

学 位 論 文

無血清培養系を用いた口腔癌由来細胞株の
樹立ならびに機能解析

学位申請者 佐藤 成紀

広島大学大学院医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻

2019 年度

主指導教員：岡本 哲治 教授

分子口腔医学・顎顔面外科学

謝辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学 岡本哲治教授に深厚なる謝意を表します。また、本文作成上、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜りました本学 生体材料学講座 加藤功一教授、顎顔面解剖学 寺山隆司教授に深謝致します。本論文作成に際し御助言、御校閲を賜りました、本学歯科放射線学 柿本直也教授、本学公衆口腔保健学 太田耕司教授、本学分子口腔医学・顎顔面外科学 虎谷 茂昭准教授に感謝の意を表します。尚、本研究を進めるに際し、終始御懇切なる御指導と御配慮を賜りました本学医系科学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学 濱田 充子博士に心から感謝の意を表します。さらに、多大なる御支援、御協力を頂きました本学医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学教職員各位に感謝します。最後に、常に自分を支えてくれた家族及び親族に心より感謝いたします。

目次

略記	1
第1章 緒言	4
第2章 口腔癌由来細胞株の樹立ならびに機能解析	
第1節 実験材料及び方法	7
(1) 培養材料及び培養方法	
(2) 細胞株の機能解析	
1) ① 細胞増殖能の検討	
② ONEC-TS の細胞接着能の検討	
2) 染色体解析	
3) ノードマウス背部皮下での造腫瘍能の検討	
4) マイコプラズマ感染試験	
5) Short tandem repeat (STR) 解析	
6) 蛍光免疫染色法を用いた各細胞における EGFR の発現検討	
7) EGF 及び抗 EGFR 抗体の細胞増殖に及ぼす影響	
8) ONEC における上皮・神経系マーカー及び神経内分泌マーカーの発現	
解析	

① 蛍光免疫染色法による上皮系及び神経系マーカーの発現検討

② 免疫組織染色法による神経内分泌マーカーの発現検討

③ Western blot 法による神経内分泌マーカーの発現検討

9) Transcriptome 解析

10) 各細胞株の抗癌剤に対する感受性試験

11) Ponatinib、Everolimus、Sunitinib の各細胞株の増殖及びシグナ

ル伝達に及ぼす影響

12) qRT-PCR 法及び Western blot 法を用いた各細胞株における FGFR

の発現検討

第 2 節 結果 21

1) 樹立細胞株の位相差顕微鏡像

2) ① 各細胞株の細胞増殖能の検討結果

② ONEC-TS の細胞接着能の検討結果

3) 染色体解析結果

4) ノードマウス背部皮下での造腫瘍能の検討結果

5) マイコプラズマ感染試験結果

6) STR 解析結果

7) 蛍光免疫染色法を用いた各細胞における EGFR の発現検討結果

8) EGF 及び抗 EGFR 抗体の細胞増殖に及ぼす影響の検討結果

9) ONEC における上皮・神経系マーカー及び神経内分泌マーカーの発現

解析結果

① 蛍光免疫染色法による ONEC-TS における上皮系及び神経系マ-

ーカーの発現検討結果

② 免疫組織染色法による ONEC-TS における神経内分泌マーカーの

発現検討結果

③ Western blot 法による ONEC-TS における神経内分泌マーカーの

発現検討結果

10) Transcriptome 解析結果

11) ONEC の抗癌剤に対する感受性試験結果

12) Ponatinib、Everolimus、Sunitinib の各細胞株の増殖及びシグナル伝

達に及ぼす影響の検討結果

13) qRT-PCR 法及び Western blot 法を用いた各細胞株における FGFR の

発現検討

第 3 章 考察 28

第 4 章 総括 38

参考文献 40

图表 50

略記

ABP	Alcian blue and PAS stain
BSA	Bovine Serum Albumin
CD56	CD56 molecule
CDDP	cis-diamminedichloro-platinum(II)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CT	Computed tomography
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4', 6-diamidino- 2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DT	Doubling time
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
H-E	Hematoxylin and eosin stain
HRP	Horseradish peroxidase
kDa	Kilo Dalton

pKRT	Pan keratin
mRNA	Messenger RNA
NET	Neuroendocrine tumor
NGFR	Nerve growth factor receptor
OASCC	Oral adenosquamous cell carcinoma
ONEC	Oral neuroendocrine carcinoma
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET-CT	Positron emission tomography
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	quantitative Real time protein chain reaction
RPMI	Roswell park memorial institute media
SCC	Squamous cell carcinoma
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STR	Short tandem repeat
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Tris(hydroxyl methyl) amino methane

TritonX-100 Octylphenol ethoxylate

Tween20 Polysorbate 20

VP-16 Etoposid

5-FU 5-Fluorouracil

第1章 緒言

Geyによりヒト子宮頸癌から世界初の癌細胞株であるHeLa細胞が樹立されて以来 (Gey, et al., 1952)、多くの癌細胞株が樹立されてきた (Eagle, 1955; Rangan, 1972)。口腔領域において、Mooreらによる喉頭癌由来H.Ep3細胞株の樹立 (Moore, et al., 1955)、堀越らによる歯肉癌由来Ca9-22細胞株 (堀越, 1974)、宮内らのHo-1-u1細胞株およびHo-1-n1細胞株 (宮内 et al., 1985; Miyauchi, et al., 1988) をはじめとして、多くの細胞株の樹立が報告がされている。

従来、これら細胞の樹立研究や細胞株を用いた機能解析などの分子・生物学的研究は、血清添加条件で行われてきた (Easty, et al., 1981)。血清中には、種々の蛋白、脂質や生理活性物質、さらに未知の因子が存在しており、細胞本来の栄養要求性や増殖因子要求性を正確に検討することは難しい。さらに、細胞が産生・分泌する種々の因子を細胞内分泌学的に明らかにすることは困難である。

癌細胞株の樹立は非常に困難で (Eun, et al., 2005)、長期培養過程で細胞が細菌や真菌などに汚染したり (Rebecca, et al., 2014)、線維芽細胞の過増殖、さらに癌細胞自身の増殖能の低下などによることが主な要因として挙げられる (Ganjibakhsh, et al., 2017)。一方、Satoらは培地中に加える血清の機能は、細胞の増殖・分化にとって必要なホルモンや細胞増殖因子を供給することであるとの仮説に基づき、無血清培養法を開発した (Hayashi and Sato, 1976; Barnes and Sato, 1980)。無血清培養法は、基礎栄養培地にインスリンやトランスフェリンなどの既知のホルモン、結合蛋白や細胞増殖因子などを加えた無血清培地を用いて、正常及び癌

細胞の増殖・維持を可能にする方法であり、現在までに血管内皮細胞以外の細胞は全て無血清培養法で培養が可能である (Sato, et al, 2002)。

通常の生体において血清と直接接している細胞は、血管内皮細胞以外に存在しない。つまり、ほとんどの細胞は血清成分をその増殖・分化の維持に必要としていないことを意味している。例えば、口腔粘膜や皮膚の上皮組織・細胞は、間質組織から基底膜を經由して供給される栄養因子で増殖・分化が維持されている。生体では上皮細胞は非常に活発に増殖しているが、間質組織の線維芽細胞はほとんど増殖していない。従来の血清添加培養法で口腔粘膜組織を培養すると線維芽細胞は高い増殖能を示すが、上皮細胞はほとんど増殖できない事実は、血清添加培養法が生体機能を反映していないことを示すよい例である。

無血清培養下では、培養初期には線維芽細胞の増殖を認めるものの、速やかにその増殖を停止する。これに対し、腫瘍細胞は無血清培養下においても増殖が維持されるため、線維芽細胞の混入なしに腫瘍細胞株の単離が容易となる利点を有している。このように無血清培地を用いることにより、血清に含まれる様々な蛋白等の影響なしに、腫瘍細胞の増殖・分化等の詳細なメカニズムの解析や、種々の生理活性分子や抗癌剤の作用機序を検討することが可能となる。

著者の所属する研究室では、口腔癌の生検組織や手術切除組織より、無血清培養法を用いて癌細胞株の樹立研究を行い、これら細胞株が発現・産生する細胞増殖因子、受容体及び **exosome** などの解析を通して、口腔癌細胞の特性を細胞内分泌学的に明らかにしてきた。

本研究では、口腔扁平上皮癌及び口腔領域への発生が稀で、継代維持可能な細胞株の樹立の報告のない口腔腺扁平上皮癌、さらに無血清条件下での培養所見や免疫組織学的検索の結果を病理部に情報提供することで確定診断に至った、同じく口腔領域への発生が極めて稀である口腔原発神経内分泌癌の細胞株の樹立研究を、無血清培養系を用いて行った。さらにこれら細胞の増殖因子要求性や遺伝子発現などの特性を、細胞・分子生物学的に明らかにすることを目指した。

第2章 口腔癌細胞株の樹立

第1節 実験材料及び方法

(1) 培養材料及び培養方法

著者の所属する研究室・診療科で治療を行った、口腔扁平上皮癌、口腔腺扁平上皮癌、口腔原発神経内分泌癌患者の腫瘍組織を採取後、速やかに初代培養を行った（広島大学ヒトゲノム倫理審査委員会承認計画研究第ヒ58号及び191号）。

基礎栄養培地として、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco and Freeman, 1959)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と RPMI1640 (Moore, et al., 1967)(Sigma-Aldrich) を 1:1 に混合した RD 培地 (Sato, et al, 1987) を脱イオン化及び逆浸透により純化した水 (ELIX 水純化装置; Merck Millipore, MA, USA) に溶解し、90mg/L アンピシリンナトリウム (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan)、90mg/L カナマイシン (GIBCO, KS, USA)、110mg/L ピルビン酸ナトリウム (Wako, Osaka, Japan)、15mM N-2 ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES; 同仁化学, Kumamoto, Japan)、重炭酸ナトリウム (Wako) 2g/L を添加後、NaOH (Wako) を用いて pH 7.4 に調整したものを 0.22 μ m 径メンブレンフィルター (Milipore, MA, USA) で濾過滅菌し用いた (Barnes and Sato, 1980)。さらに RD 基礎栄養培地に、10 μ M 2-メルカプトエタノール、10 μ M 2-アミノエタノール、20nM セレン酸ナトリウム (片山化学工業株式会社, Osaka, Japan)、5 μ g/ml ヒトトランスフェリン、5 μ g/ml インスリン及び oleic acid conjugated with fatty acid-free bovine serum albumin

(4.7 µg/ml)(Sigma-Aldrich) の 6 種類の因子 (6F) を加えた RD6F を用いた (Okamoto, et al., 1996)(表 1)。

生検及び手術切除組織より無菌下に得た腫瘍組織片を、2 本のメスを用いて可能な限り細切し、RD 培地にて回収・遠心後に、RD6F 培地に懸濁し、Type I collagen (新田ゼラチン株式会社, Osaka, Japan) でコートした 60mm 培養 dish に組織片を含む培地を 1ml 播種し、37°C、5%CO₂ 気相下で培養した。その後、100-200µl の RD6F 培地を適宜加え (図 1A)、explant culture 法を用いて初代培養を行った。初代培養開始後、組織片より十分に outgrowth した段階 (図 1B) で、細胞を 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) と 0.04% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA ; 同仁化学) を含む Dulbecco's Ca²⁺、Mg²⁺-free phosphate-buffer saline (PBS(-))(Trypsin/EDTA) で処理後、細胞分散させ、0.05%trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich) で trypsin の作用を中和・遠心後、継代培養を行った。

以下に、初代培養を行った症例の臨床経過を記す。

① 口腔扁平上皮癌細胞 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC)

症例 1 : 60 歳男性、左側舌癌 (T2N0M0 Stage II) の診断下、cis-diamminedichloro-platinum (II) (CDDP) による超選択的動注化学療法を施行した。腫瘍は臨床的に消失したため、経過観察を行っていたが、初診より 4 か月後、腫瘍再発及び左側頸部リンパ節転移を認め、腫瘍切除及び頸部郭清術が行われ、切除リンパ節より初代培養を行った。術後 3 か月目、造影 CT 及び PET-CT 撮影にて全身転移を認め、初診より 15 か月で永眠された。

症例 2 : 71 歳女性、左側口底癌 (T4aN3bM0 Stage IIIb) の診断下、手術が行われ、切除原発巣より初代培養を行った。術後 2 か月目、癌性胸膜炎を認め、初診より 5 か月後、永眠された。

症例 3 : 61 歳男性、左側下顎歯肉癌 (T2N1M0 Stage II) の診断下、腫瘍切除、下顎連続離断、頸部郭清術及び再建術が行われ、切除リンパ節より初代培養を行った。術後 9 か月目に腫瘍の再発を認め、CDDP と 5-Fluorouracil (5-FU) による化学療法後、手術施行された。術後 18 か月、左側頸部リンパ節転移を認め、Cetuximab と Paclitaxel による化学療法が施行され、その後、転院となったが転院先にて永眠された。

症例 4 : 40 歳男性、右側舌癌 (T1N0M0 Stage I) の診断下、初診より 1 か月後、腫瘍切除術を行い、切除原発巣より初代培養を行った。術後 2 か月目、右側頸部リンパ節転移を認め、頸部郭清術が行われ CDDP 及び 5-FU による術後化学療法と放射線照射が施行された。その後、経過は良好で再発・転移を認めることなく現在に至っている。

症例 5 : 80 歳男性、左側下顎歯肉癌 (T4aN3bM0 Stage IIIb) の診断下、下顎骨連続離断及び再建術が行われた。切除原発巣より初代培養を行った。術後 1 か月目、腫瘍の再発を認め、初診より 3 か月後、永眠された。

② 口腔腺扁平上皮癌細胞 (Oral adenosquamous cell carcinoma: OASCC)

症例 1 : 30 歳女性、右側舌癌 (T2N0Mx) の診断下、腫瘍切除術を行い、切除原発巣より初代培養を行ったが、細胞の増殖能が低かったため、継代維持が困難で、細胞株の樹立には至らなかった。初診 6 か月後、右側頸部リンパ節転移を認め頸部郭清術を行い、切除リンパ節より、再度初

代培養を行った。術後、CDDP 及び 5-FU による化学療法及び放射線照射を施行し、その後転院となるも、再発・転移を認めることなく経過良好である。

症例 2：80 歳女性、左側舌癌（T2N0M0 Stage II）の診断下、腫瘍切除術を行い、切除原発巣より初代培養を行った。術後、左側頸部リンパ節転移を認め頸部郭清術が施行され、CDDP による術後放射線化学療法が施行された。初診 15 か月目、骨転移及び全身転移を認め、初診より 16 か月、永眠された。

③ 口腔原発神経内分泌細胞（Oral neuroendocrine carcinoma: ONEC）

本症例は、前医での生検にて左側下顎歯肉扁平上皮癌と診断を受け、加療目的に当科初診した。画像診断の結果、顎下・頸部リンパ節や遠隔臓器への転移は認めず、左側下顎歯肉癌（T4aN0M0 Stage IVa）の診断下、手術を予定したが、腫瘍の急速な増大を認めたため、再度生検を行うとともに、生検組織の一部より初代培養を行った。病理診断は未分化癌で、その後も腫瘍は増大傾向を示したため、Docetaxel、CDDP、5-FU による術前化学療法を施行した後、手術が行われた。初代培養細胞が培養 dish に接着せず neuro sphere を形成し浮遊状態で増殖したこと、蛍光免疫染色にて神経系マーカー及び神経内分泌腫瘍のマーカーの発現が認められたことから、神経系腫瘍が疑われたため、これらの所見を病理部に情報提供した結果、神経内分泌癌の確定診断を得た。初診より 2 か月後、肺・肝転移を認め Nivolumab 投与が開始されたが、口腔内に腫瘍の再発を認め、Nivolumab 投与に加え放射線緩和照射を施行した。腫瘍は増大傾向を示し、腫瘍減量術及び CDDP と Etoposid (VP-16) による PE 療法を施行したところ、口腔内の腫瘍は制御

され、肺転移巣も縮小を認めた。初診より 8.5 ヶ月後、MRI にて、脳転移を認め、当院脳神経外科にて脳腫瘍切除術、及び他院にて γ -ナイフが施行された。その後、腸骨への転移を認め、Carboplatin と VP-16 による化学療法が施行となるも、初診より 13 か月後の PET-CT 検査にて縦郭リンパ節に転移を認めた。放射線緩和照射を施行したが、初診より 17 か月後、永眠された。

(2) 細胞株の機能解析

1) ① 細胞増殖能の検討

対数増殖期における各細胞を Trypsin-EDTA にて分散後、24well プラスチックプレート (Corning, USA) に 10,000 個/ml/well の細胞密度で 4well を 1 群とし播種し、培養した。培養 1 日目から 6 日目までの細胞数を Beckman Coulter Counter (Coulter Electronics, England) にて算出した。対数増殖期における細胞倍加時間 (DT) は、下に示す式で求めた。

$$DT = \log 2 \times (t - t_0) / (\log N - \log N_0)$$

t_0 : 培養 4 日目の細胞数測定を行った時間

t : 培養 6 日目の細胞数測定を行った時間

N_0 : t_0 時点における細胞数

N : t 時点における細胞数

② ONEC-TS の細胞接着能の検討

ONEC-TS の接着性を検討するため、Laminin (nippi, Osaka, Japan)、Fibronectin (Sigma-Aldrich)、Gelatin (Milipore)、及び Type I collagen (新田ゼラチン株式会社) などの細胞外基質をコートした dish を作成し、上記の方法で増殖試験を行った。

