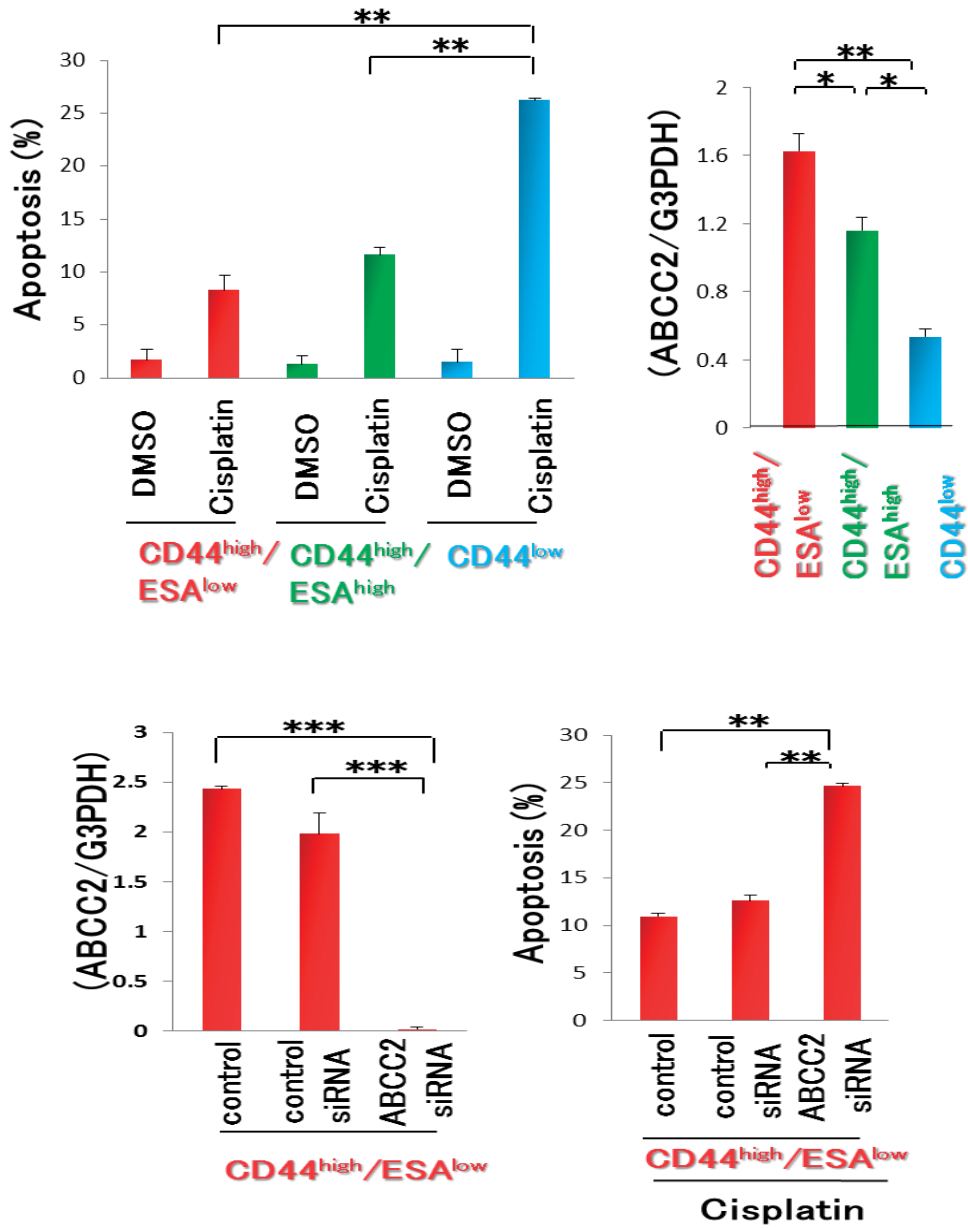


図3

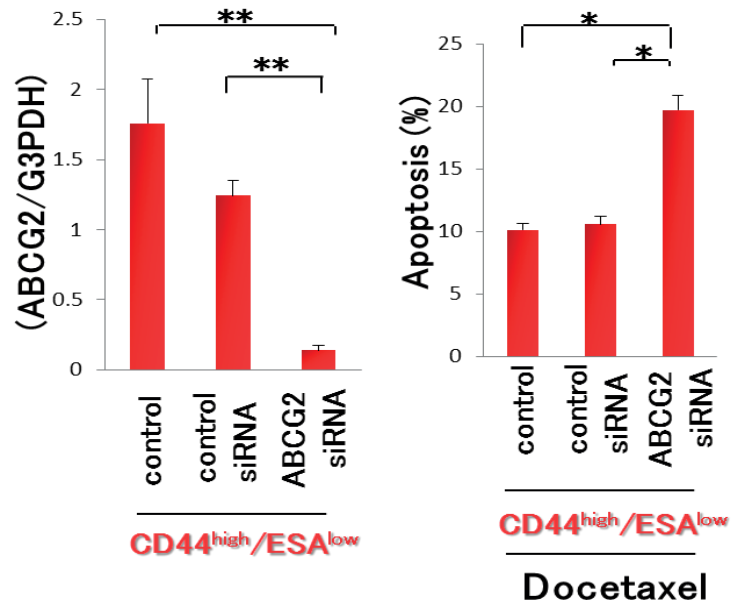
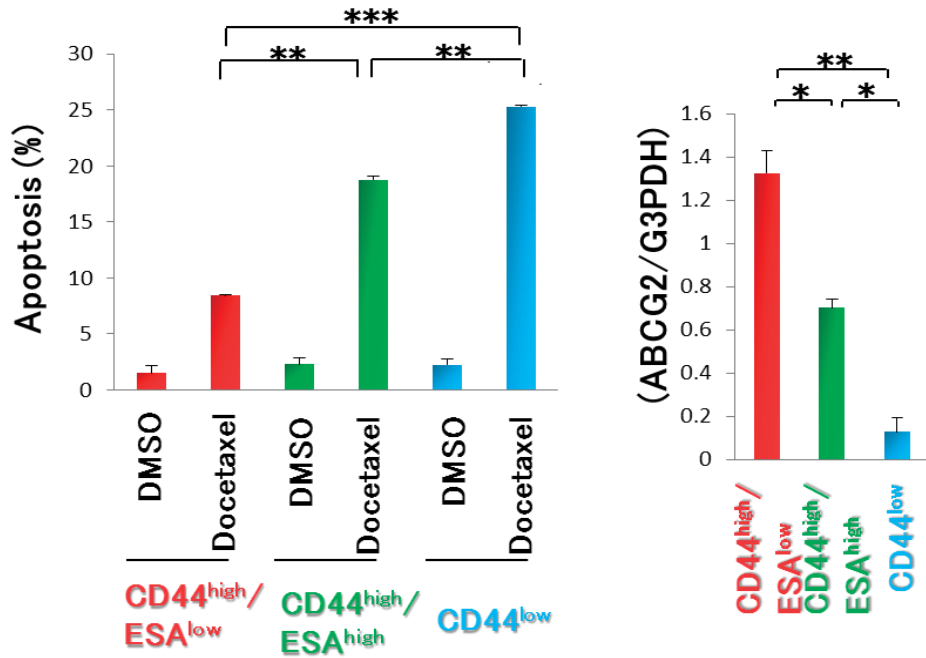
B



(*<0.05, **<0.01, ***<0.001)

