

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

5-胺基酮戊酸 (ALA)光動力療法於癌源幹細胞特性、化療
敏感性、及作為輔助性口腔癌新穎治療法之轉譯醫學研究

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2314-B-040-016-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學牙醫學系(所)

計畫主持人：余權航
共同主持人：余承佳
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：張雅雯

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年10月25日

中文摘要： 研究背景:口腔癌為台灣男性癌症發生率及死亡率的第四位。90%的口腔癌為鱗狀細胞癌，其特性為容易復發及局部淋巴結轉移轉移之特性，口腔癌病患預後成果及存活率相當差。因此尋找有效輔佐療法提昇傳統化療藥物(如 5-FU, cisplatin, doxorubicin)敏感性，能提供臨床口腔癌治療上很大的幫助。光動力療法是一種非侵入性、病人接受度高的治療方法。光動力療法主要是由兩種無毒性的要素所構成，其一是特殊波長的光，另一種則是光感物質。過去學者之研究，利用光感物質 ALA 之光動力治療，可用於治療食道癌、膀胱癌、皮膚癌、口腔癌前病變、及口腔癌。而癌源幹細胞特性對於口腔癌對於化學性療法產生阻抗性相當重要，因此本計畫將探討光動力療法是否能降低癌源幹細胞特性而提昇化療敏感性之轉譯醫學研究。

研究方法：本研究擬利用幹細胞球體、ALDH1 標記驗證 ALA 光動力治療對於癌源幹細胞特性之影響並且觀察 ALA 光動力治療搭配傳統化療藥物共同處理下抑制腫瘤生成力的效果。

結果：利用流式細胞儀發現 ALA 光動力治療處理會降低口腔癌細胞之 ALDH1 活性及 CD44 表現量。ALA 光動力治療處理口腔癌細胞亦降低幹細胞球體自我更新力、幹細胞標記(Oct4, Nanog, and Nestin)表現量。ALA 之光動力治療會降低癌幹細胞化療阻抗特性。ALA 之光動力治療搭配傳統化療藥物共同處理會降低癌幹細胞腫瘤爬行

結論：本研究強調基礎研究與臨床應用接軌的重要性，提期待能證實 ALA 光動力治療法有潛力成為對抗口腔癌的化療輔佐藥劑，提供未來個人化醫療之應用。

中文關鍵詞： 光動力療法； ALA； 口腔癌； 癌源幹細胞

英文摘要：

英文關鍵詞：

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告

期中進度報告

5-胺基酮戊酸 (ALA)光動力療法於癌源幹細胞特性、化療敏感性、及作為輔助性口腔癌新穎治療法之轉譯醫學研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：101-2314-B-040-016

執行期間：101年 8月 1日至 102年 7月 31日

執行機構及系所：中山醫學大學牙醫系(所)

計畫主持人：余權航

計畫參與人員：張雅雯

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 10 月 25 日

中文摘要

研究背景: 口腔癌為台灣男性癌症發生率及死亡率的第四位。90%的口腔癌為鱗狀細胞癌，其特性為容易復發及局部淋巴結轉移轉移之特性，口腔癌病患預後成果及存活率相當差。因此尋找有效輔佐療法提昇傳統化療藥物(如 5-FU, cisplatin, doxorubicin)敏感性，能提供臨床口腔癌治療上很大的幫助。光動力療法是一種非侵入性、病人接受度高的治療方法。光動力療法主要是由兩種無毒性的要素所構成，其一是特殊波長的光，另一種則是光感物質。過去學者之研究，利用光感物質ALA 之光動力治療，可用於治療食道癌、膀胱癌、皮膚癌、口腔癌前病變、及口腔癌。而癌源幹細胞特性對於口腔癌對於化學性療法產生阻抗性相當重要，因此本計畫將探討光動力療法是否能降低癌源幹細胞特性而提昇化療敏感性之轉譯醫學研究。

研究方法: 本研究擬利用幹細胞球體、ALDH1標記驗證ALA光動力治療對於癌源幹細胞特性之影響並且觀察ALA光動力治療搭配傳統化療藥物共同處理下抑制腫瘤生成力的效果。

結果: 利用流式細胞儀發現ALA光動力治療處理會降低口腔癌細胞之ALDH1活性及CD44表現量。ALA光動力治療處理口腔癌細胞亦降低幹細胞球體自我更新力、幹細胞標記(Oct4, Nanog, and Nestin)表現量。ALA之光動力治療會降低癌幹細胞化療阻抗特性。ALA之光動力治療搭配傳統化療藥物共同處理會降低癌幹細胞腫瘤爬行