2) 染色体解析

染色体解析は以下の方法で行った。60-80%コンフルエント状態の各細胞株の培養液中に、KaryoMax colcemid solution (10 μ g/ml, Nakalai Tesque, Tokyo, Japan) を 0.25 μ g/ml colcemid の最終濃度で加え、4 時間培養後、Trypsin-EDTA で細胞を分散した。続いて室温下、0.075M KCl で 20 分間低張処理し、カルノア液 (メタノール : 氷酢酸 = 3:1) にて固定し、さらに遠心 (400 \times g、5 分間) 後、同処理を 3 回繰り返したのち、スライドグラス上に展開しギムザ染色を行った後、光学顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E800 microscope) 下、染色体像を観察するとともに、100 個の細胞の染色体数を測定した。

3) ノードマウス背部皮下での造腫瘍能の検討

培養細胞の接種には、生後 4 週齢のノードマウス (Balb C Nu) を用いた。ノードマウス背部皮下に 5 \times 10⁶ 個の細胞を接種後、4 週間腫瘍形成の有無を観察した。細胞接種により形成された腫瘍は、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋したのち、切片を

Hematoxylin and eosin (H-E) 染色、Alcian blue and PAS (ABP) 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

4) マイコプラズマ感染試験

PCR 法にてマイコプラズマの感染の有無について検討した。80%コンフルエント状態の各細胞株より、QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を RT-PCR Pre-mixture tubes (e-Myco Mycoplasma PCR Detection Kit, iNtRON BIO, MA, USA) に加え、94°C 1 分処理の後、94°C 30 秒、60°C 20 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして増幅反応を 35 サイクル行うことで PCR 産物を得た。続いて、PCR 産物をアガロースゲル 1.5%にて電気泳動を行い、SYBR®Safe で可視化し、デジタル検出システム (ChemiDoc Imaging System:Bio-Rad, CA, USA) にて検出した。

5) Short tandem repeat (STR) 解析

樹立した各細胞株が患者由来であるか、他の既存の細胞株とのクロスコンタミネーションがないかを検証するため、手術材料あるいは 80%コンフルエント状態の各細胞株より、QIAamp® DNA mini kit (Qiagen) を用いて、DNA を抽出し、Nano Drop (Nano Drop Technologies, Inc.) を用いて DNA を定量し、STR 解析は株式会社ベックス (Tokyo, Japan) に委託した。

株式会社ベックスでの解析は、Powerplex 16 system (Promega Corporation, Madison, WI) を使用し、ABI PRISM 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems®, thermos Scientific, MA, USA) 及び Gene Mapper v3.5 (Applied Biosystems®) にて各 DNA の STR 解析が行なわれた。

6) 蛍光免疫染色法を用いた各細胞における epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現 検討

蛍光免疫染色法にて、OSCC 及び OASCC における EGFR の発現を検討した。24well プラスチックプレート (Corning) にて細胞を培養し、コンフルエント状態の細胞を 0.2%パラホルムアルデヒド (Wako) にて固定した。ブロッキングは 5%ヤギ血清で行い、一次抗体は著者の所属する研究室で作成した EGFR のマウスモノクローナル抗体である 12-93 抗体 (Myoken, et al., 1989) を用いて室温 1 時間反応させ、1%ウシ血清/PBS にて、室温下 5 分間 3 回洗浄後、二次抗体として Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体を用いて室温遮光下、30 分間反応させた。続いて、1%ウシ血清/PBS で 5 分間 3 回洗浄後、4', 6-diamidino- 2-phenylindole (DAPI) にて核染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて検鏡・観察を行った。

7) Epidermal growth factor (EGF) 及び抗 EGFR 抗体の細胞増殖に及ぼす影響

EGF 及び 12-93 抗体の、OSCC、OASCC の細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。

各細胞を 24well プラスチックプレート (Corning) に 1well 当たり 1×10^4 /ml/well の細胞密度で播種し、各濃度の EGF (0.01, 0.1, 1, 3, 10nM) 、12-93 抗体 (0.35, 0.7, 3.5, 7, 70nM) を加え、6 日後の細胞数を計測した。

8) ONEC における上皮・神経系マーカー及び神経内分泌マーカーの発現解析

① 蛍光免疫染色法による ONEC-TS における上皮系及び神経系マーカーの発現検討

各細胞株の固定は 4%パラホルムアルデヒドを用いて行った。方法は第 2 章 第 1 節 6) の方法に準じて行った。一次抗体は 12-93 抗体 (極東和光)、抗 S100b 抗体 (abcam, Cambridge, England)、抗 pKRT 抗体 (ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan)、抗 Nestin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)、抗 NGFR 抗体 (abcam) を用いて 4°C 12 時間反応させた。二次抗体は Alexa Flour®488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1/300 希釈: Invitrogen™, Massachusetts, US) あるいは Alexa Flour®488 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (1/300 希釈: Invitrogen™) にて室温遮光下、30 分間反応させ、DAPI にて核染色し、洗浄後、共焦点レーザーキャン顕微鏡 (Flexible Confocal Microscope LSM 700 Carl Zeiss, GmbH, Germany) を用いて検鏡・観察を行った。

次に免疫組織染色法及び Western blot 法を用いて、口腔原発神経内分泌癌の手術検体における、神経内分泌マーカーの発現について検討した。

② 免疫組織染色法による ONEC-TS における神経内分泌マーカーの発現検討

手術検体を 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋を行った後、マイクロトームにて 0.5 μ m の厚さで切片を切り出し、組織標本を作製した。組織標本をキシレン及び 100% から 70%エタノールにて脱水処理し、citrate buffer 下にオートクレーブ (2 気圧、137 $^{\circ}$ C、15 分) にて抗原賦活化処理を行った。続いて、室温下 15 分、内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行い、PBS にて 5 分間、3 回洗浄し、ブロッッキング処理した。一次抗体は抗 CD56 抗体 (abcam)、抗 ChromograninA 抗体 (Dako, Michigan, USA) を、抗体希釈液に希釈し室温下 1 時間処理した。PBS にて 5 分間、3 回洗浄し、HRP ラベル化抗ウサギ IgG 抗体 (57.5ng/ml)(GTX221666-01 GeneTex, PA, USA) (Dako Envision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit, Dako) を抗体希釈液に希釈し、室温下 30 分処理した。PBS にて 5 分間、3 回洗浄後に、ヘマトキシレンにて対比染色を行い、diaminobenzidine (DAB) にて発色を行った。その後、70%~100%エタノール及びキシレンにて脱水・透徹し、キシレンにて封入した。

③ Western blot 法による ONEC-TS における神経内分泌マーカーの発現検討

各細胞を、RD6F 培地を用いて 60mm 径細胞培養 dish (Beckton Dickinson Falcon) に播種後、80%コンフルエント状態まで培養後、冷却 PBS(-)にて 2 回洗浄し RIPA バッファー (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% TritonX-100, pH7.4) に protease inhibitor cocktail P8340 (Sigma-Aldrich) 及び phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich) を 1:100 の濃度で添加した cell lysis buffer を加え、超音波破碎処理を行った後、遠心 (13,000×g, 15 分間) 後上清を回収し、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) にて蛋白量を定量した (Bradford, 1976)。

抽出した各細胞由来蛋白 (20μg) を 10%SDS-PAGE 法にて電気泳動後、PVDF メンブレン (Bio-Rad) 上に転写した。メンブレンを 5%スキムミルク (雪印, Gunma, Japan) にて室温下 1 時間浸漬しブロッキングを行った。組織免疫染色法にて用いた一次抗体 (表 2) を TBS-T wash buffer (0.1%Tween20) にて希釈し、室温下 1 時間処理した。メンブレンを TBS-T wash buffer にて 5 分間、3 回洗浄後、HRP ラベル化抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を TBS-T wash buffer にて希釈し室温下 1 時間処理した。続いて、メンブレンを TBS-T wash buffer にて 5 分間、3 回洗浄後、ECL 試薬 (Bio-Rad) を用いて化学発光させ、デジタル検出システム (ChemiDoc Imaging System) にて検出し、解析を行った。

9) Transcriptome 解析

各細胞株における遺伝子発現のプロファイリングを ONEC、OSCC 及び OASCC 間で検討した。Transcriptome 解析は以下の方法で行った。80%コンフルエント状態の各細胞株より、TRIZOL (Invitrogen™) を用いて RNA を抽出し、分光光度計 (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, (株)エル・エス・エス, Tokyo, Japan) で定量後、DNase を使用して混入 DNA を除去し、精製 RNA をランダムにフラグメント化し cDNA に逆転写し、ペアエンドシーケンスにてシーケンスを行い、発現変動解析を行った。RNA 定量以降の Transcriptome 解析は、Macrogen JAPAN (Kyoto, Japan) に委託した。

10) ONEC の抗癌剤に対する感受性試験

ONEC-TS を 24well プラスチックプレートに 1well 当たり 1×10^4 /ml の細胞密度で 1ml ずつ播種し、VP-16 (Wako)、CDDP (Wako)、5-FU (Wako)、Irinotecan (Wako)、Somatostatin (ペプチド研究所, Osaka, Japan) を種々の濃度 (1, 10, 100, 500, 1000nM) で加え、6 日後の細胞数を計測し、50% inhibitory concentration (IC₅₀) を算出した。

11) Ponatinib、Everolimus、Sunitinib の各細胞株の増殖及びシグナル伝達に及ぼす影響

分子標的治療薬の ONEC の細胞増殖及びシグナル伝達に及ぼす影響を検討し、さらに OSCC 及び OASCC と比較検討した。分子標的治療薬は、多標的チロシンキナーゼ阻害薬である

Ponatinib (現在、白血病に保険適応) に加えて、腓神経内分泌腫瘍に保険適応されている mTOR 阻害薬である Everolimus 及び多標的チロシンキナーゼ阻害薬である Sunitinib を用いて、比較検討を行った。各分子標的治療薬が、細胞株の細胞増殖に及ぼす影響を検討する目的で、各細胞を 24well プラスチックプレートに 1well 当たり 1×10^4 /ml の細胞密度で播種し、各濃度 (0.1, 1, 10, 100nM, 1 μ M) の Ponatinib、Everolimus、Sunitinib を加え細胞増殖試験を行い、6 日後の細胞数を計測した。

各分子標的治療薬が、ONEC-TS の増殖シグナルに及ぼす影響を検討する目的で、80%コンフルエント状態の細胞に Ponatinib、Sunitinib、Everolimus を加え 12 時間処理し、その後 FGF2 にて 15 分処理後に蛋白を回収し、第 2 章 第 1 節 8) ③の方法に準じて、Western blot 法にて Akt のリン酸化レベルを検討した。一次抗体は抗 pAkt 抗体 (Cell Signaling Technology)、Akt 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)、二次抗体は HRP ラベル化ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。

12) qRT-PCR 法及び Western blot 法を用いた各細胞株における FGFR の発現検討

qRT-PCR 法及び Western blot 法にて、樹立細胞株における FGFR 遺伝子及び蛋白の発現について検討した。80%コンフルエント状態の各細胞株より、TRIZOL (Invitrogen™) を用いて RNA を抽出し、分光光度計 (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, (株)エル・エス・エス) で定量後、抽出した total RNA (1 μ g) より、SuperScript®VILLO™Master Mix (Invitrogen™)

を用い、cDNA 合成を行った。合成した cDNA をテンプレートに、AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, CA, USA) を用いて qRT-PCR を行った。*FGFR1* に対するプライマー (5'-cgaccttgctgaacaaga-3'、5'-catacggtttggttggttat-3') 及びプローブはウェブサイトソフトウェアの Probe Finder にて設計し、GAPDH (5'-gctctctgctcctcctgttc-3'、5'-acgaccaaataccgttgactc-3') をコントロールとして定量した。

次に ONEC-TS における *FGFR1* の蛋白の発現を、第 2 章 第 1 節 8) ③の方法に準じて、Western blot 法にて検討した。一次抗体は、抗 *FGFR1* 抗体 (Cell Signaling Technology)、二次抗体は HRP ラベル化ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。

第2節 結果

1) 樹立細胞株の位相差顕微鏡像

第1節-①の5症例の口腔扁平上皮癌より無血清培養法を用いて細胞株を樹立した。これらの5つの細胞株を、それぞれ OSCC-SM、OSCC-UN、OSCC-KK、OSCC-OS、OSCC-MO と命名した。第1節-②の2症例の口腔腺扁平上皮癌より同様に細胞株を樹立した。これらの2つの細胞株をそれぞれ OASCC-MS、OASCC-HT と命名した。さらに、第1節-③の症例の神経内分泌癌より細胞株を樹立し、この細胞を ONEC-TS と命名した。

各症例の腫瘍組織片培養過程で outgrowth してきた細胞を継時的に倒立位相差顕微鏡下で観察しながら (図 1B)、適宜継代培養を行った。樹立した OSCC 及び OASCC は、大小不同の多角細胞が敷石状に配列し、増殖する像が観察された (図 2 A~G)。一方で ONEC-TS は、dish に接着せず、neuro sphere を形成し浮遊状態で増殖した (図 2 H)。

2) ① 各細胞株の細胞増殖能の検討結果

細胞増殖曲線はいずれも同様な曲線を示し、対数増殖期における細胞倍加時間は、OSCC-KK : 27.8 時間、OSCC-MO : 20.9 時間、OSCC-OS : 27.3 時間、OSCC-SM : 26.2 時間、OSCC-UN : 39.1 時間、OASCC-MS : 25.6 時間、OASCC-HT : 30.1 時間、ONEC-TS : 33.2 時間であった (図 3)。

2) ② ONEC-TS の細胞接着能の検討結果

ONEC-TS の細胞接着能と増殖能を Laminin、Fibronectin、Gelatin 及び Type I collagen などの細胞外基質をコートした dish を用いて検討した結果、ONEC-TS は Laminin、Fibronectin 及び Type I collagen には高い接着性と増殖能を示し、Laminin 上で最も高い接着性と増殖能を示した。一方、Gelatin 上では未処理 dish 上と変わらず低い接着性を示した (図 4)。

3) 染色体解析結果

染色体数は、いずれの細胞株も 2 倍体から低 3 倍体にモードを示し、特に OSCC-UN、ONEC-TS は 2 倍体と 3 倍体にモードを示した (図 5)。

4) ノードマウス背部皮下での造腫瘍能の検討結果

OSCC-KK、OASCC-HT、ONEC-TS はノードマウスへの造腫瘍性を有していた。OSCC-KK は低分化な扁平上皮癌からなる腫瘍を形成した (図 6 A)。OASCC-HT は手術組織及びマウス移植腫瘍のいずれの組織においても、明らかな腺腔構造は見られなかったが、酸性ムコ多糖の存在を示すアルシヤンブルー陽性を示したことから腺扁平上皮癌の性質を維持していると考えられた (図 6 B)。

ONEC-TS のヌードマウス移植腫瘍では、比較的大きな核を有する円形の細胞で構成されており、手術組織の組織像と類似していた (図 6C)。また移植腫瘍のヌードマウスの脳や肝臓への明らかな転移は認めなかった。

5) マイコプラズマ感染試験結果

PCR 法を用いてマイコプラズマ感染の有無について検討した結果、全ての細胞株はマイコプラズマには感染していないことが明らかとなった (図 7)。

6) STR 解析結果

16 ローカス (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, Amelogenin, VWA, D8S1179, TPOX, FGA, 5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D) の STR 解析の結果、全ての細胞株において、既存の細胞株の混入がないこと、また OSCC-SM を除く細胞株は手術組織由来であること、OSCC-SM は 17 代継代細胞と 100 代継代細胞で STR は同一であった (表 3)。

7) 蛍光免疫染色法を用いた各細胞における EGFR の発現検討結果

細胞蛍光免疫染色により、OSCC 及び OASCC のすべての細胞株は、その細胞膜上に EGFR を高発現していることが明らかとなった (図 8)。また、OSCC と OASCC 間で発現に明らかな違いは認めなかった。

8) EGF および抗 EGFR 抗体の細胞増殖に及ぼす影響の検討結果

EGF 及び 12-93 抗体を用いた細胞増殖試験において、低濃度の EGF は OSCC、OASCC の細胞増殖を軽度促進したが、0.1nM 以上の濃度では濃度依存的に細胞増殖を抑制した。さらに、12-93 抗体も OSCC、OASCC すべての細胞株において濃度依存的に細胞増殖を抑制した (図 9)。

9) ONEC における上皮・神経系マーカー及び神経内分泌マーカーの発現解析結果

① 蛍光免疫染色法による OSCC および ONEC-TS における上皮系及び神経系マーカー発現の

比較検討結果

細胞蛍光免疫染色の結果、OSCC は EGFR や pKRT などの上皮系マーカーを発現していたが、ONEC-TS では上皮系マーカーの発現は認めなかった。一方、ONEC-TS は S100 や Nestin などの神経系マーカーを発現していた (図 10 A)。

② 免疫組織染色法による ONEC 組織における神経内分泌マーカーの発現検討結果

ONEC の手術標本は、神経内分泌腫瘍のマーカーである ChromograninA 及び CD56 の発現の陽性所見を示した (図 10 B)。

③ Western blot 法による ONEC-TS における神経内分泌マーカーの発現検討結果

ONEC-TS における ChromograninA 及び CD56 の蛋白発現を Western blot 法を用いて検討した結果、いずれも発現されていた (図 10 C)。

10) Transcriptome 解析結果

次世代シーケンサーを用いた Transcriptome 解析において、OSCC、OASCC は KRT などの上皮系マーカーの発現が高かったのに対し、ONEC-TS は上皮系マーカーの発現が低く、また S100 や Nestin などの神経系マーカーの発現が OSCC、OASCC と比較し亢進していた (図 11)。さらに ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して、*Fibroblast growth factor (FGF) -3*、*-13*、*-19*、*-20* (図 12 A) 及び *Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* の発現の亢進が示された (図 12 B)。さらに ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して、*LAMC2* の発現が低いことが明らかとなった。また、OASCC と OSCC 間で発現比が 2 倍以上の差を示した遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、OASCC では PI3K/Akt 経路関連遺伝子の発現が亢進していた (図 13)。