☒3

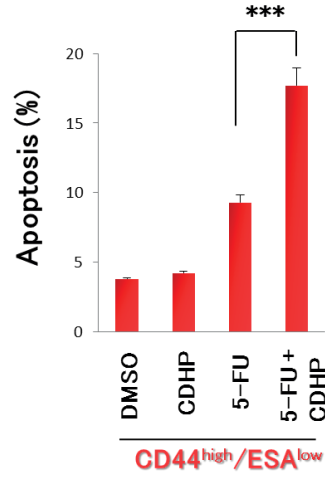
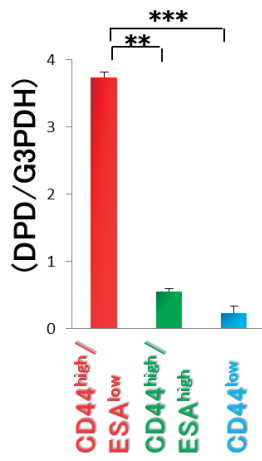
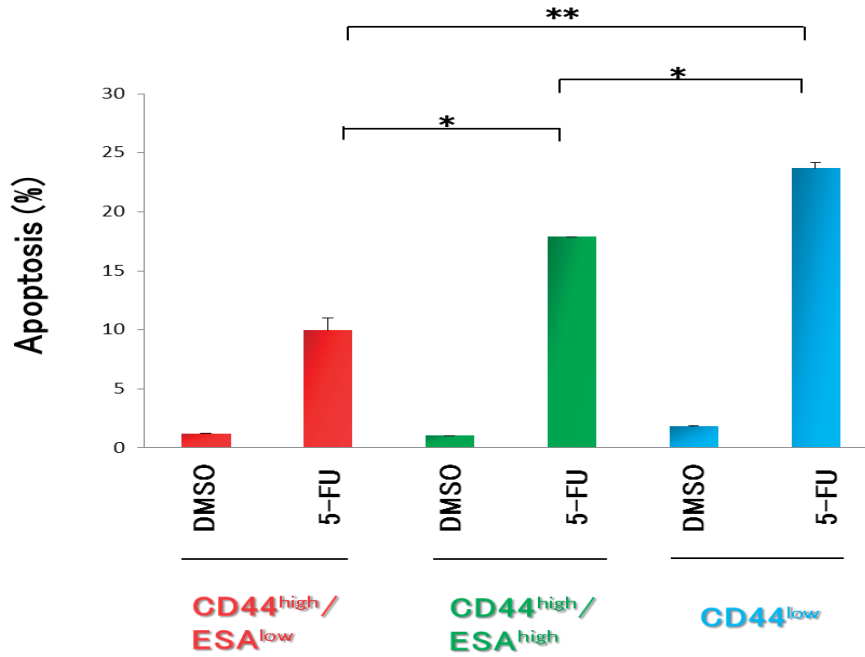
C



(*<0.05, **<0.01, ***<0.001)