結論: 本研究強調基礎研究與臨床應用接軌的重要性，提期待能證實ALA光動力治療法有潛力成為對抗口腔癌的化療輔佐藥劑，提供未來個人化醫療之應用。

關鍵字: 光動力療法; ALA; 口腔癌; 癌源幹細胞

Abstract

Background and Objective: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) ranks the fourth leading malignancy and cancer death in male population in Taiwan. Despite recent therapeutic advances, the prognosis for OSCC patients is still dismal. New strategies are urgently needed to improve the chemosensitization to conventional chemotherapeutic drugs and clinical responses of OSCC patients. Studies have demonstrated that topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (ALA-PDT) is being used in the treatment of various human premalignant and malignant lesions with some encouraging clinical outcomes. However, the molecular mechanisms of ALA-PDT in the therapeutic effect in OSCC tumorigenesis and whether ALA-PDT as chemosensitizer for OSCC treatment remain unclear. Accumulating data support cancer stem cells (CSCs) contributes chemo-resistance in OSCC. Based on the previous studies, the purpose of the study is to investigate the effect of ALA-PDT on CSCs and chemosensitization property in OSCC.

Study Design/ Methods: CSCs marker ALDH1 activity of HNC cells with ALA-PDT treatment as assessed by the Aldefluor assay flow cytometry analysis. Secondary Sphere-forming self-renewal, stemness markers expression, and invasiveness of HNC-CSCs with ALA-PDT treatment were presented.

Results: We observed that the treatment of ALA-PDT significantly down-regulated the ALDH1 activity and CD44 positivity of OSCC-CSC. Moreover, ALA-PDT reduced self-renewal property and stemness signatures expression (Oct4, Nanog, and Nestin) in sphere-forming OSCC-CSC. The migration/invasiveness/colongenicity ability of OSCC-CSCs was lessened under ALA-PDT treatment partially. ALA-PDT sensitized highly tumorigenic HNC-CSCs to conventional chemotherapies.

Conclusions: Our results provide insights into the clinical prospect of ALA-PDT as a potential chemo-adjuvant therapy against head and neck cancer through eliminating CSC property.

Key words: photodynamic therapy; ALA; oral cancer; cancer initiating stemness property

計畫背景之背景及目的

1. 口腔癌

口腔癌是全世界人類第六大癌症，而在開發中國家為發生率排名第三的癌症(Jemal *et al*, 2009)。根據統計資料顯示口腔癌於2002年全世界人口之發生率為274,000例，約佔所有癌症病例的2.5%(Jemal *et al*, 2009)。於台灣行政院衛生署統計資料，口腔癌的發生率和死亡率，在男性佔第四位，於全人口則佔第六位，口腔癌之病因主要和嚼檳榔、吸菸和喝酒有關，台灣約有200萬以上人口有嚼檳榔之習慣，約80%之口腔癌死亡病例和嚼檳榔習慣有關。雖然口腔癌可用手術切除、化學治療和放射線治療，或合併上述三種方法中任二者或三者加以治療，於台灣，口腔癌患者的存活率仍然很低。根據高雄醫學大學陳玉昆醫師等人之統計，第一期口腔癌患者之五年存活率為72%，第二期口腔癌患者之五年存活率為39%，第三期口腔癌患者之五年存活率為27%，第四期口腔癌患者之五年存活率為12%。因此尋找治療法有潛力成為對抗口腔癌的化療輔佐藥劑，期待可幫助降低口腔癌的復發率與增加病人存活率。

2. 光動力療法

光動力治療(Photodynamic therapy)為新穎的癌症治療方式。光動力療法最主要的二個原素為光和光感物質(Dolmans *et al*, 2003)。施行此種療法時，患者通常先需服用一種光感物質製劑，讓腫瘤細胞吸收此種光感物質後，再以特殊波長的光，照射腫瘤細胞，加以激發及殺死腫瘤細胞。當腫瘤組織中的光感物質以特殊波長的光加以激發時，光會將其能量轉移至氧分子，導致形成活性氧物質，此活性氧物質即可將腫瘤細胞直接殺死，或可破壞腫瘤中的血管系統，形成血栓，造成腫瘤細胞壞死(Dolmans *et al*, 2003)。也有學者認為光動力治療，可以激發人體的免疫系統，以進一步殺死腫瘤細胞。5-氨基酮戊(5-aminolevulinic acid, ALA)為新研發的第二代光感藥物(photosensitizer)。ALA光動力治療可以成功的用於診斷及治療人體的癌症或癌前病變。根據過去學者之研究，利用ALA之光動力治療，可用於治療食道癌、膀胱癌，皮膚癌和口腔癌(Chen *et al*, 2004; Dolmans *et al*, 2003; Fan *et al*, 1996; Lin *et al*, 2010; Yu *et al*, 2008; Yu *et al*, 2009)。ALA本身並非光感物質，它是光感物質原紫質IX(protoporphyrin IX, PpIX)之前驅物質。通常全身性服用或局部塗抹ALA後，經過1.5至6個小時後，ALA會被代謝成PpIX，PpIX於腫瘤或變異上皮細胞中的濃度，通常會高於正常上皮細胞中的濃度，即可利用此種特性，以施行ALA媒介之光動力治療。ALA於服用後48小時內，可以被身體代謝清除乾淨，因此使用ALA之光動力治療，較無皮膚光過敏之問題存在。局部塗抹ALA相關的光感物質製劑，利用ALA之光動力治療是一種非侵入性的療法，它可以重複使用，而不會有累積的毒性，治療後外觀不會有太大的改變及結疤，且組織中PpIX的含量可以用螢光光譜偵測，如此我們可以知道，何時組織中之PpIX含量達到最高濃度，那個時間就是最佳的照光治療時間點。根據過去學者之研究，局部塗抹的ALA可以被口腔癌和口腔癌前病變組織選擇性的吸收，臺灣大學江俊斌教授及本人研究發現，ALA之光動力治療可以使用於口腔癌和口腔癌前病變臨床治療，其療效都令人滿意(Chen *et al*, 2004; Lin *et al*, 2010; Yu *et al*, 2008; Yu *et al*, 2009)。最近臺灣大學郭彥彬教授研究團隊證實ALA-PDT會透過NF- κ B誘發口腔癌細胞株Ca9-22走向細胞凋亡(Chen *et al*, 2011)，臺灣大學婁培人教授亦發現ALA-PDT能口腔癌細胞株Ca9-22 *in vitro*細胞爬行能力(Yang *et al*, 2007)。由先前ALA-PDT於口腔癌之臨床及分子機轉研究更佳佐證了ALA-PDT於口腔