11) ONEC-TS の抗癌剤に対する感受性試験結果

5-FU、CDDP、Irinotecan、Etoposide (VP-16) 及び Somatostatin などの抗癌剤を用いて増殖試験を行ったところ、ONEC-TS は 5-FU によりやや増殖抑制されたが、CDDP、Irinotecan、Somatostatin に対しては耐性を示した。一方、Etoposide (VP-16) により著明に増殖抑制された (図 14)。VP-16 の IC₅₀ は 278nM であった。本 ONEC 患者の再発時に VP-16 を用いた化学療法を行い、高い治療効果を得た。

12) Ponatinib、Everolimus、Sunitinib の各細胞株の増殖及びシグナル伝達に及ぼす影響の検討結果

Ponatinib 及び Sunitinib は、高濃度で OSCC、OASCC の細胞増殖を抑制したのに対し、ONEC-TS に対しては、低濃度で増殖抑制を示した (図 15 A, B)。特に Ponatinib の OSCC、OASCC に対する IC₅₀ は、46.4nM から 72.4nM であったが、ONEC-TS に対する IC₅₀ は 14nM と高い増殖抑制効果を示した。さらに Everolimus は ONEC、OSCC 及び OASCC の全ての細胞株の細胞増殖を抑制し、その IC₅₀ は 5.72nM から 60.8nM であった (図 16)。

ONEC-TS をそれぞれ Ponatinib、Sunitinib 及び Everolimus で 12 時間処理し、Akt のリン酸化レベルを検討した結果、Ponatinib 及び Sunitinib はリン酸化を阻害したが、Everolimus では阻害しなかった。また、FGF2 による Akt リン酸化レベルは、Ponatinib 及び Sunitinib により抑制された (図 17)。

13) qRT-PCR 法及び Western blot 法を用いた各細胞株における FGFR の発現検討

qRT-PCR の結果、mRNA レベルにおいて、ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して *FGFR1* の発現が亢進していることが示された (図 18 A)。また Western blot 法の結果、ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して *FGFR1* の発現が亢進していた (図 18 B)。

第3章 考察

無血清培養法を用いて、新たに口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) 株5株、口腔腺扁平上皮癌細胞 (OASCC) 株2株、口腔原発神経内分泌癌細胞 (ONEC) 株1株の樹立に成功した。

OSCC及びOASCCは、いずれの細胞株も大小不同の多角形の細胞が敷石状に増殖した。一方、ONECは、OSCCやOASCCが接着増殖可能な未処理dishには接着できず、neuro sphereを形成して浮遊状態で増殖した。一般に固形腫瘍由来細胞株は、足場非依存的には増殖できず、浮遊状態ではそのほとんどがanoikisと呼ばれるapoptosisの活性化により死滅することが知られているが (Coates, et al., 2010)、近年無血清培地を用いた研究で、ごく一部の幹細胞に相当する細胞群がsphereを形成して浮遊状態で増殖可能であることが明らかとなってきた (Hong, et al., 2016)。したがって、ONECが接着せずに浮遊状態で増殖しsphereを形成するのは、ONECががん幹細胞の特性を強く有している可能性が考えられた。事実、ONECの由来となった患者は早期に肺転移や脳転移をきたした。

さらに、本ONEC症例は、初回の病理組織診断は扁平上皮癌であったが、異常増大を示したため行った2度目の病理診断は診断に苦慮したが、その段階では未分化癌の診断を得た。しかし無血清培養法を用いた初代培養細胞は培養dishに接着できずに、neuro sphereを形成し浮遊状態で活発に増殖し、蛍光免疫染色にて神経系マーカー及び神経内分泌腫瘍のマーカーの発現を認めたことから、これら所見を病理部に情報提供した結果、最終的に神経内分泌癌の確定診断を得た。本細胞は血清添加培地ではdishに接着して増殖したことから、もし、血清添加培地で培養し

ていればこのような所見は得ることは無かったと考えられる。このように無血清培養法は、生体での細胞本来の栄養・増殖因子要求性や細胞機能を再現することが可能な培養法であることが裏付けられた。

本細胞は血清添加培地ではdishに接着して増殖したことから、血清中の vitronectin、fibronectin、及び laminin などの ECM が ONEC の dish への接着を補助した可能性が考えられた。また、transcriptome 解析結果からも、OSCC や OASCC と比較して ONEC では laminin の構成成分である *LAMC2* の遺伝子発現が低いことが示された。一般的に癌細胞株は ECM を培地中に分泌し *LAMC2* に接着していると言われているが (Robert, 2007)、ONEC では ECM の発現が低下しているため接着しない可能性が考えられた。種々の ECM で ONEC の接着・増殖能を検討した結果、laminin が最もよく接着と増殖をサポートしたことから本仮説が裏付けられる。このような実験結果は、ONEC の細胞特性を明らかにするには血清添加培養法では困難であり、無血清培養法でのみ明らかにできることを明確に示している。

がん細胞の染色体構成は、正常細胞とは異なることが知られ (榊, 1973)、扁平上皮癌由来細胞株の染色体数は低3倍体を示すとの報告もあり (Rangan, 1972; Sykes, et al., 1970)、それぞれの癌腫により、幅広い染色体分布を示す。本研究においては、染色体数は20~96の間に広く分布していたが、全ての細胞において2倍体にモードを示した。また、OSCC-UN、ONEC-TSにおいては3倍体にもモードを示した。正常の2倍体細胞においても継代培養を続けるうちに染色体数に変化をきたし、細胞の癌化がみられ、その過程における染色体の変動は、2倍性から4倍性あ

るいは低2倍性を経て低4倍性にいたると考えられており、低4倍性の細胞の出現率が高まるにつれて移植性も高まると報告されている (Levan, et al., 1958)。また、癌細胞の長期継代により染色体数に変動をきたし、2倍体から4倍体を示すという報告しており (堀越, 1974)、本研究において樹立した細胞株においても定期的に染色体数の検討が必要であると考えられた。

世界で最初に株化された癌細胞株であるHeLa細胞の他細胞株へのクロスコンタミネーションが世界的に問題になったことをきっかけにして (Nelson-Rees, et al., 1974; 1980; 1981)、International Cell line Authentication Committeeが創設され、世界各国でそれを防ぐ取り組みがなされている (The obtained STR profile should be compared to a public database (e.g., ICLAC database (<https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>))。初期にはG-6-PDなどのisozymeなどを検討することで細胞同定が行われていたが (Auersperg, et al., 1970; Beckman, et al., 1971)、近年はSTR解析にて他の細胞の混入や同一個体由来であるかの同定が可能となり、犯罪捜査でも活用されている (Thacker, et al., 1988; Lorenzi, et al., 2009; Dirks and Drexler, 1993)。本研究においても各細胞株のSTR解析を行い、全世界の樹立細胞株のSTR解析データベース (Amos, 2018. The Cellosaurus STR Similarity Search Tool, CLASTR 1.4.3. (<https://web.expasy.org/cellosaurus-str-search>)) と比較検討した結果、本研究のSTR結果と一致する細胞株は存在しないことが確認され、他細胞株の混入がないことが明らかとなった。また、各細胞株が由来する患者のSTR解析結果と一致したことから、患者由来であり、また今回樹立した細胞株間でもクロスコンタミネーションがないことも明らかとなった。

株化後のOSCC及びOASCCの各細胞は培養初日から2日目に活発に増殖し、6日目には80～90%コンフルエントに達し、細胞倍加時間も各細胞株間で大きな差異は認められなかった。しかし、初代培養時においては腫瘍組織切片からのoutgrowthの速度は個体間でばらつきを認めた。今回定量化はしていないが、予後不良症例において、outgrowth速度は早い傾向を示した（未発表データ）。このように無血清培養法を用いることで、腫瘍細胞本来の増殖能を*in vitro*で再現することが可能となることから、本法はより生体機能を模倣した培養法であると考えられた。

本研究では1) 50代以上の継代、または1年以上にわたる安定した増殖性、2) 染色体構成の異数性、3) *in vivo*での腫瘍形成能（林, 1995）に加え、さらに4) STR解析による同一個体由来及び他の細胞の混入がないことの証明を判定要件とした。OSCC-KK、OASCC-HT、ONEC-TSはヌードマウスに造腫瘍性を有しており、また全ての細胞株において、染色体数は幅広く分布し2倍体にモードを示したこと、1年以上の安定した長期培養が可能であったこと、またマイコプラズマ感染やSTR解析により他の細胞の混入が示されなかったことから、本研究における細胞は株化されたものと判定した。

培養細胞にマイコプラズマが感染すると、マイコプラズマは細胞質に存在し、細胞増殖能や種々の細胞代謝能に影響を及ぼすため、間違った研究結果に結びつく（Miller, et al., 2003）。しかしながら、マイコプラズマは細菌や真菌と異なり、顕微鏡下での観察では同定できないため、その感染が大きな問題になっていたが、近年、PCR法や蛍光抗体法を用いて簡便に解析すること

が可能となった (Ligasová, et al., 2019)。本研究で樹立した全細胞株において、マイコプラズマ感染は認めなかった。

EGFは、Cohen (Cohen, 1962) により上皮系細胞に対し増殖促進作用を有するペプチドとして雄マウス顎下腺より発見・精製された、分子量6,021、53個のアミノ酸からなる細胞増殖因子である (Savage, et al., 1972; Gray, et al., 1983)。その後、EGFの受容体であるEGFRがチロシンキナーゼ型膜タンパク質であることが明らかにされた (Cohen, et al., 1980; Ushiro, et al., 1980)。EGFRは1,200アミノ酸残基からなる分子量170,000の糖タンパク質であり (Cohen, et al., 1982; Weber, et al., 1984)、糖鎖の修飾を受けている細胞外ドメイン、疎水性アミノ酸からなる膜貫通ドメイン、キナーゼドメインを含んだ細胞内ドメインを有する膜貫通チロシンキナーゼ型受容体である (Yarden, et al., 1988)。EGFRはEGFなどのリガンドと結合すると2量体を形成し、細胞内チロシンキナーゼドメインの活性化ならびに受容体のチロシン残基のリン酸化により (Lemmon and Schlessinger, 1994)、MEK、p38MAPK、JNKなどのRas-MAPK (Singletary, et al., 1987) やPI3K/Akt (Schlegel et al., 2000) など様々なシグナル伝達に関わっている。扁平上皮癌細胞はEGFRを過剰発現し、細胞の増殖、分化、浸潤などに関与しており、またEGFRが過剰発現しているにも関わらず、EGFによりその細胞増殖が抑制されることが知られている (Gill and Lazar, 1981; Barnes, 1982; Kamata, et al., 1986)。そのメカニズムとして、低濃度のEGFは扁平上皮癌細胞の細胞増殖を促進する一方で、高濃度のEGFは扁平上皮癌細胞の接着能の喪失を誘導しアポトーシスを誘導すること、Cyclin AやCyclin D1などの細胞周

期に關与するタンパク質の発現を減少させることで細胞周期を阻害し、細胞増殖を抑制することが報告され (Cao, et al., 2000)、また、EGFによる細胞増殖抑制はEGFRの発現量に關することが、A431細胞およびその亜株を用いた研究で報告されている (Kawamoto, et al., 1984)。

EGFRの過剰発現は、頭頸部癌をはじめ乳癌、胃癌、大腸癌などの様々な癌において報告されており (Maguire, et al., 1989)、EGFRを治療の標的とする研究が進められた結果、現在ではキメラ型抗EGFR抗体医薬として、Cetuximabが開発され、単独、あるいは化学療法、放射線療法などと併用して治療に応用されている (Sato, et al., 1989; Baselga, et al., 2000; Herbst, et al., 2001; Peron, et al., 2012)。尾崎らは、正常口腔粘膜上皮細胞、口腔扁平上皮癌細胞、唾液腺由来腺癌細胞間でのEGFR発現について検討し、さらに無血清培養法を用いて細胞増殖に対するEGFの影響を検討した結果、口腔粘膜及び唾液腺由来正常上皮細胞の増殖はEGFにより促進されるが、扁平上皮癌細胞および唾液腺由来腺癌細胞では抑制され、さらにこれらの細胞増殖は*in vivo*、*in vitro*で抗EGFR抗体によって抑制されたことから、癌細胞と正常上皮細胞の細胞増殖動態の違いは、発現しているEGFRの量的変化よりも機能異常による可能性を示唆している (尾崎, et al., 1991)。本研究では、蛍光免疫染色によりOSCC、及びOASCCの細胞膜においてEGFRの高い発現を認めた。また、低濃度のEGFはOSCC及びOASCCの細胞増殖を促進したが、1nMから10nMの通常濃度のEGFは細胞増殖を強く抑制した。細胞株間における細胞増殖抑制に明らかな違いはなかった。EGFRのモノクローナル抗体である12-93抗体 (Myoken, et al, 1989) は、OSCC、OASCCの細胞増殖を抑制した。山本らは、*in vitro*、*in vivo* で12-93抗体は濃度依存的

に唾液腺癌の細胞増殖を抑制し、細胞周期の進行の抑制とアポトーシスによる細胞死への誘導することを示しており (Yamamoto, et al., 2014)、本研究においても同様の抑制機構が働いている可能性が考えられた。

腺扁平上皮癌は、腺癌の特徴を有するために放射線療法や化学療法に抵抗性を示すなど、悪性度が高いが、口腔領域への発生は稀である。現在までに口腔腺扁平上皮癌細胞株の樹立報告として、岸本らのMM細胞 (Kishimoto, et al., 2000)、佐藤らのTYS細胞 (Yanagawa, et al., 1986) 及びL.JiangらのCAL27細胞 (Jiang, et al., 2009) があるが、MM細胞は継代途中で細胞増殖が停止し、現在では細胞株は存在しない。またTYS細胞は腺癌としての特徴が強く唾液腺癌であった後に訂正され (Sato, et al., 1997)、さらにCAL27細胞は、細胞バンクにおいて未だ扁平上皮癌として登録されている。このように口腔腺扁平上皮癌由来細胞は初代培養に成功したという報告はあるものの、長期間にわたる細胞の継代維持の報告はなく、本研究で樹立したOASCC2株は世界で最初の細胞株であると考えられ、今後これら細胞株を用いた口腔腺扁平上皮癌の診断・治療法への応用が期待される。OSCCと同様に抗EGFR抗体でOASCCの細胞増殖が抑制されたことから、EGFRが治療標的として有用である可能性が考えられた。

内分泌腫瘍 (Endocrine tumor) は、従来カルチノイド腫瘍と定義されていたが、2000年のWHO改定により、全身に存在する神経内分泌細胞由来の腫瘍として、神経内分泌腫瘍 (Neuroendocrine tumor: NET) に名称変更された (Hamilton and Aaltonen, 2000)。さらに、2010年の改定で、Ki-67陽性数と核分裂像数により3 gradeに分類され、neuro-endocrine

carcinoma (NEC) はNET grade 3と分類された (Bosman, et al., 2010; 長村, 2012)。さらに、2017年の改定で高分化型と低分化型に分類され、高分化型をNETとして3段階のgradeに細分類し、低分化型をNECとして小細胞型および大細胞型に細分類された (Lloyd, et al., 2017)。

米国における疫学調査において、NETの発生率は10万人に5.25人と非常に低く (Yao, et al., 2008)、特に口腔内での発生症例はほとんどない (平山, et al., 2019; Ming, et al., 2015)。そのため、現在までに治療法は確立されていないが、根治手術、化学療法および放射線療法などを併用した集学的治療が行われ、切除不能症例においては、肺小細胞癌の治療に準じて、CDDPとIrinotecanによるPI療法やCDDPとVP-16を用いたPE療法などの化学療法が行われている (Walenkamp, et al., 2009)。

本症例も、術後の再発腫瘍に対しPE療法が施行され、腫瘍の増殖は制御された。ONEC-TSにおいても、VP-16により著明に細胞増殖が抑制され、臨床病態と一致した結果が得られたことから、ONEC-TSから得られる情報は非常に有用であることが示された。

ONEC-TSは、扁平上皮癌に効果を示すCDDPや5-FUなどの抗癌剤に耐性を示したこと、さらにTranscriptome解析により *FGFR1* の高発現が示されたことから、FGFRがONECの治療標的となる可能性が考えられた。FGFRsは細胞の増殖や分化、血管新生など多様な細胞機能に関与しており、リガンドであるFGFsと結合することで、MAPKシグナルやPI3K/Akt/mTOR経路などの下流のシグナル伝達経路を活性化し、生理活性を示す (Turner and Grose, 2010)。さらにFGFRシグナルの伝達異常は、発癌、腫瘍増殖、および血管新生などに関与していることが知ら

れており (Baeriswyl and Christofori, 2009)、FGFRを治療標的とした治療薬の開発研究が行われている (Touat, et al., 2015)。現在までに、多標的チロシンキナーゼ阻害薬である Ponatinib は、急性骨髄性白血病の治療に保険適応されている。さらに、Ponatinibは、FGFR1の過剰発現を示す非小細胞肺癌の細胞増殖及び下流シグナル伝達を抑制することが報告されている (Ren, et al., 2013)。本研究においても、ONEC-TSは、扁平上皮癌に効果を示すCDDPや5-FUなどの抗癌剤に耐性を示したこと、さらにTranscriptome解析により *FGFR1* の高発現が示されたことから、FGFRシグナルの異常が細胞増殖の亢進などに関与し、FGFRがONECの治療標的となる可能性が考えられた。そこで、FGFRシグナルを検討する目的で、多標的チロシンキナーゼ阻害薬である Ponatinib や Sunitinib が ONEC-TS に及ぼす影響を検討した。その結果、Ponatinib 及び Sunitinib は、OSCC や OASCC と比較して低濃度で ONEC-TS の細胞増殖を抑制した。さらに、Ponatinib や Sunitinib は FGF2 依存的な Akt のリン酸化を阻害したことから、ONEC-TS で高発現している FGFR1 が autocrine pathway として関与しており、これを Ponatinib や Sunitinib が阻害したことで ONEC-TS の細胞増殖が抑制された可能性が示唆された。