3

D

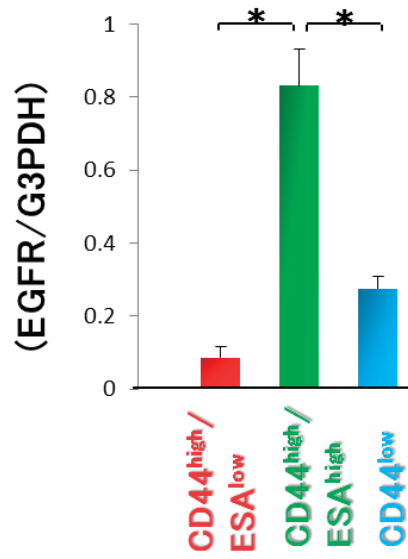
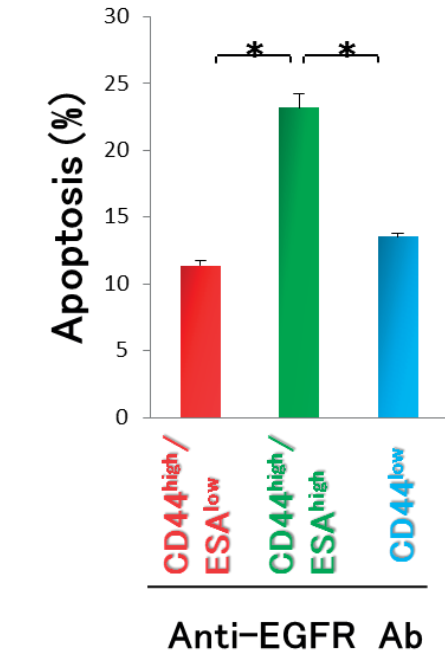


* DPD : Dihydropyrimidine Dehydrogenase
 CDHP:5-Chloro-2,4-dihydropyridine, DPD inhibitor.

(*<0.05, **<0.01, ***<0.001)

3

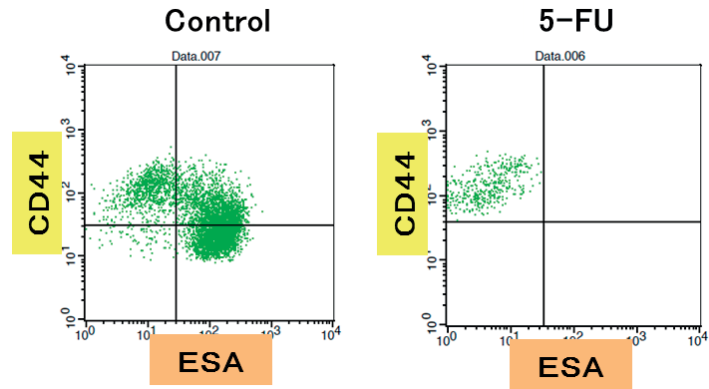
E



(*<0.05)

☒3

A



B

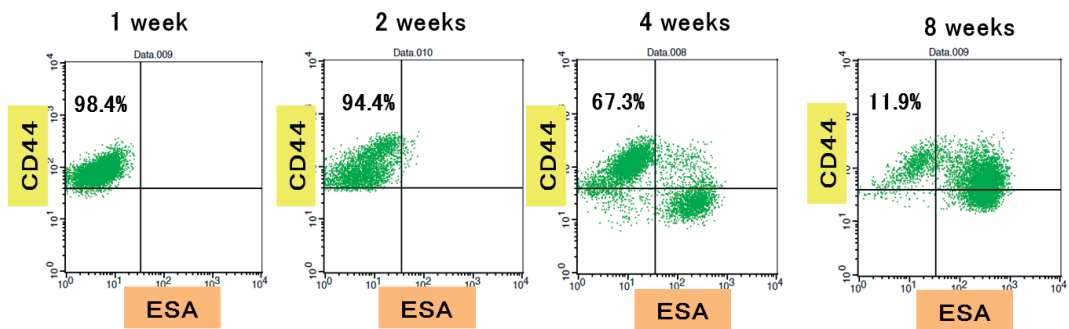
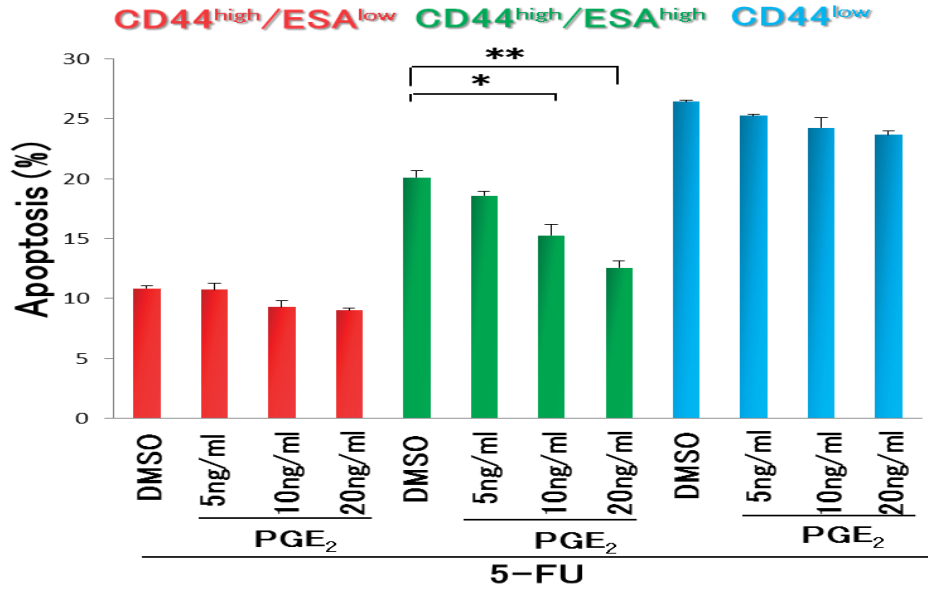
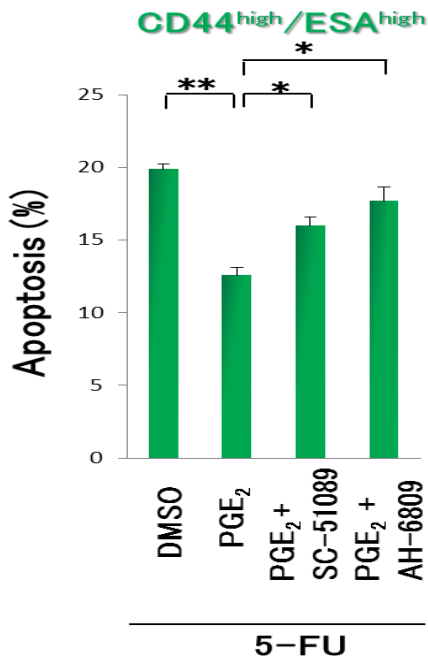