Everolimus は、Sunitinib と同様に 2011 年に NET の治療薬として保険適応となった mTOR 阻害薬であり、mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) を直接阻害することで細胞増殖を抑制することが知られている (Lee, et al., 2018)。mTOR は、細胞増殖や細胞周期の進行を制御する PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) 関連キナーゼファミリーに属する分子量 289,000 のセリン・スレオニンキナーゼであり、PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路を介し Ser2448 のリン酸化

により活性化され、細胞増殖や腫瘍成長因子の発現を誘導する (Nave, et al., 1999; Shaw and Cantley, 2006)。OSCCを含め多くの癌腫においてmTORの過剰発現が報告されており (Naruse, et al., 2015)、今回の研究で、EverolimusがOSCCの細胞増殖やシグナル伝達を抑制したことから、神経内分泌癌と同様に、口腔扁平上皮癌及び口腔腺扁平上皮癌においても、新たな治療薬としての有用性が考えられた。

本研究において、無血清培養法を用いて、OSCC細胞株を5細胞株、OASCC細胞株を2細胞株、及び神経内分泌癌由来細胞株を1細胞株樹立した。OSCC細胞株の樹立は多く報告されているが、初代培養時から無血清培養法を用いて樹立した報告は今までにない。さらに、OASCC由来の2細胞株の樹立は世界初であり、今後これら細胞株を用いた口腔腺扁平上皮癌の診断・治療法への応用が期待される。さらに、口腔原発神経内分泌癌由来細胞株の樹立報告は今までにないことから、同細胞株を用いることで他臓器原発神経内分泌癌細胞株との比較検討も可能となり、口腔原発神経内分泌癌の診断・治療法の開発に大きく貢献することが期待された。

第4章 総括

無血清培養下に行った口腔扁平上皮癌、口腔腺扁平上皮癌、口腔原発神経内分泌癌組織の初代培養から得た細胞の生物学的検討及び特性解析を行い、以下の結果を得た。

1. OSCC及びOASCC細胞は大小異なる多角細胞が敷石状に配列して増殖した。一方ONECはdishに接着せず、neuro sphereを形成し浮遊状態で増殖した。本増殖動態はONECの病理診断に大きく貢献した。
2. 対数増殖期における各細胞株の細胞倍加時間は、OSCC-KK : 27.8 時間、OSCC-MO : 20.9 時間、OSCC-OS : 27.3 時間、OSCC-SM : 26.2 時間、OSCC-UN : 39.1 時間、OASCC-MS : 25.6 時間、OASCC-HT : 30.1 時間、ONEC-TS : 33.2 時間であった、
3. いずれの細胞株も、STR解析で既存の細胞株の混入は認めず、またマイコプラズマの汚染もなかった。
4. 染色体数はいずれの細胞株も2倍体から3倍体にもモードを示した。
5. OSCC-KK、OASCC-HT、ONEC-TSはヌードマウスへの造腫瘍性を有していた。
6. OSCC及びOASCCはともにEGFRの高発現を認め、EGF及び抗EGFR抗体にて細胞増殖は抑制された。
7. ONECにおいては、蛍光免疫染色にてEGFRやpKRTなどの上皮系マーカーの発現を認めず、S100やNestinなどの神経系マーカーの発現を認めた。

8. Transcriptome解析の結果、OSCC、OASCCと比較しS100やNestinなどの神経系マーカーの高発現を示し、ONEC細胞とOSCC、OASCC細胞間で明らかに異なる遺伝子発現パターンを示した。

9. 手術組織における免疫染色及び培養細胞におけるWestern blot法にて、神経内分泌腫瘍のマーカーであるChromograninA及びCD56陽性であることが示された。

10. ONECはVP-16により著明に細胞増殖が抑制され、臨床病態と一致した。

11. PonatinibおよびSunitinibはONECの細胞増殖を、OSACC、OASCCと比較してより低濃度で抑制した。さらにEverolimusは、全ての細胞株の細胞増殖を抑制した。

12. Ponatinib及びSunitinibはFGF2依存性のAktのリン酸化を抑制した。

本研究において、無血清培養法を用いて、OSCC細胞株を5細胞株、OASCC細胞株を2細胞株、及び神経内分泌癌由来細胞株を1細胞株樹立した。OSCC細胞株の樹立は多く報告されているが、初代培養時から無血清培養法を用いて樹立した報告は今までになく、OASCC及びONEC由来の細胞株の樹立は世界初である。今後これら細胞株を用いた口腔扁平上皮癌、口腔腺扁平上皮癌、及び口腔原発神経内分泌癌の診断・治療法の開発や応用に大きく貢献することが期待された。

参考文献

Almadori, G., Cadoni, G., Galli, J., Ferrandina, G., Scambia, G., Exarchakos, G., Paludetti, G., Ottaviani, F. (1999). Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer*. 84(2): 188-191.

Amos, B. (2018). The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech*.29(2): 25–38.

Announcement: Time to tackle cells' mistaken identity: *Nature*, 15 April 2015.

Auersperg, N., Gartler, SM. (1970). Isoenzyme stability in human hetero-ploid cell lines. *Exp Cell Res*. 61(2): 465-467.

Baeriswyl, V., Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 19(5): 329-337.

Barnes, D. W. (1982). Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J Cell Biol*. 93: 1-4.

Barnes, D., Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22, 649-655.

Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., Mendelsohn, J. (2000). Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol*. 18: 904-914.

Beckman, G., Beckman, L., Ponten, J., Westermarck, B. (1971). G-6-PD and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells. *Hum Hered*. 21(3): 238-241.

Bosman, F., Carneiro, F., Hruban, R., Theise, N., eds. (2010). *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press; (In press).

Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J, Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R.K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S. A., Zhu, J., Yousoufian, H., Rowinsky, E. K., Ang, K. K. (2010). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* 11(1): 21-28.

Cao, L., Yao, Y., Lee, V., Kiani, C., Spaner, D., Lin, Z., Zhang, Y., Adams, M., Yang, B. (2000). Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion. *J Cell Biochem.* 77(4): 569-583.

Carey, T. E., Van Dyke, D. L., Worsham, M. J., Bradford, C. R., Babu, V. R., Schwartz, D. R., Hsu, S., Baker, S. R. (1989). Characterization of human laryngeal primary and metastatic squamous cell carcinoma cell lines UM-SCC-17A and UM-SCC-17B. *Cancer Res.* 49(21): 6098-6107.

Coates, J. M., Galante, J. M., Bold, R. J. (2010). Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. *J Surg Res.* 164(2): 301-308.

Cohen, S. (1962). Isolation of Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor European and Eyelid Opening in the New-born Animal. *J Biol. Chem.* 237: 1555-1562.

Cohen, S., Carpenter, G., King Jr, L. (1980). Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 255: 4834-4842.

Cohen, S., Ushiro, H., Stosheck, C., Chinkers, M. (1982). A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 257: 1523-1531.

Dirks, W. G., Drexler, H. G. (2013). STR DNA typing of human cell lines: detection of intra- and interspecies cross-contamination. *Meth Mol Biol.* 946: 27-38.

Dubecco, R. E., Gerner, R. E., Franldin, H. A. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396-397.

Eagle, H. (1955). Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc Soc Exp Biol Med* 89: 362-364.

Easty, D. M., Easty, G. C., Carter, R. L., Monaghan, P., Butler, L. J. (1981). Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck. *Br. J. Cancer* 43 (6): 772-785.

Ganjibakhsh, M., Aminishakib, P., Farzaneh, P., Karimi, A., Fazeli, S. A. S., Rajabi, M., Nasimian, A., Naini, F. B., Rahmati, H., Gohari, N. S., Mohebbali, N., Asadi, M., Gorji, Z. E., Izadpanah, M., Moghanjoghi, S. M., Ashouri, S. (2017). Establishment and Characterization of Primary Cultures from Iranian Oral Squamous Cell Carcinoma Patients by Enzymatic Method and Explant Culture. *J Dent (Tehran)*. 14(4): 191-202.

Gey, G., Coffman, W., Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12: 264-265.

Gill, G. N., Lazar, C. S. (1981). Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells. *Nature*. 293(5830): 305-307.

Gray, A., Dull, T. J., Ullrich, A. (1983). Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature*. 303: 722-725.

Hamilton, S. R., Aaltonen, L. A. (Eds.) (2000). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press: Lyon.

Hayashi, I., Sato, G. H. (1976). Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*. 259(5539): 132-134.

Herbst, R. S., Kim, E. S., Harari, P. M. (2001). IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, for treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 1: 719-732.

Hofving, T., Arvidsson, Y., Almobarak, B., Inge, L., Pfragner, R., Persson, M., Stenman, G., Kristiansson, E., Johanson, V., Nilsson, O. (2018).

The neuroendocrine phenotype, genomic profile and therapeutic sensitivity of GEPNET cell lines. *Endocr Relat Cancer*. 25(4): 367-380.

Kim, H. S., Pearson, A. T., Nör, J. E. (2016). Isolation and characterization of cancer stem cells from primary head and neck squamous cell carcinoma tumors. *Methods Mol Biol*. 1395: 241–249.

Ito, T., Lee, L., Hijioka, M., Kawabe, K., Kato, M., Nakamura, K., Ueda, K., Ohtsuka, T., Igarashi, H. (2015). The up-to-date review of epidemiological pancreatic neuroendocrine tumors in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 22(8): 574-577.

Jiang, L., Ji, N., Zhou, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Z., Chen, Q., Zeng, X. (2009). CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncol*. 45(11): 204-207.

Kalasin, S., Browne, E. P., Arcaro K. F., Santore, M. M. (2017). Selective Adhesive Cell Capture without Molecular Specificity: New Surfaces Exploiting Nanoscopic Polycationic Features as Discrete Adhesive Units. *RSC Adv*: 13416–13425.

Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S., Kuroki, T. (1986). Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res*. 46: 1648-1653.

Kawamoto, T., Mendelsohn, J., Le, A., Sato, G. H., Lazar, C. S., Gill, G. N. (1984). Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Biol Chem*. 259(12): 7761-7766.

Kimpton, C. P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E. S., Adams, M. (1993). Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl*. 3(1): 13-22.

Kishimoto, H., Urade, M., Sakurai, K., Noguchi, K. (2000). Isolation and characterisation of adenoid squamous carcinoma cells highly producing SCC antigen and CEA from carcinoma of the maxillary sinus. *Oral Oncol*. 36(1): 70-75.

- Lee, E. J., Kim, J., Lee, S. A., Kim, E. J., Chun, Y. C., Ryu, M. H., Yook, J. I. (2005). Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. *Exp Mol Med.* 37(5): 379-390.
- Lee, L., Ito, T., Jensen, R. T. (2018). Everolimus in the treatment of neuroendocrine tumors: efficacy, side-effects, resistance, and factors affecting its place in the treatment sequence. *Expert Opin Pharmacother.* 19(8): 909-928.
- Lemmon, M. A., Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci.* 19: 459-463.
- Levan, A., Biesele, J. J. (1958). Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann NY Acad Sci.* 71(6): 1022-1053.
- Ligasová, A., Vydržalová, M., Buriánová, R., Brůčková, L., Večeřová, R., Janošťáková, A., Koberna, K. (2019). A New Sensitive Method for the Detection of Mycoplasmas Using Fluorescence Microscopy. *Cells.* 8(12).
- Lloyd, R. V., Osamura, R. Y., Klöppel, G., Rosai, J. (2017). WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th Edition: 209-239
- Lorenzi, P. L., Reinhold, W. L., Varma, S., Hutchinson, A. A., Pommier, Y., Chanock, S. J., Weinstein, J. N. (2009). DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther.* 8(4): 713-724. 26.
- Maguire, H. C. Jr., Greene, M. I. (1989). The neu (c-erbB-2) oncogene. *Semin Oncol.* 16: 148-155.
- Miller, C. J., Kassem, H. S., Pepper, S. D., Hey, Y., Ward, T. H., Margison, G. P. (2003). Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *Biotechniques.* 35(4): 812-814.
- Miyauchi, S., Moroyama, T., Kyoizumi, S., Asakwa, J., Okamoto, T., Takada, K. (1988). Malignant tumor cell lines produce interleukin-1-like factor. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24, 753-758.

- Moore, A. E., Sabachewsky, L., Toolan, H. W. (1955). Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 15: 598-602.
- Moore, G. E., Gerner, R. E., Franldin, H. A. (1967). Culture of normal human leukocyte. *JAMA* 199: 519-524.
- Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G. H., Takada, K., Sato, J. D. (1989). An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell Biol.* 25: 477-480.
- Naruse, T., Yanamoto, S., Yamada, S., Rokutanda, S., Kawakita, A., Kawasaki, G., Umeda, M. (2015). Anti-tumor effect of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 21(3): 765-773.
- Navé, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R., Shepherd, P. R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* 344 Pt 2: 427-431.
- Nelson-Rees, W. A., Daniels, D. W., Flandermeyer, R. R. (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science.* 212(4493): 446-452.
- Nelson-Rees, W. A., Flandermeyer, R. R., Hawthorne, P. K. (1974). Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. *Science.* 184(4141): 1093-1096.
- Nelson-Rees, W. A., Hunter, L., Darlington, G. J., O'Brien, S. J. (1980). Characteristics of HeLa strains: permanent vs. variable features. *Cytogenet Cell Genet.* 27(4): 216-230.
- Okamoto, T., Tani, R., Yabumoto, M., Sakamoto, A., Takada, K., Sato, G. H., and Sato, J. D. (1996). Effects of insulin and transferrin on the generation of lymphokine-activated killer cells in serum-free medium. *Journal of immunological methods* 195: 7-14.
- Péron, J., Ceruse, P., Lavergne, E., Buiret, G., Pham, B. N., Chabaud, S., Favier, B., Girodet, D., Zrounba, P., Ramade, A., Fayette, J. (2012). Paclitaxel and cetuximab combination efficiency after the failure of a platinum-based chemotherapy

in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs*. 23(9): 996-1001.

Rangan, S. R. S. (1972). A new human cell line (Fa Du) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29: 117.

Rowehl, R. A., Burke, S., Bialkowska, A. B., Pettet, D. W. 3rd., Rowehl, L., Li, E., Antoniou, E., Zhang, Y., Bergamaschi, R., Shroyer, K. R., Ojima, I., Botchkina, G. I. (2014). Establishment of highly tumorigenic human colorectal cancer cell line (CR4) with properties of putative cancer stem cells. *PLoS One*. 9(6): e99091.

Ren, M., Hong, M., Liu, G., Wang, H., Patel, V., Biddinger, P., Silva, J., Cowell, J., Hao, Z. (2013). Novel FGFR inhibitor ponatinib suppresses the growth of non-small cell lung cancer cells overexpressing FGFR1. *Oncol Rep*. 29(6): 2181-2190.

Robert, W. (2007). *The Biology of Cancer*. Garland Science. :147-149.

Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., Tweardy, D. J. (1998). Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*. 90(11): 824-832.

Savage, C. R. Jr., Inagami, T., Cohen, S. (1972). The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 247: 7612-7621.

Sato, G. H., Sato, J. D. (1989). Growth factor receptor monoclonal antibodies and cancer immunotherapy. *J. Natl. Cancer Inst*. 81: 1600-1601.

Sato, J. D., Barnes D. W., Hayashi I., Hayashi, J., Hoshi, H., Kawamoto, T., McKeehan, W. L., Matsuda, R., Matsuzaki, K., Okamoto, T., Serrero, G., Sussman, D. J., Kan, M. (2002). Specific cell types and their requirements. In: *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd Edn., (J.M. Davis, ed.), Oxford University Press, Oxford, England.: 227-274.

Sato J.D., Kawamoto, T., Okamoto, T. (1987). Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J. Exp. Med*. 165: 1761-1766.

Sato, M., Kawamata, H., Harada, K., Nakashiro, K., Ikeda, Y., Gohda, H., Yoshida, H., Nishida, T., Ono, K., Kinoshita, M., Adachi, M. (1997). Induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1, by treatment with 3,4-dihydro-6-[4-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinoline (vesnarinone) in a human salivary cancer cell line with mutant p53 gene. *Cancer Lett.* 112 (2): 181-189.

Schlegel, J., Piontek, G., Budde, B., Neff, F., Kraus, A. (2000). The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* 158: 103-108.

Shaw, R. J., Cantley, L. C. (2006). Ras, PI (3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 441 (7092): 424-430.

Singletary, S. E., Baker, F. L., Spitzer, G., Tucker, S. L., Tomasovic, B., Brock, W. A., Ajani, J. A., Kelly, A. M. (1987). Biological effect of epidermal growth factor on the in vitro growth of human tumors. *Cancer Res.* 47: 403-406.

Sykes, J. A., Whitescarver, J., Jernstrom, P., Nolan, J. F., Byatt, P. (1970). Some properties of a new epithelial cell line of human origin, *J Nat Cancer Inst* 45: 107.

Thacker, J., Webb, M. B., Debenham, P. G. (1988). Fingerprinting cell lines: use of human hypervariable DNA probes to characterize mammalian cell cultures. *Somat Cell Mol Genet.* 14(6): 519-525. 27.

Touat, M., Ileana, E., Postel-Vinay, S., André, F., Soria, J. C. (2015). Targeting FGFR Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res.* 21(12): 2684-2694.

Turner, N., Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(2): 116-129.

Ushiro, H., Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem.* 255: 8363-8365.

Wahl, M. I., Carpenter, G. (1987). Role of growth factors and their receptors in the control of normal cell proliferation and cancer. *Clin Physiol Biochem.* 5: 130-139.

Walenkamp, A. M., Sonke, G. S., Sleijfer, D. T. (2009). Clinical and therapeutic aspects of extrapulmonary small cell carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 35: 228–236.

Weber, W., Bertics, P. J., Gill, G. N. (1984). Immunoaffinity purification of the epidermal growth factor receptor. Stoichiometry of binding and kinetics of self-phosphorylation. *J Biol Chem.* 259: 14631-14636.

Yamamoto, N., Toratani, S., Okamoto, T. (2014). Anti-EGFR monoclonal antibody 12-93 inhibits the growth of human salivary adenocarcinoma via sub-G1 arrest and induction of apoptosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology.* 26(2): 183-187.

Yanagawa, T., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yura, Y., Nagamine, S., Bando, T., Sato, M. (1986). An adenoid squamous carcinoma-forming cell line established from an oral keratinizing squamous cell carcinoma expressing carcinoembryonic antigen. *Am J Pathol.* 124(3): 496–509.

Yao, J. C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J. E., Abdalla, E. K., Fleming, J. B., Vauthey, J. N., Rashid, A., Evans, D. B. (2008). One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol.* 26(18): 3063-3072.

Yarden, Y., Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem.* 57: 443-478.

Zeng, M., Yang, S. D., Zhang, J. L., Chen, X. M. (2015). Primary small cell neuroendocrine carcinoma of the oral cavity: A case report and review of the literature. *Oncol Lett.* 10(2): 887-890.

Zhao, X., Dai, W., Zhu, H., Zhang, Y., Cao, L., Ye, Q., Lei, P., Shen, G. (2006). Epidermal growth factor (EGF) induces apoptosis in a transfected cell line expressing EGF receptor on its membrane. *Cell Biol Int.* 30(8): 653-658.

尾崎 輝彦, 岡本 哲治, 藪本 正文, 明見 能成, 高田 和彰 (1991). 口腔由来正常上皮細胞および口腔癌細胞の無血清培養下での増殖に及ぼす EGF, FGF の影響ならびにこれら細胞における受容体解析. *日口外誌.* 37(8): 1454-1465.

榑 鉄也 (1973). 癌細胞の染色体と遺伝情報制御. 歯基礎誌 15(1): 1-13

長村 義之 (2012). 神経内分泌腫瘍 (NET)の WHO 分類 (2010)と病理診断. 日内分泌・甲状腺外会誌 29(3): 210-214.

林 英司, 力丸 浩一, 里村 一人, 中野 孝三郎, 布袋屋 智朗, 倉郷 貴敏, 長山 勝 (1995). 4種のヒト口腔癌細胞株の樹立とその性状. 口科誌 44(1): 47-54.

平山 超教, 富岡 寛文, 小野里 祐佑, 高原 楠旻, 丸川 恵理子, 原田 浩之 (2019). 口底に発生した神経内分泌癌の1例. 日口外誌. 65(7): 455-460.

堀越 勝, 木村 義孝, 他 (1974). 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第一報). 日口外誌 20(2): 100-106.

宮内 忍, 諸山 隆, 阪本 知二, 岡本 哲治, 高田 和彰 (1985). ヒト口底癌由来細胞株(Ueda-1)の樹立. 日口外誌 31(6): 1347-1351.

図表

表 1 培養に用いた無血清培地 (RD6F) の組成

RD6F	
Basal medium	RPMI1640:DMEM =1:1
HEPES	3574.5mg/l
6 factors	
• Insulin	10µg/ml
• Transferrin	5µg/ml
• 2-Mercaptoethanol	10µM
• 2-aminoethanol	10µM
• Sodium selenite	20nM
• Oleic acid conjugated with fatty acid-free human recombinant albumin	4.7µg/ml

表 2 細胞蛍光免疫染色及び組織免疫染色に用いた各種抗体

一次抗体	希釈率	会社名
12-93	1:100	極東和光
anti-S100b	1:100	abcam
anti-pKRT	原液	ニチレイバイオサイエンス
anti-Nestin	1:300	Santa Cruz
anti-NGFR	1:50	abcam
anti-ChromograninA	1:50	Dako
anti-CD56	1:50	abcam

表 3 STR 解析の結果

Locus	OSCC-SM				OSCC-KK				OSCC-OS				OSCC-MO			
	Cell line p17		Cell line p100		Operation material		Cell line		Operation material		Cell line		Operation material		Cell line	
D3S1358	15	17	15	17	16		16		15	16	15		16	18	16	18
TH01	6		6		7	9	7	9	9		9		6		6	
D21S11	30	31	30	31	30		30		29	30	29	30	28.2	31	28.2	31
D18S51	17		17		15	19	15		14	17	14		14	18	14	
Penta_E	12	22	12	22	11	17	11	17	14	17	14	17	18	22	18	22
D5S818	9	13	9	13	11	13	11	13	9	13	9	13	12	13	12	13
D13S317	8	11	8	11	9	13	9		9	14	9	14	9	14	9	14
D7S820	11		11		11	12	11		12		12		10	11.3	10	11.3
D16S539	10	11	10	11	9		9		10	13	10	13	9	12	9	12
CSF1PO	11	12	11	12	12	14	12	14	9	11	9	11	12	13	12	13
Penta_D	11	12	9	11	9	10	9	10	9	14	9	14	9		9	
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X		X	Y	X	Y
vWA	14	18	14	18	14		14		14	16	14	16	15	17	15	17
D8S1179	14	16	14	16	12	14	14		11	14	11	14	13		13	
TPOX	8		8		9		9		8	9	8	9	11		11	
FGA	20.2	21	20.2	21	21		21		22		22		21	23	21	23

Locus	OSCC-UN			OASCC-MS			OASCC-HT			ONEC-TS						
	Operation material		Cell line	Operation material		Cell line	Operation material		Cell line	Operation material		Cell line				
D3S1358	15	16	15	16		16		15		15		17		17		
TH01	9		9	9		9		7		7		6	7	6		
D21S11	30		30	30		30		29	32	29	32	29	31	29	31	
D18S51	15	16	16	14	15	15		17	24	17		14	18	14	18	
Penta_E	15		15	16	18	16	18	17	18	17	18	21	22	OL	22	
D5S818	10	11	11	11	12	12		12	13	12		9	12	12		
D13S317	9	12	9	10	11	10	11	9	11	9	11	8	11	8	11	
D7S820	11		11	9	13	9	13	10	11	10	11	10	11	10	11	
D16S539	11	13	11	13	12		12		11	12	11	12	9	10	9	10
CSF1PO	10	13	13		10	12	12		9	10	10		10		10	
Penta_D	9	13	9	13	9	12	9	12	12		12		9	10	9	10
AMEL	X		X		X		X		X		X		X		X	
vWA	16	18	16	18	18		18		14	18	14		17		17	
D8S1179	13		13		13	14	13	14	10	15	10	15	10	15	10	15
TPOX	11	12	11	12	9	10	9	10	8		8		8	12	8	12
FGA	22	24	22	24	19	26	19		19	21	19	21	25		25	

全ての細胞株において、既存の細胞株の混入がないこと、また OSCC-SM を除く細胞株は手術組織由来であること、OSCC-SM は 17 代と 100 代で STR が同一であることが示された。

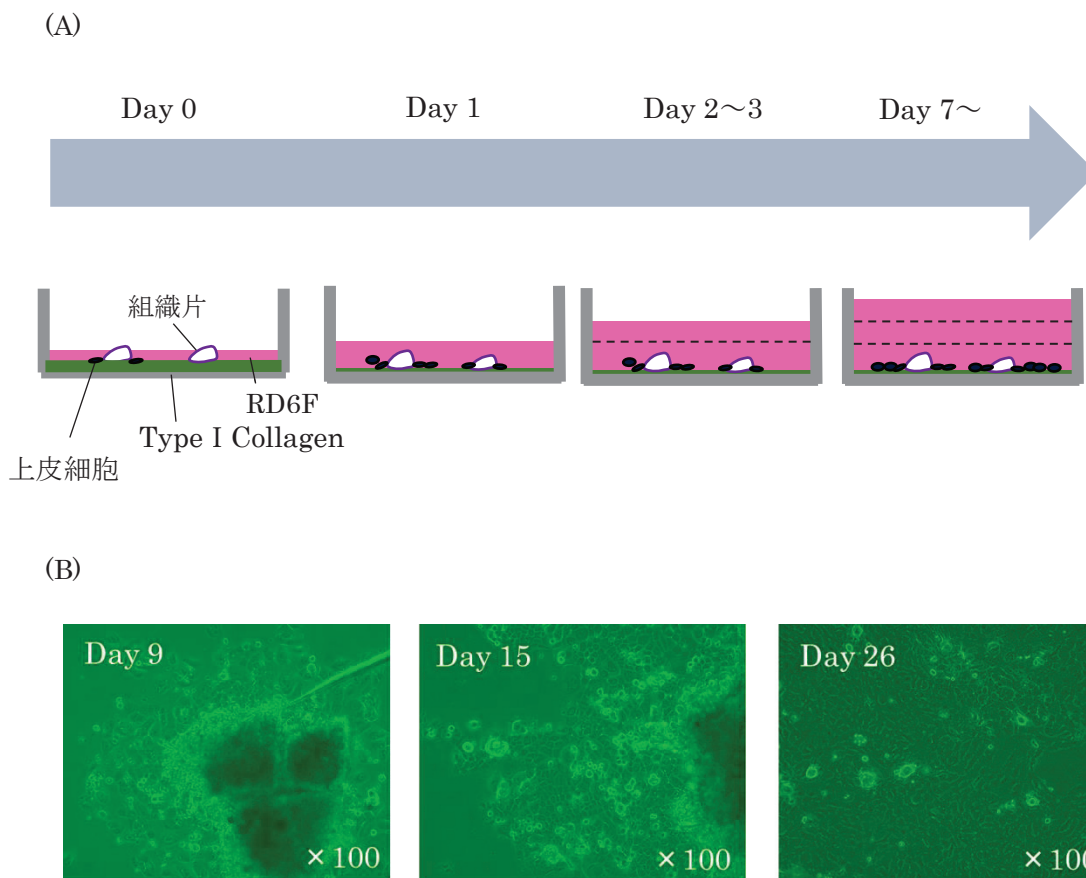


図 1 初代培養の模式図及び位相差顕微鏡像

(A) 初代培養方法の模式図

生検及び手術切除組織より無菌下に得た腫瘍組織片を、2本のメスを用いて可能な限り細切し、RD培地にて回収・遠心後に、RD6F培地に懸濁し、Type I collagenでコートした60mm培養dishに組織片を含む培地を1ml播種し、37℃、5%CO₂気相下で培養した。その後、100-200µlのRD6F培地を適宜加え、*explant culture*法を用いて初代培養を行った。

(B) 位相差顕微鏡像

OSCC-SMの初代培養後9日目、15日目、26日目の細胞位相差顕微鏡像を示す。組織片より十分に*outgrowth*した段階で、細胞を酵素処理にて剥離・回収し、継代培養を行った。

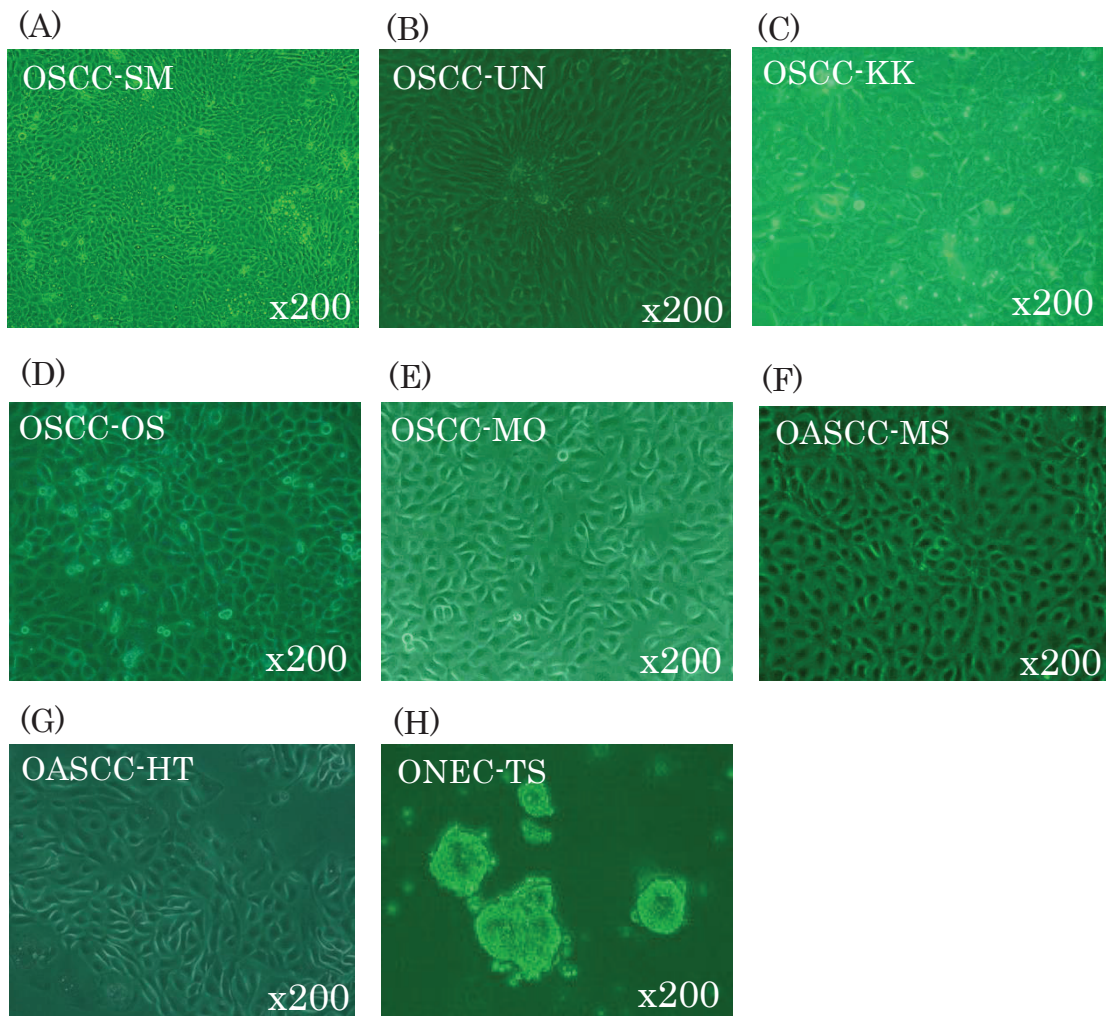


図2 各細胞株の倒立位相差顕微鏡像

(A) OSCC-SM 140代、(B) OSCC-UN 197代、(C) OSCC-KK 72代、(D) OSCC-OS 45代、
(E) OSCC-MO 34代、(F) OASCC-MS 55代、(G) OASCC-HT 60代の倒立位相差顕微鏡像。

いずれの細胞も大小不同の多角細胞が敷石状に配列し増殖した。

(H) ONEC-TS 2代の倒立位相差顕微鏡像。dishに接着せず、neuro sphereを形成して浮遊状態で増殖した。

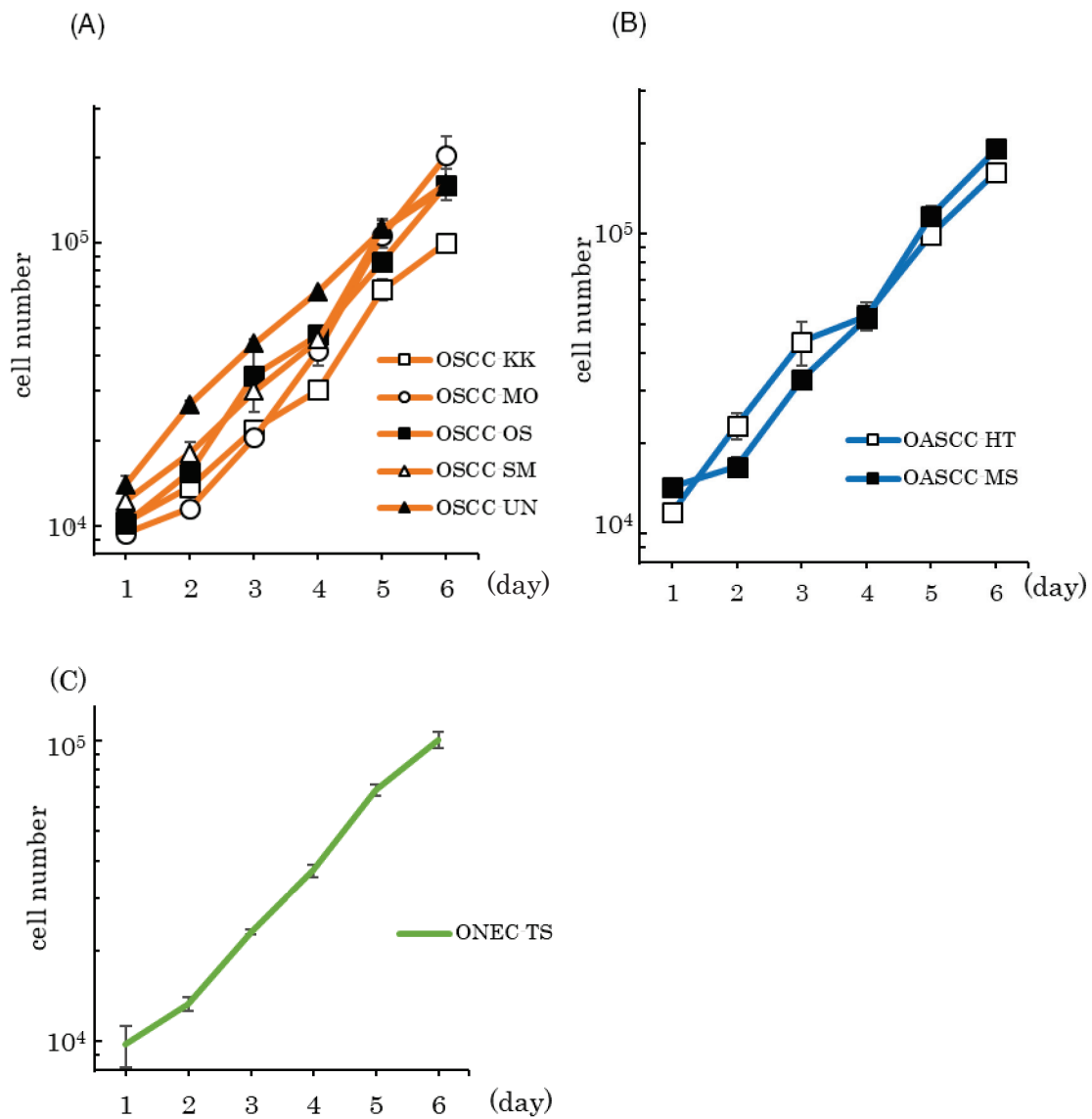


図3 細胞増殖曲線

対数増殖期における細胞倍加時間は、(A) OSCC-KK : 27.8 時間、OSCC-MO : 20.9 時間、OSCC-OS : 27.3 時間、OSCC-SM : 26.2 時間、OSCC-UN : 39.1 時間、(B) OASCC-MS : 25.6 時間、OASCC-HT : 30.1 時間、(C) ONEC-TS : 33.2 時間であった。