図4

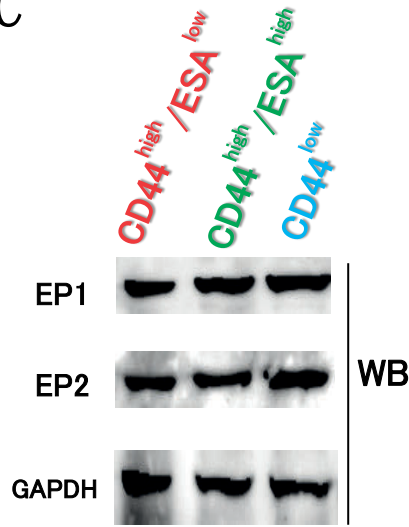
A



B



C

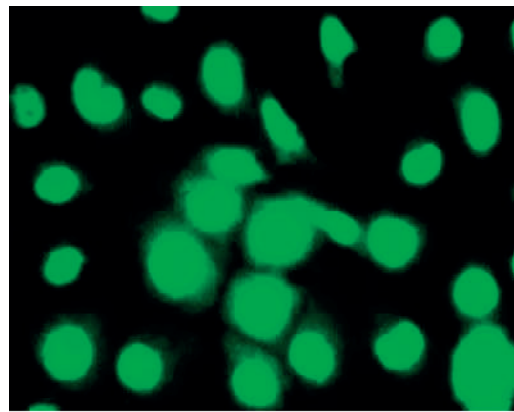


* SC-51089:EP1(PGE₂受容体)阻害
 AH-6809:EP1およびEP2阻害
 (*<0.05, **<0.01)

図5

A

NR4A2



IF

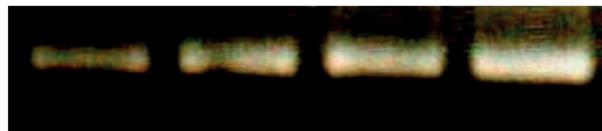
CD44^{high}/ESA^{high}

B

+PGE₂

0 3 6 12 (hr)