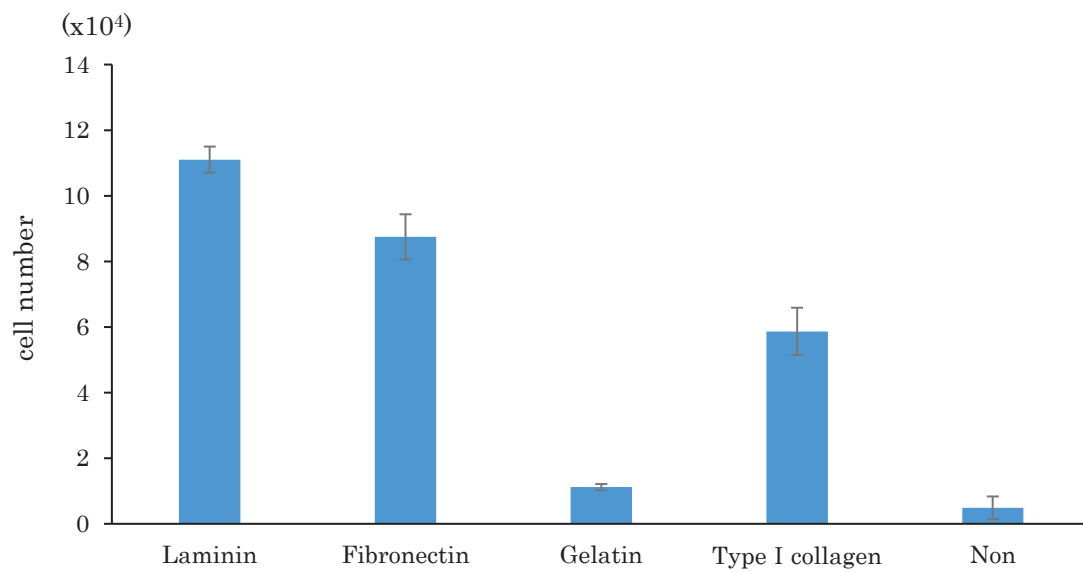


図 4 ONEC-TS における細胞外基質別の細胞増殖試験

各細胞外基質をコートし増殖試験を行い、培養 6 日目に細胞数を計測した。

Laminin にて最も良好な細胞増殖を示した。

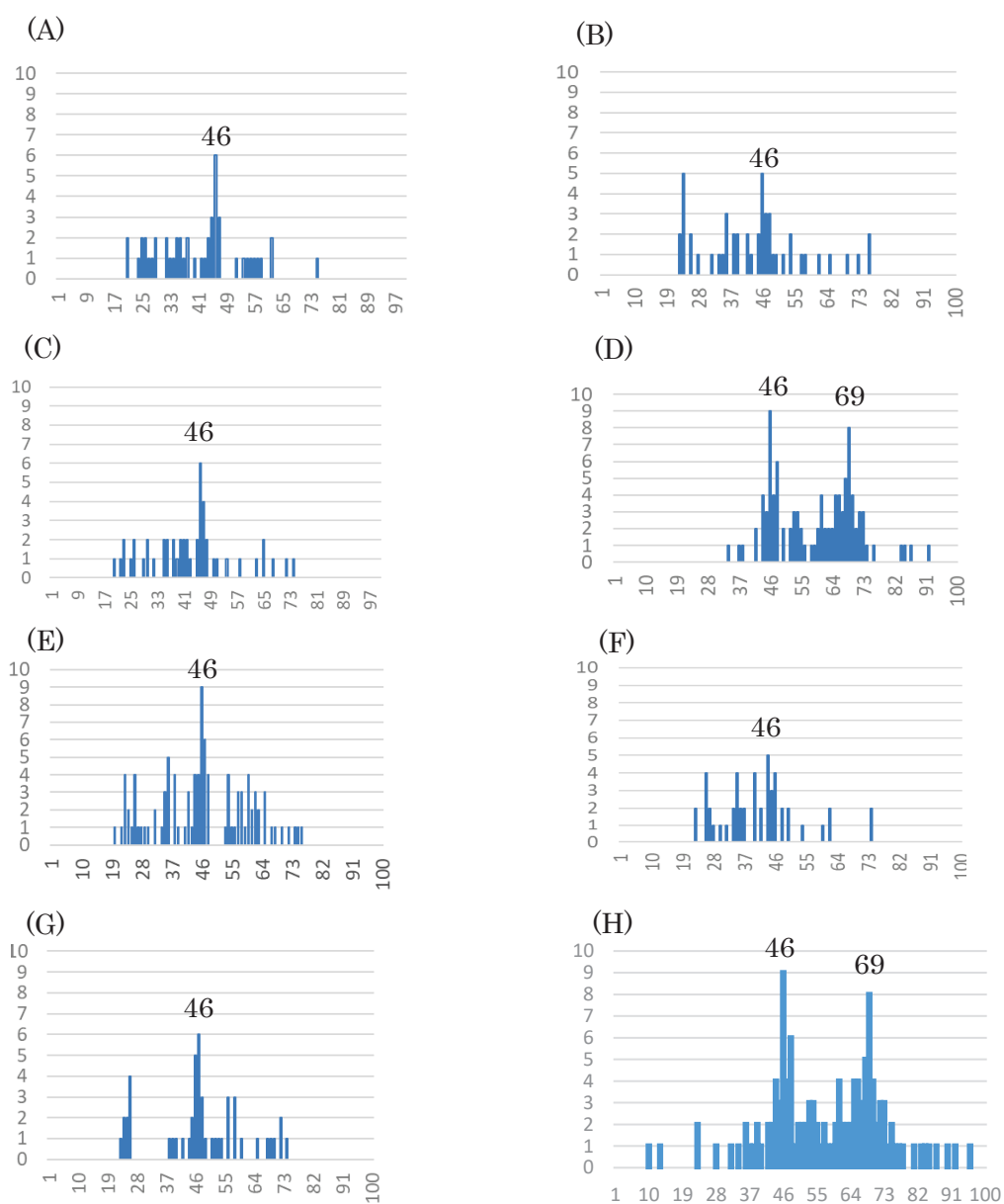
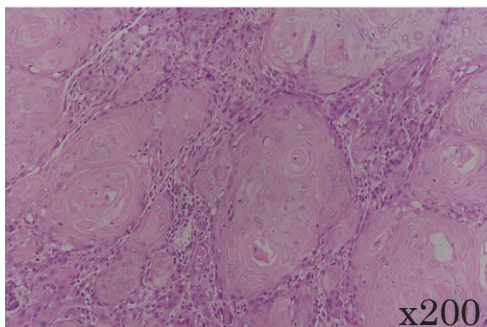
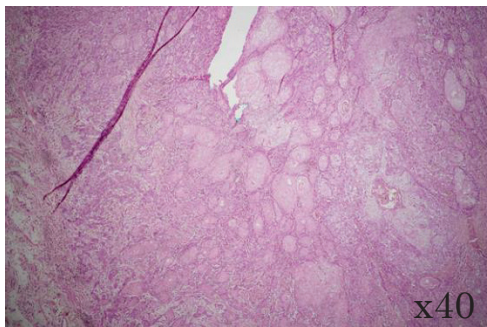


図5 染色体解析の結果

(A) OSCC-SM 110代、(B) OSCC-KK 72代、(C) OSCC-OS 50代、(D) OSCC-UN 3代、
 (E) OSCC-MO 30代、(F) OASCC-MS 55代、(G) OASCC-HT 30代、(H) ONEC-TS 5代
 の染色体解析の結果。

いずれの細胞株も2倍体から低3倍体に、OSCC-UN、ONEC-TSは3倍体にもモードを示し、19~92まで幅広い染色体数を示した。

手術組織検体



ヌードマウス形成腫瘍

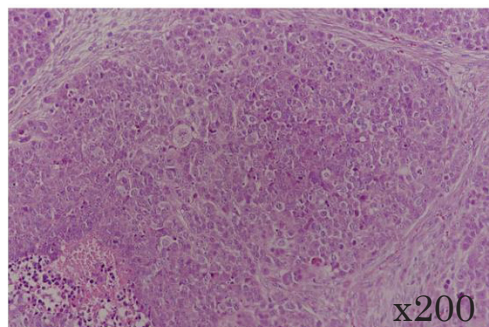
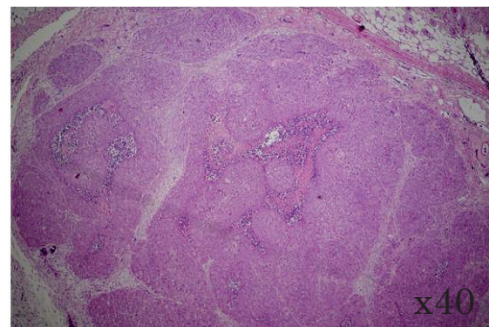


図 6 A OSCC-KK の手術組織検体及びヌードマウス腫瘍の H-E 染色像
ヌードマウス形成腫瘍は、低分化な扁平上皮癌からなる腫瘍を形成した。

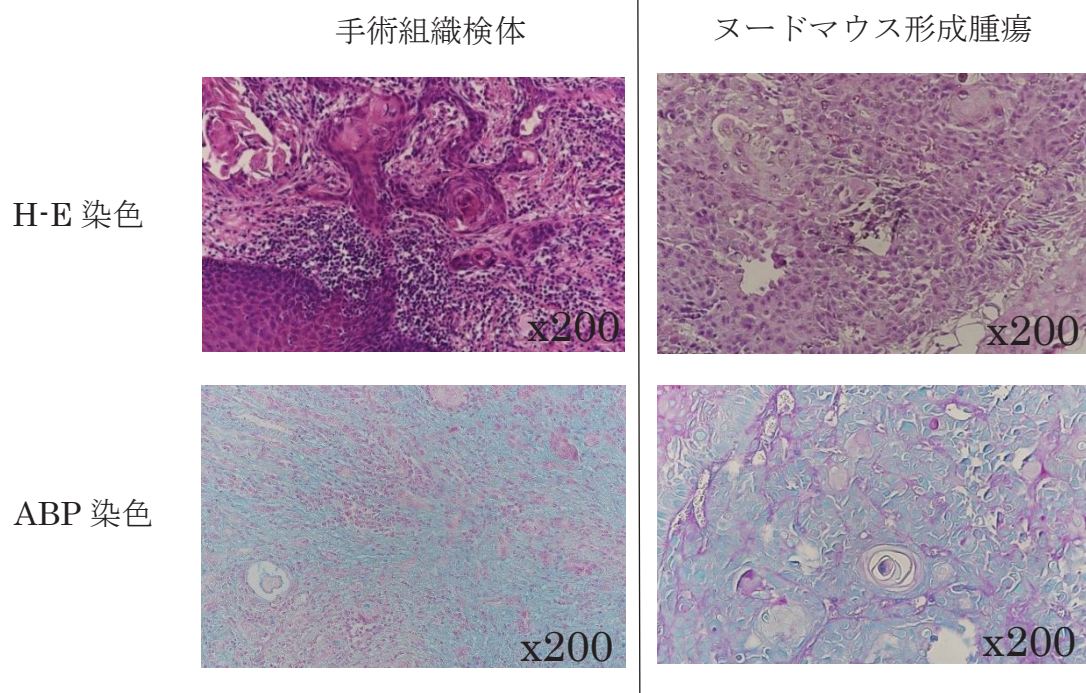
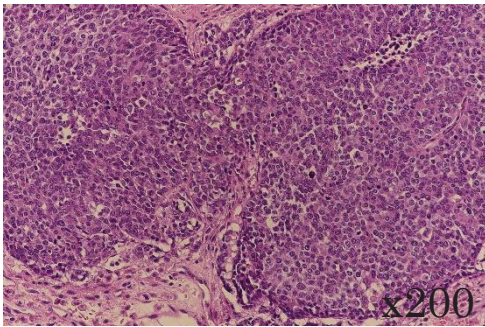
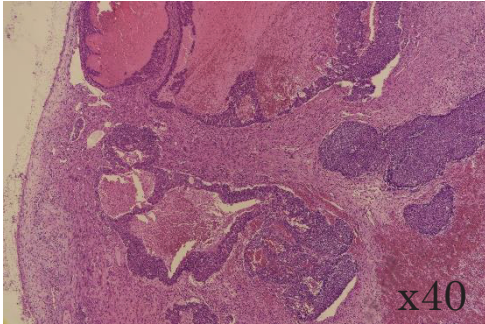


図 6B OASCC-HT の手術組織検体及びヌードマウス形成腫瘍の H-E 及び ABP 染色像
 手術組織及びマウス形成腫瘍いずれの組織においても、明らかな腺腔構造は見られなかったが、酸性ムコ多糖の存在を示すアルシヤンブルー陽性を示した。

手術組織検体



ヌードマウス形成腫瘍

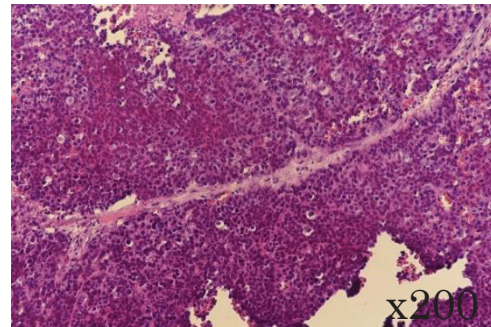
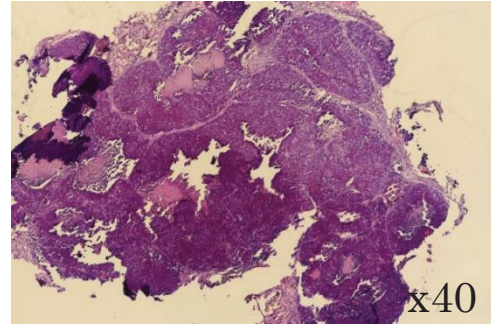


図 6C ONEC-TS の手術組織検体及びヌードマウス形成腫瘍の H-E 染色像

手術組織検体及びヌードマウス形成腫瘍は、いずれも比較的大きな核を有する円形の細胞で構成されていた。

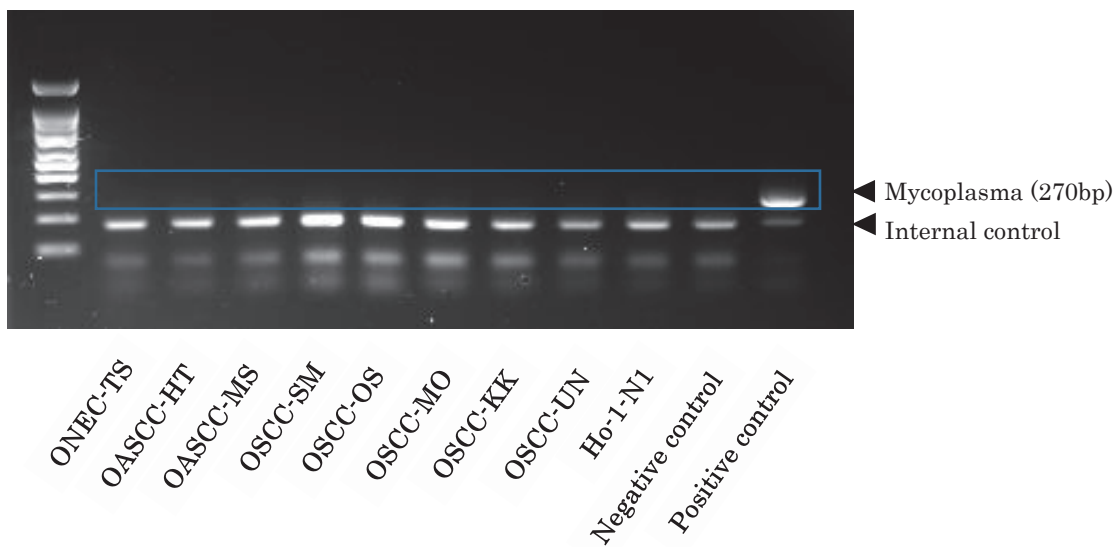


図7 マイコプラズマ感染試験

全ての細胞株において、マイコプラズマ感染は示されなかった。Internal control は全てのPCR産物から検出され、PCR反応は正常に行われていることが示された。

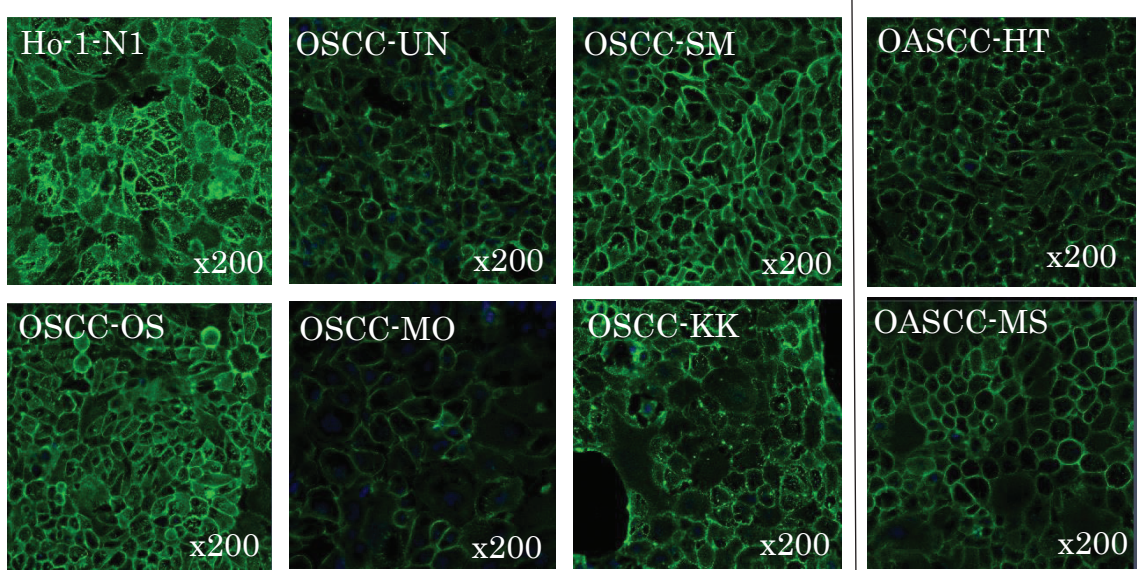


図 8 細胞蛍光免疫染色による EGFR の発現の検討

EGFR のマウスモノクローナル抗体である 12-93 抗体を用いて、細胞蛍光免疫染色を行った。OSCC、OASCC すべての細胞株において、細胞表面が染色され、EGFR の発現が示された。OSCC と OASCC 間で、発現に明らかな違いは認めなかった。

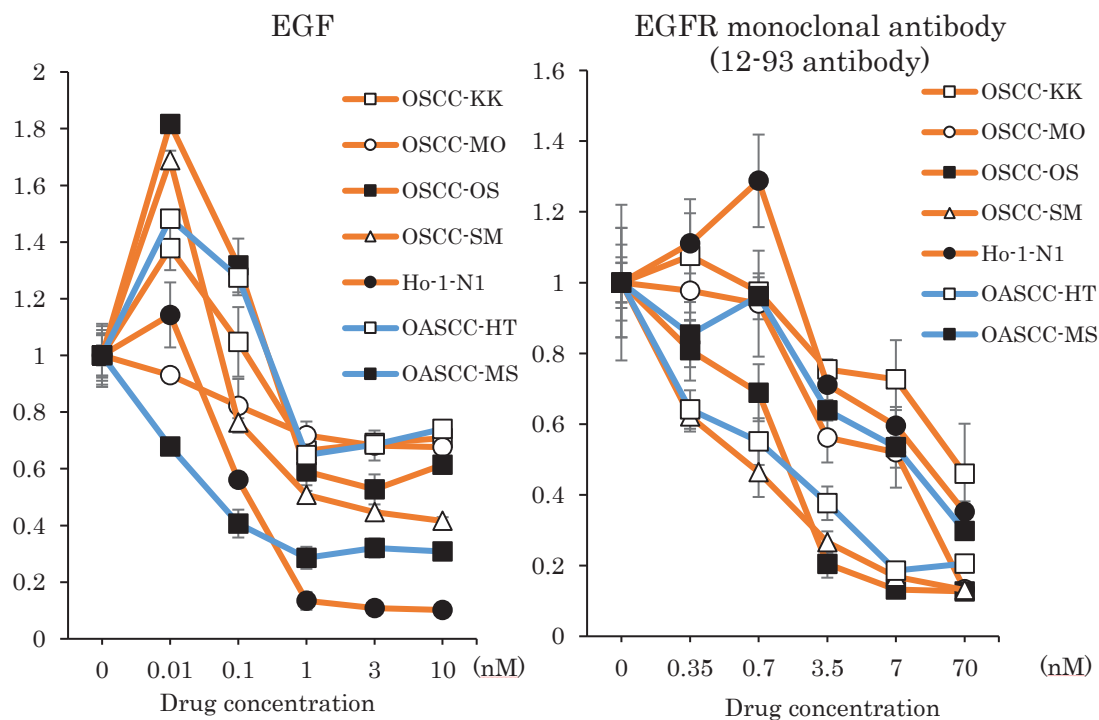


図9 EGF、抗EGFR抗体を用いた細胞増殖試験

低濃度のEGFはOSCC、OASCCの細胞増殖を軽度促進する傾向を示したが、0.1nM以上の濃度では、全ての細胞株で濃度依存的に細胞増殖を抑制した。また抗EGFR抗体においても、OSCC、OASCCすべての細胞株において濃度依存的に細胞増殖を抑制した。

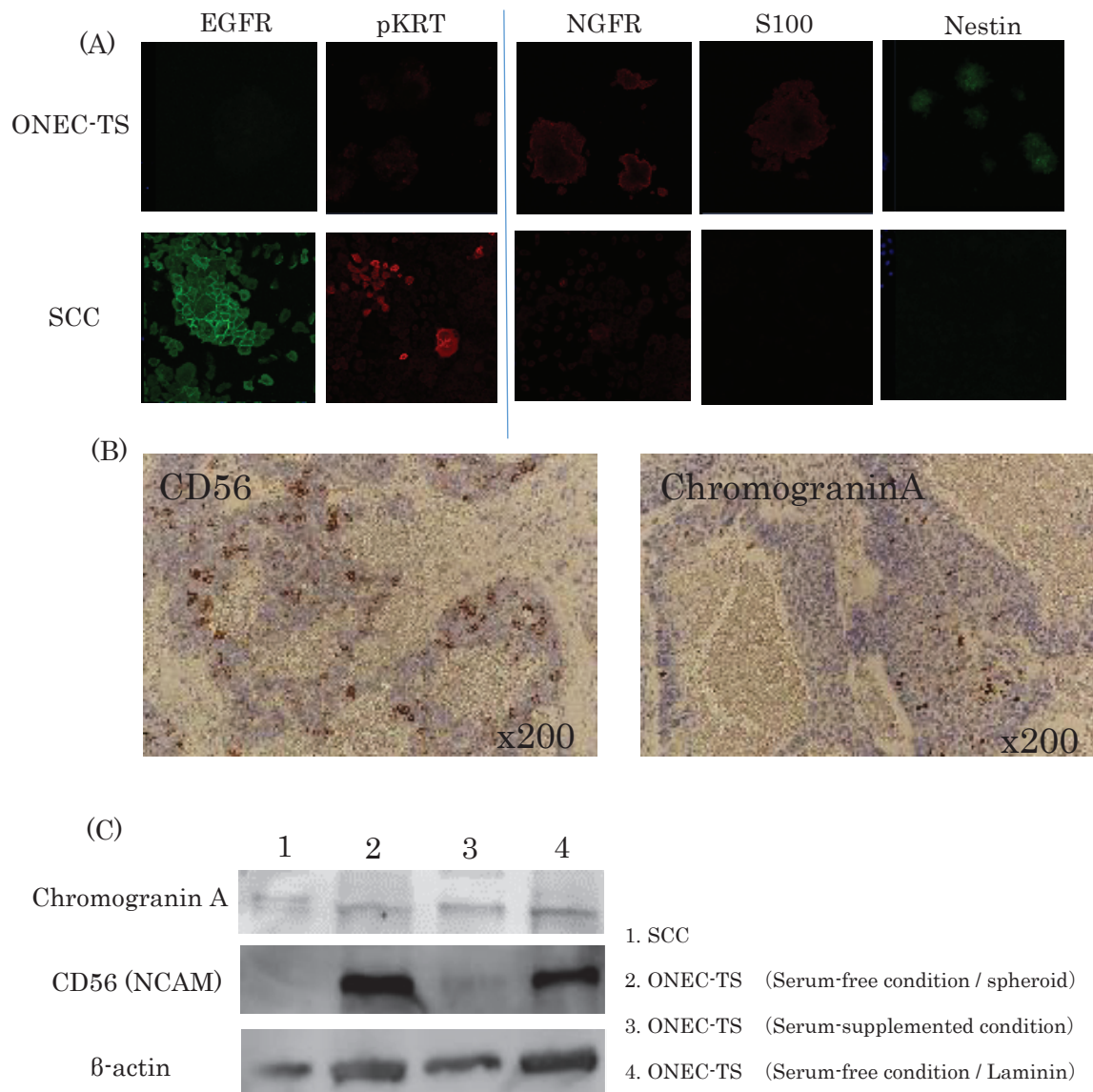


図 10 ONEC-TS における各種マーカー発現の検討

(A) ONEC における上皮系及び神経系マーカーの発現

細胞蛍光免疫染色の結果、OSCC は EGFR や pKRT などの上皮系マーカーを発現していたが、ONEC-TS では上皮系マーカーの発現は認めなかった。一方、ONEC-TS は S100 や Nestin などの神経系マーカーを発現していた。

(B) ONEC 手術切除標本における、組織免疫染色による神経内分泌腫瘍マーカーの発現

CD56、ChromograninA の陽性所見を示した。

(C) ONEC における、Western blot 法による神経内分泌腫瘍マーカーの発現

CD56、ChromograninA、いずれも蛋白レベルでの発現を示した。

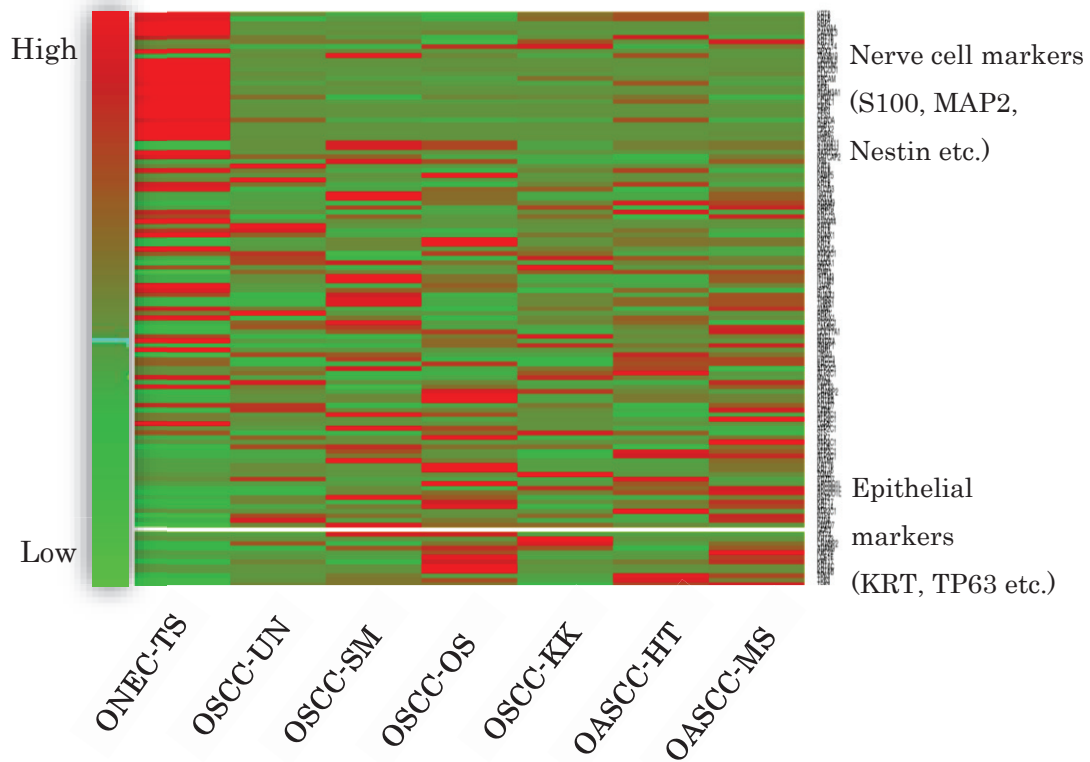


図 11 Transcriptome 解析 (heat map)

赤：高発現、緑：低発現を示す。OSCC、OASCCはKRTなどの上皮系マーカーの発現が高かったことに対し、ONEC-TSは上皮系マーカーの発現が低く、またS100やNestinなどの神経系マーカーの発現がOSCC、OASCCと比較し亢進していた。

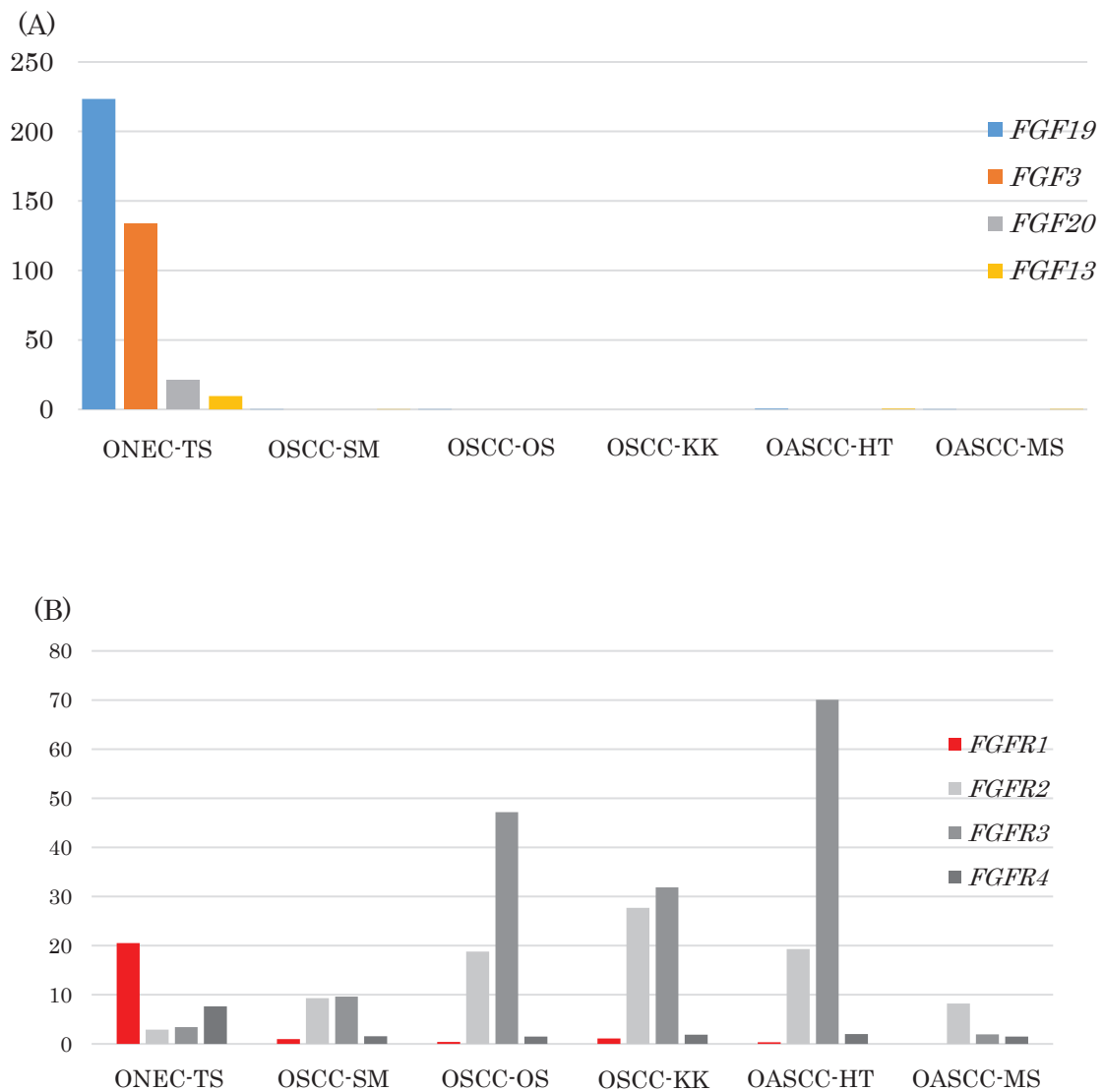


図 12 Transcriptome 解析による *FGF* 及び *FGFR* の発現

(A) ONEC-TS は、OSCC、OASCC と比較して、*FGF-3*、*-13*、*-19*、*-20* の発現が亢進していた。

(B) ONEC-TS は、OSCC、OASCC と比較して、*FGFR1* の発現が亢進していた。

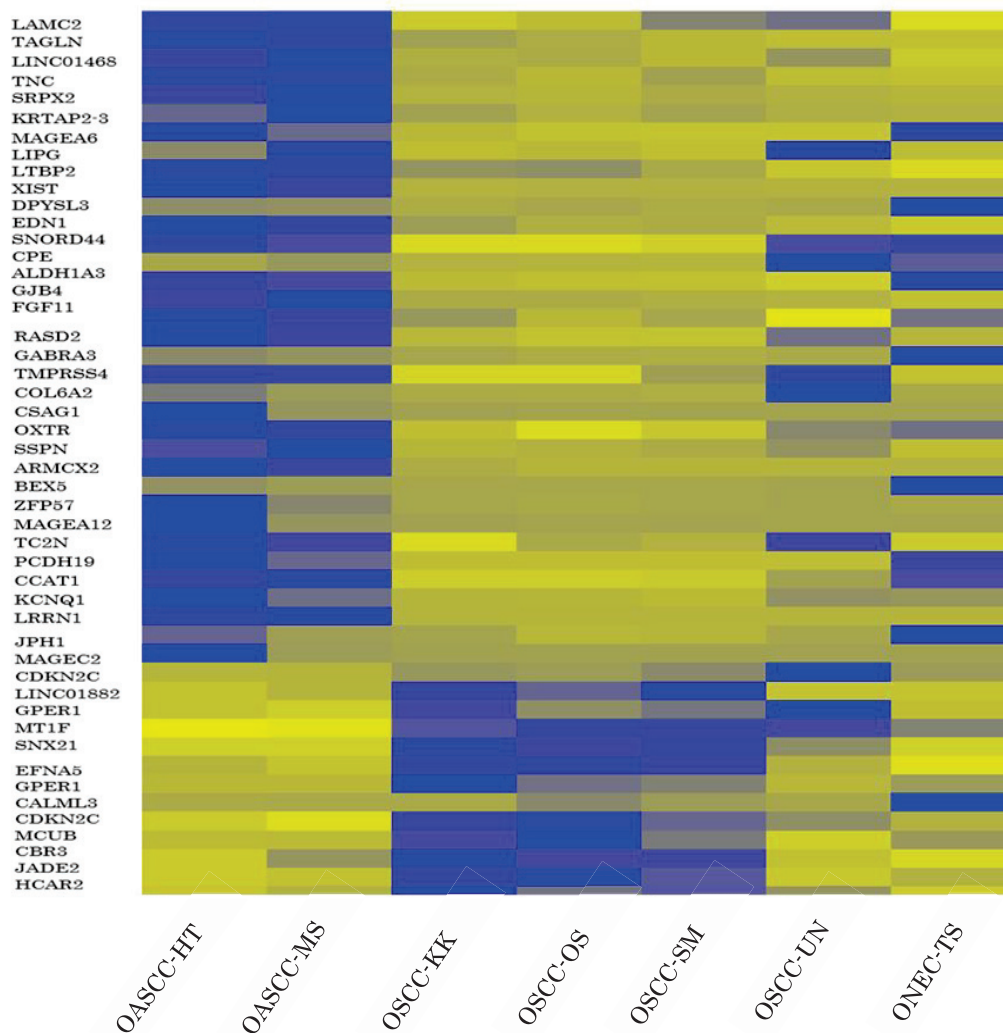


図 13 Transcriptome 解析 (heat map)