NR4A2



RT-PCR

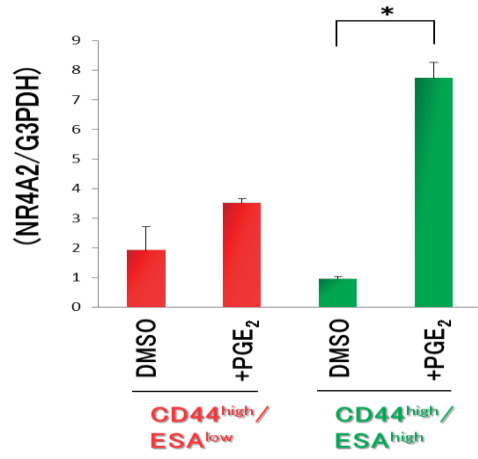
G3PDH



CD44^{high}/ESA^{high}

図6

C



D

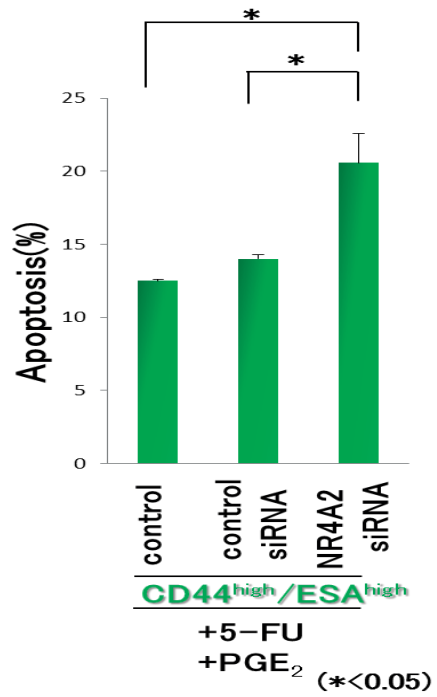
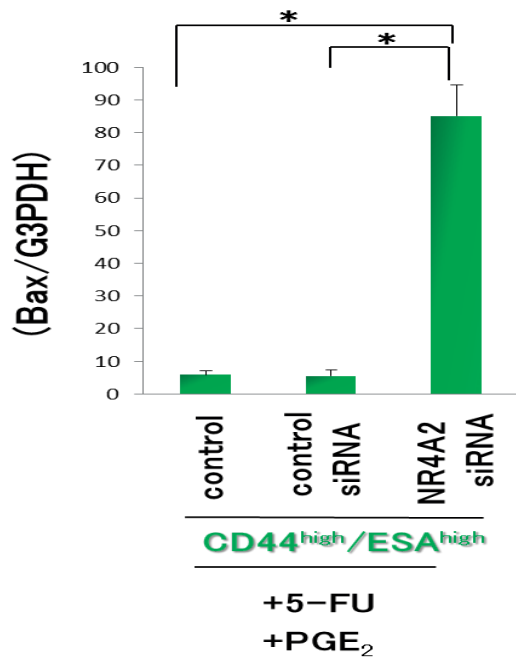
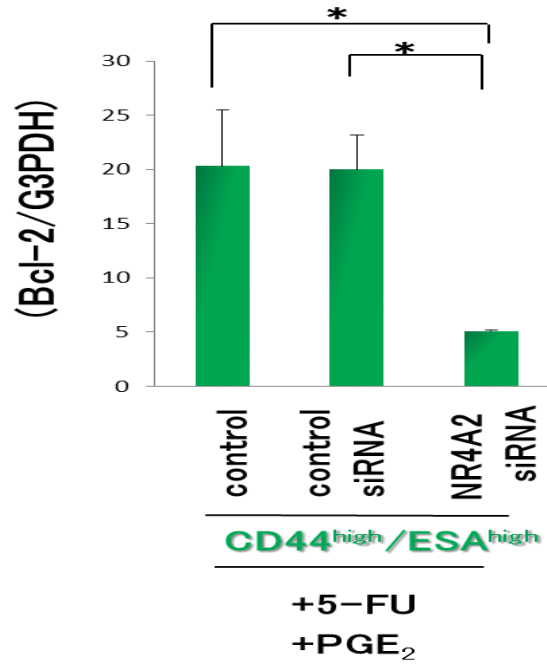


图6

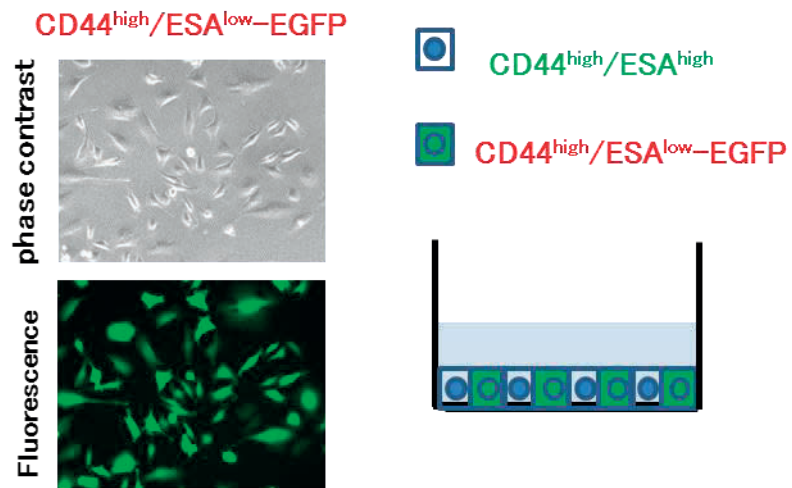
E



(*<0.05)

⊠6

A



B

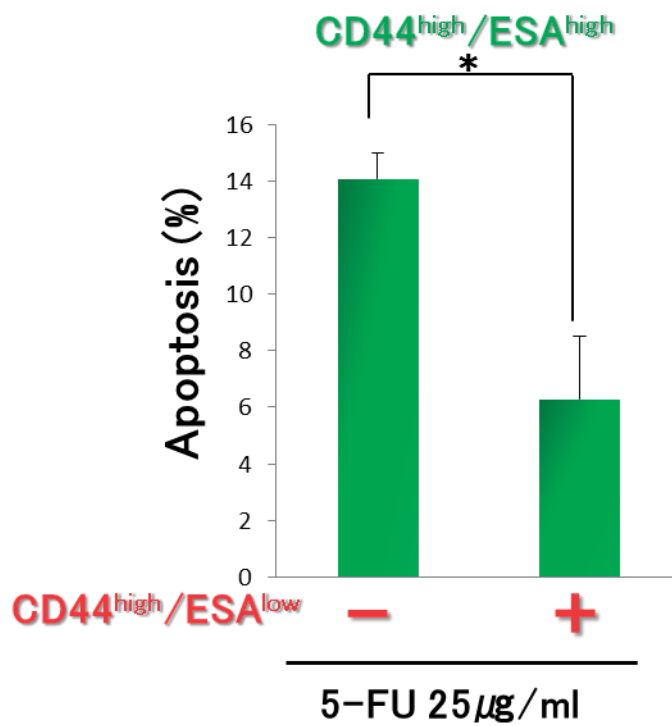
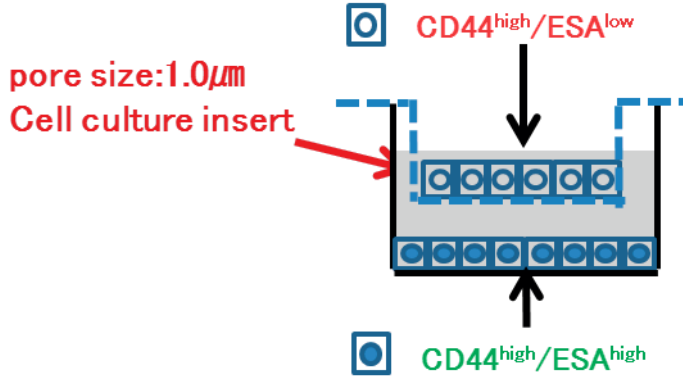