青：高発現、黄：低発現を示す。OASCC と OSCC 間で発現比が 2 倍以上の差を示した遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、OASCC では PI3K/Akt 経路関連遺伝子の発現が亢進していた。

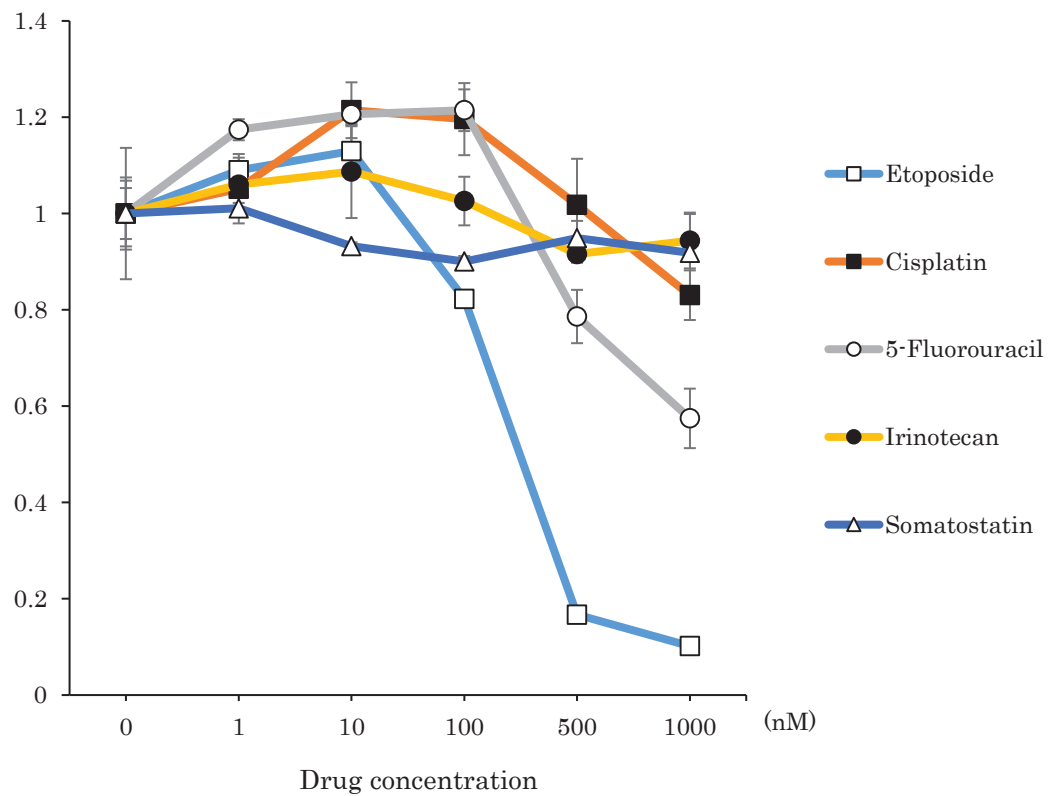


図 14 ONEC-TS における抗癌剤に対する感受性試験

5-Fluorouracil でやや増殖抑制を示したものの、Cisplatin、Irinotecan、Somatostatin では細胞増殖は抑制されず、Etoposid にて著明に細胞増殖が抑制された。IC₅₀は 278nM であった。

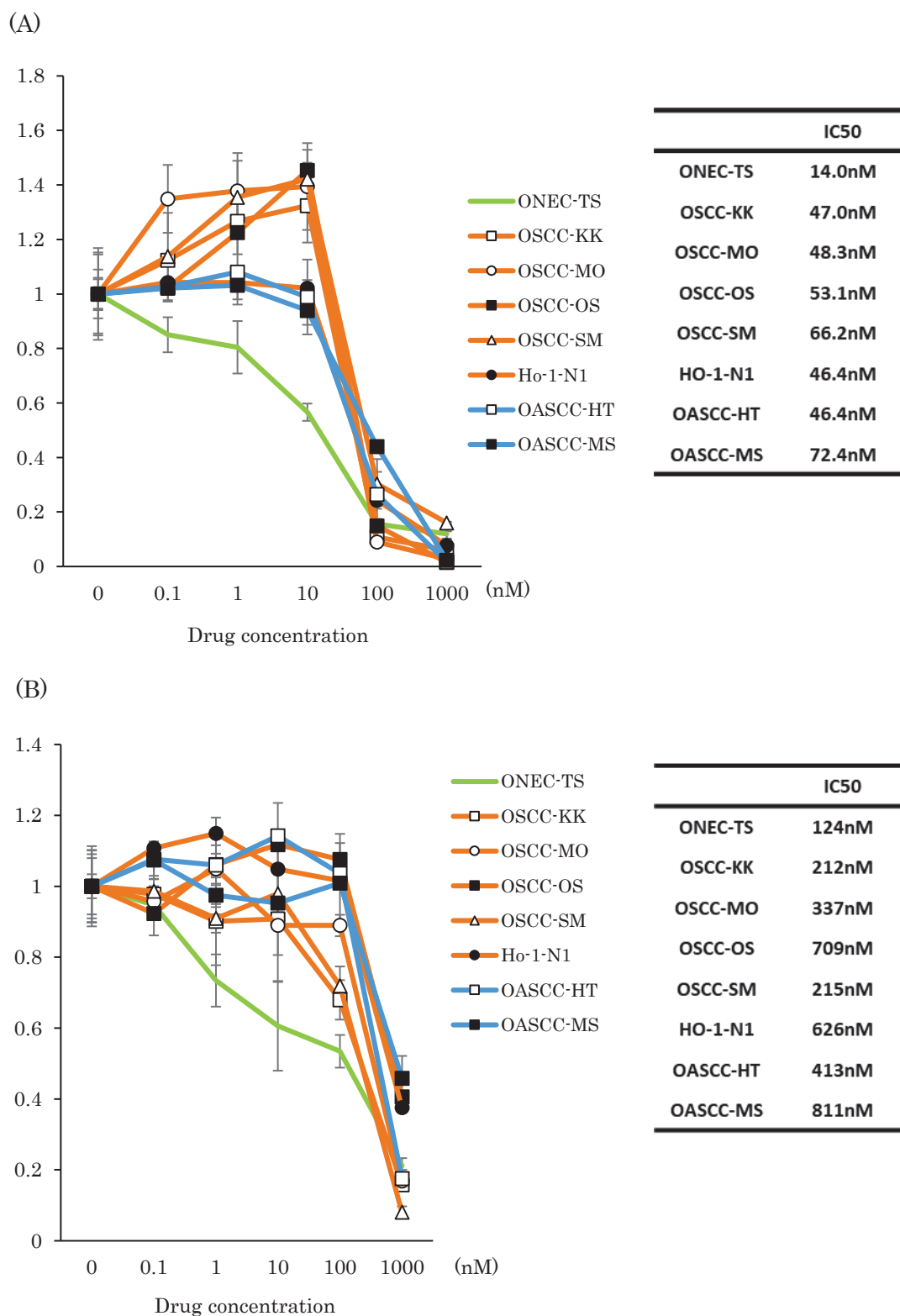


図 15 Ponatinib、Sunitinib を用いた薬剤感受性試験

(A) Ponatinib、(B) Sunitinib いずれの薬剤においても、ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して低い濃度で細胞増殖が抑制され、低い IC₅₀ を示した。

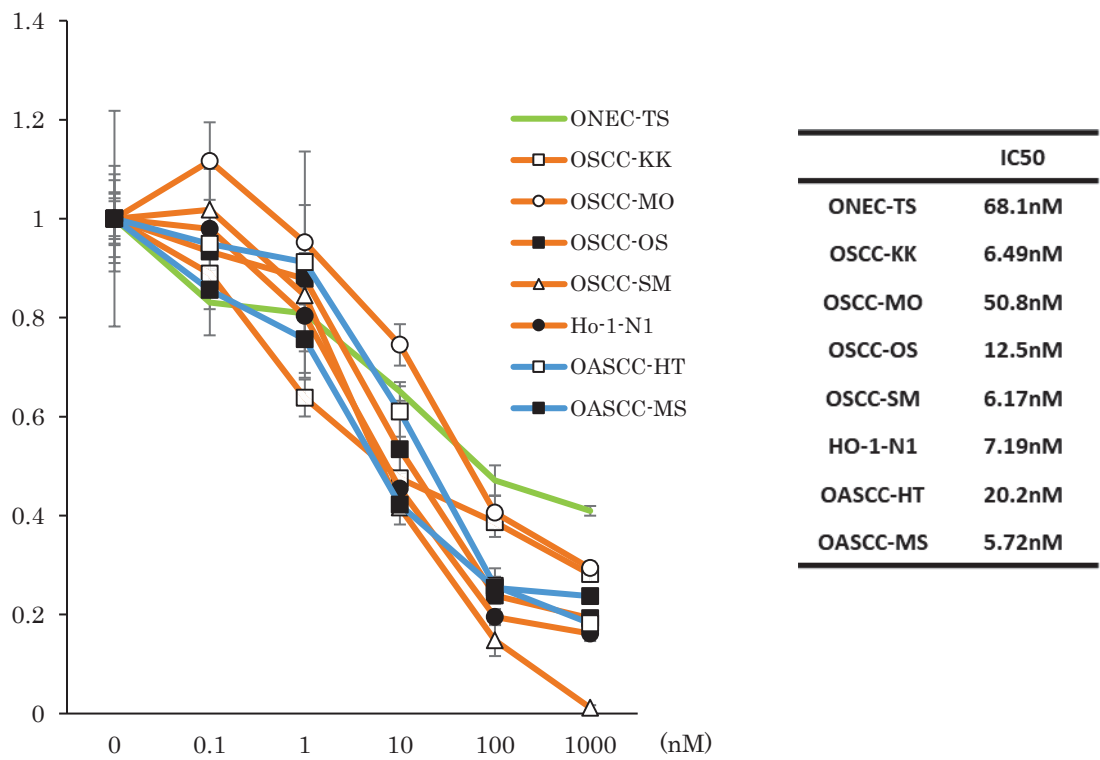


図 16 Everolimus を用いた薬剤感受性試験

Everolimus により、すべての細胞株において細胞増殖が抑制された。

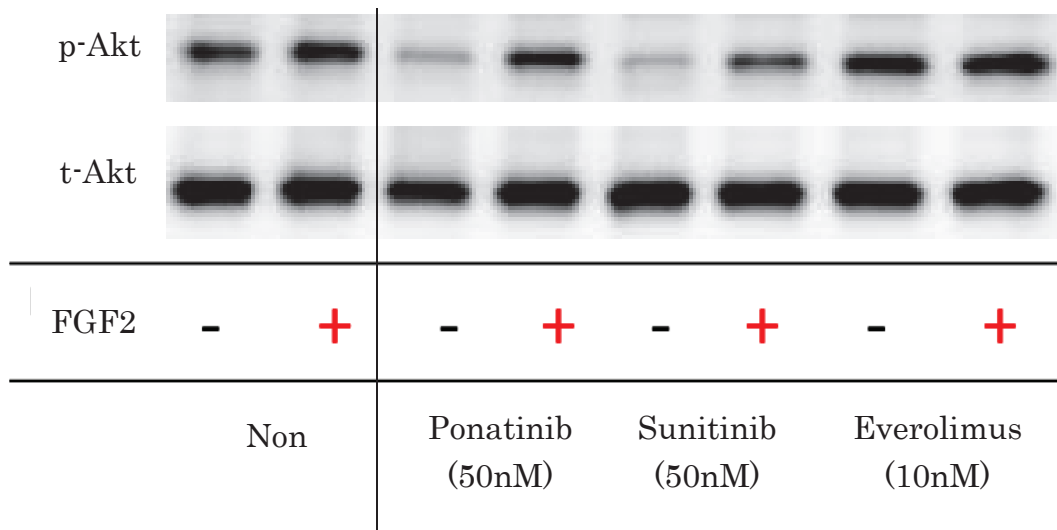


図 17 Ponatinib、Everolimus、Sunitinib が ONEC-TS のシグナル伝達に及ぼす影響

ONEC-TS の無処理、Ponatinib、Sunitinib、Everolimus12 時間処理後の蛋白及び前処理後に FGF2 で 15 分刺激後に抽出した蛋白に対し、pAkt 及び Akt の抗体を用いて Western Blot 法を行った。

Ponatinib 及び Sunitinib により Akt のリン酸化レベルの低下が示され、Ponatinib 及び Sunitinib 前処理後の FGF2 によるリガンド刺激時の Akt のリン酸化レベルは、無処理群と比較して亢進されないことが示された。

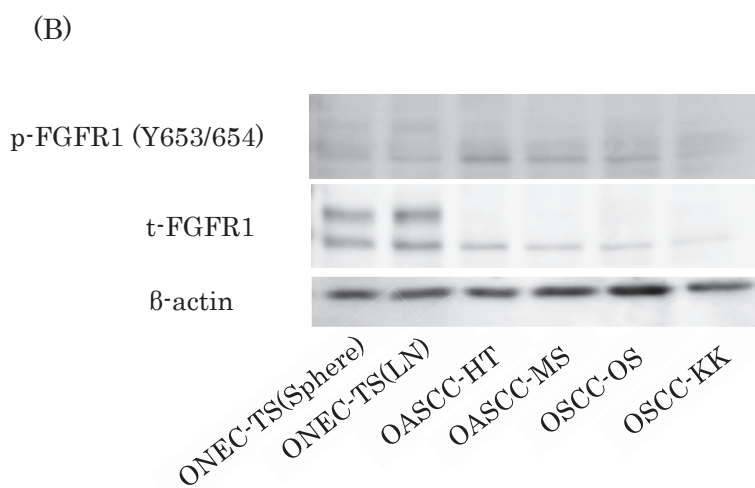
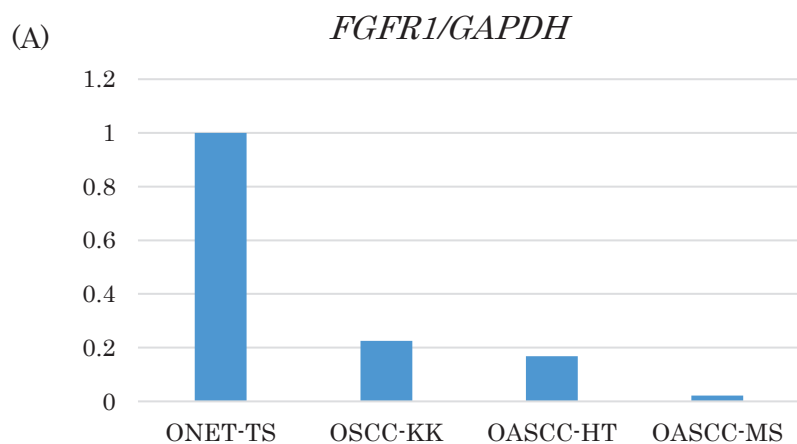


図 18 FGFR1 の mRNA 及び蛋白レベルでの発現検討

(A) qRT-PCR の結果、mRNA レベルにおいて、Transcriptome 解析の結果と同様に、ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して *FGFR1* の発現が亢進していることが示された。

(B) Western blot 法にて、ONEC-TS は OSCC、OASCC と比較して、FGFR1 の発現が亢進していた。