图7

C



D

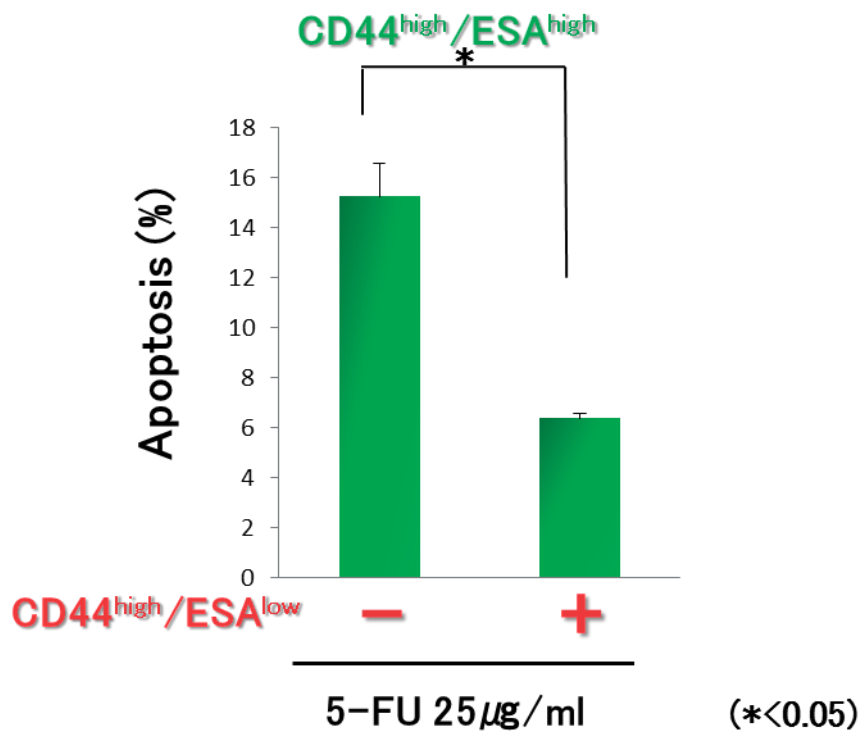
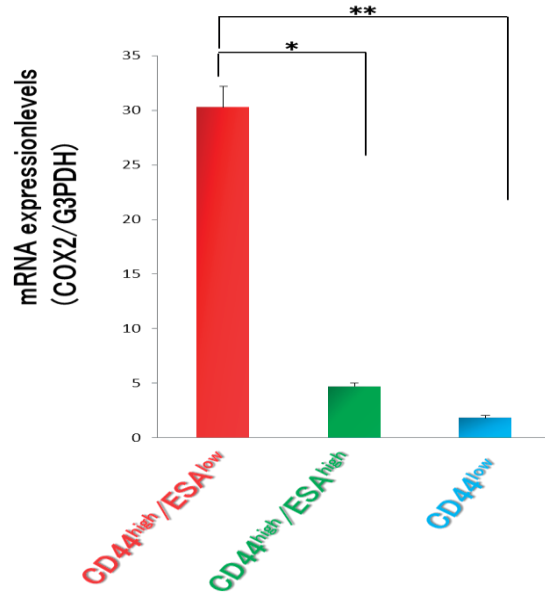


图7

A



B

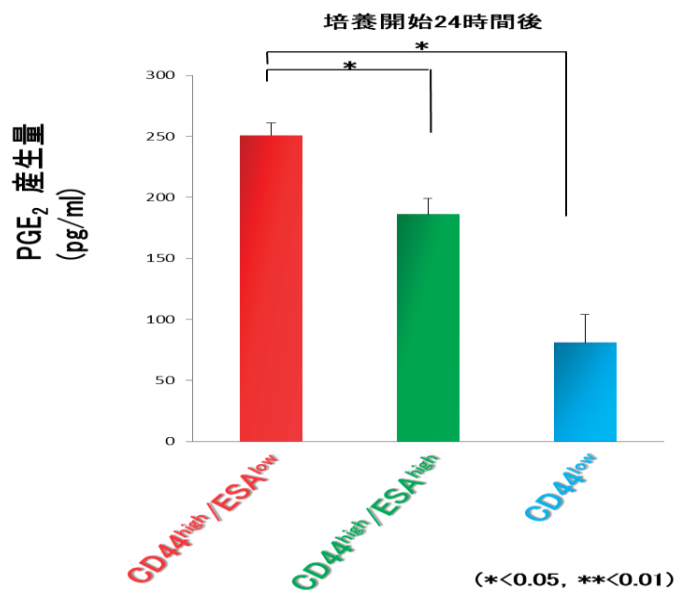
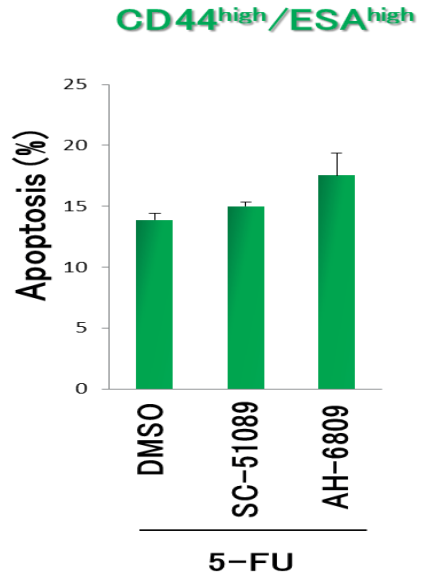
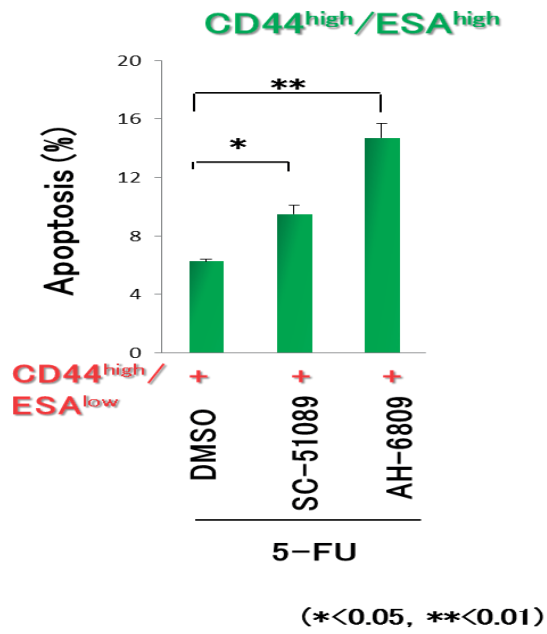


図8

C



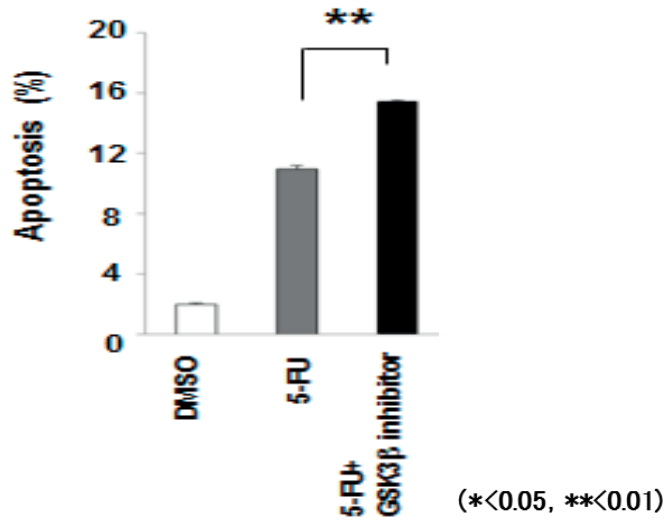
D



☒8

A

LUC4



B

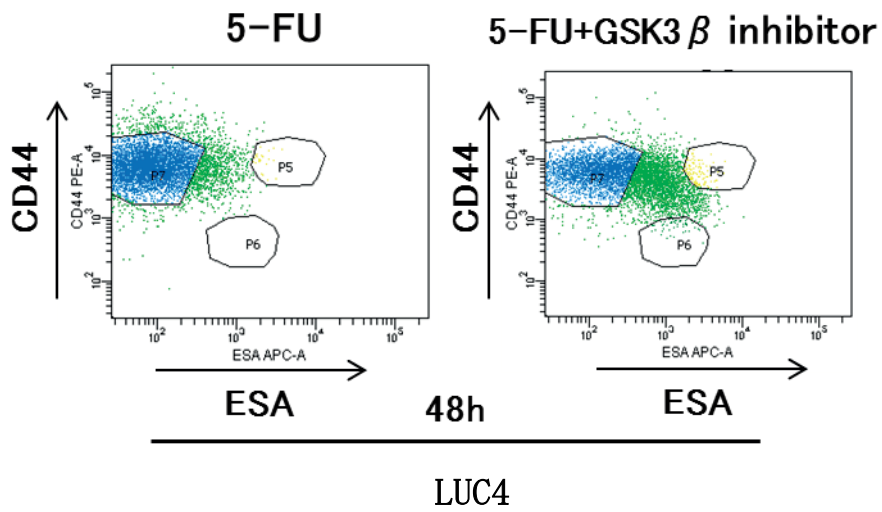
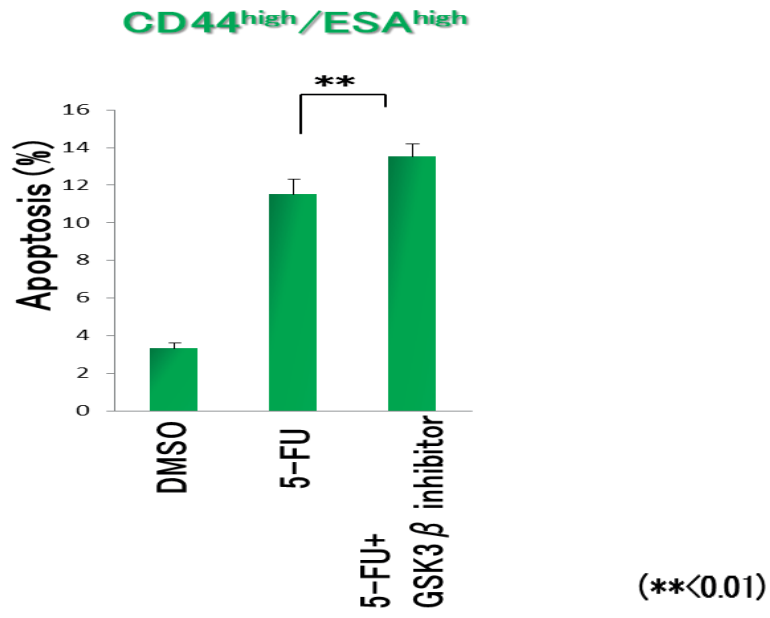


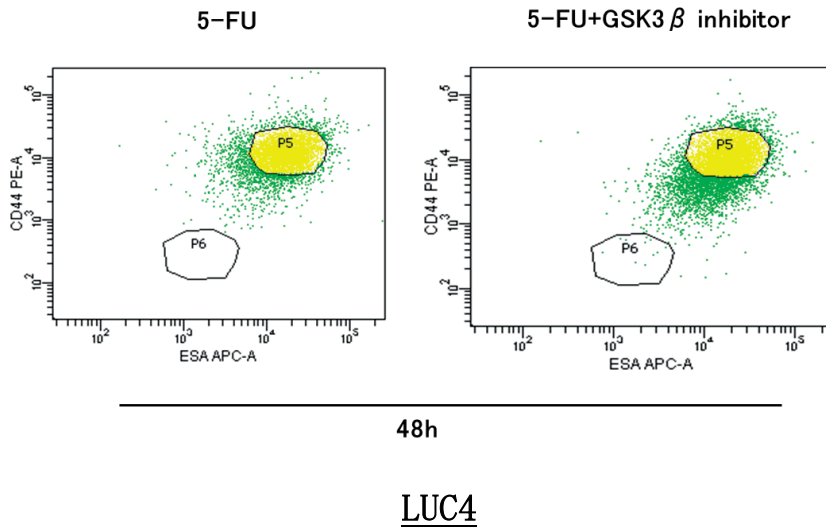
图9

C

LUC4



D



☒9

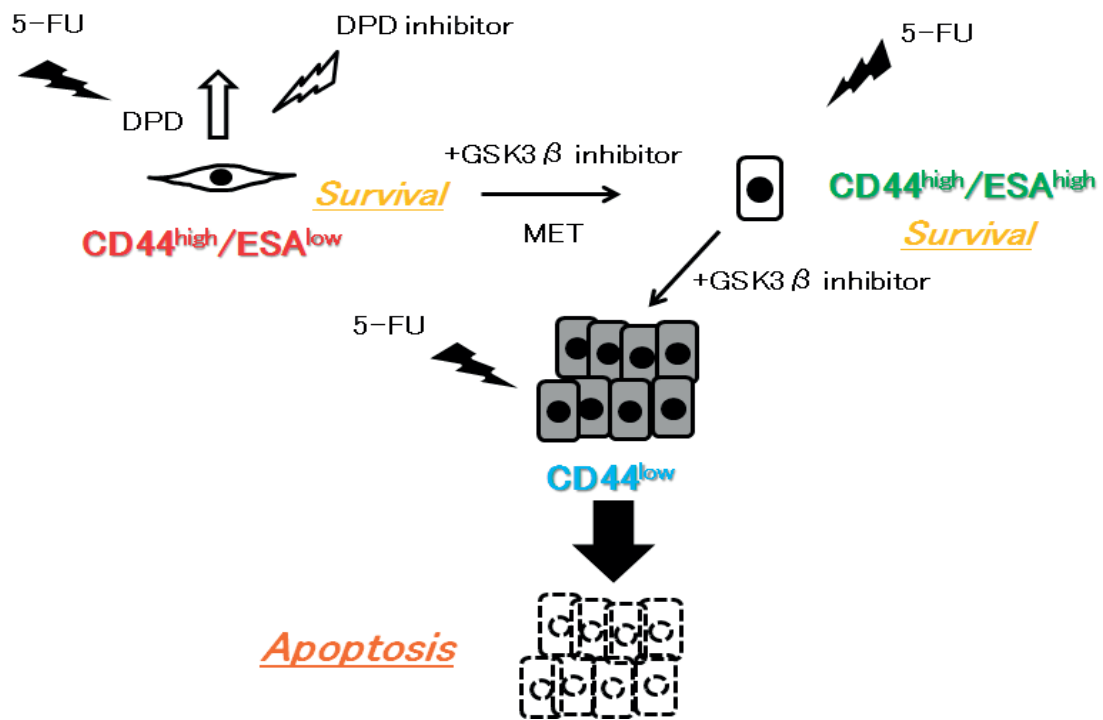


图10