癌化療敏感性及癌源幹細胞特性之轉譯醫學研究可行性。

3. 癌源幹細胞

近年來有研究指出在癌症中有一亞群細胞具有幹細胞特性，也就是所謂的癌症幹細胞(cancer stem cells, CSC) (Rosen & Jordan, 2009)。癌症幹細胞被認為對腫瘤的起始、增生、轉移扮演相當重要的角色。因此又稱之癌症起源細胞(cancer initiating cells, CIC) (Gupta *et al*, 2009)，於是本研究計畫採用癌源幹細胞稱之。癌源幹細胞的定義為那些在腫瘤中具有自我更新能力(self-renewal)可以形成新的腫瘤的細胞，及維持腫瘤異質性(heterogeneity) (Visvader *et al*, 2008)。重要的是，癌源幹細胞的特性產生可解釋為何病人經過化學治療或放射線治療後，癌症會有復發的情形。惡性腫瘤來自幹細胞是 150 年前一位德國的病理學家Robert Virchow已有的一種假設，他觀察到胚胎與腫瘤組織上具有相似的情形，如細胞核質比例非常高(Huntly *et al*, 2005)。到目前有越來越多的證據支持癌源幹細胞腫瘤生成模式，指出在許多不同的癌症腫瘤中皆存在癌源幹細胞(Visvader *et al*, 2008)。癌源幹細胞首次直接證據來自血癌，John Dick 及實驗室成員們分離出具有造血幹細胞表面分子標誌 $CD34^+CD38^-$ 表現的急性骨髓血癌細胞，少數 $CD34^+CD38^-$ 血癌幹細胞可以在免疫不全的老鼠模式中引起血癌，但其他血癌細胞卻不行(Bonnet & Dick, 1997; Lapidot *et al*, 1994)。第一個發現有癌源幹細胞存在的固態腫瘤細胞為乳癌，史丹佛大學教授 Michael Clarke 實驗團隊，利用流式細胞儀分離出一小群具有腫瘤生成能力的 $CD44^+CD24^{-/low}$ 乳癌細胞，並將 100 顆 $CD44^+CD24^{-/low}$ 癌細胞注射於免疫不全小鼠中會形成腫瘤，但將幾萬顆的非 $CD44^+CD24^{-/low}$ 癌細胞打入小鼠中卻不會形成任何新的腫瘤 (Al-Hajj *et al*, 2003)。在腦瘤細胞中有一群細胞表面有神經幹細胞特有的表面分子標誌 $CD133$ ，發現約 100 顆 $CD133^+$ 癌源幹細胞就可以在老鼠的腦部形成腫瘤，但是 10^5 顆 $CD133^-$ 癌細胞在活體中卻無法形成腫瘤(Singh *et al*, 2004)。而口腔癌源幹細胞分離與鑑定可利用三種方式：一、將固態腫瘤細胞培養在不含血清並添加生長因子的培養液中會促使癌源幹細胞形成球體(spheres)的現象，能保持癌源幹細胞在未分化的狀態，分離出之癌源幹細胞球體會加強表現幹細胞之標記基因(Nanog, Oct-4, Nestin, $CD133$, 及 $CD117$)且具備高度致癌力(Chiou *et al*, 2008; Chen *et al*, 2011; Lo *et al*, 2011; Wu *et al*, 2010)。二、癌源幹細胞具有排出Hoechst 33342 染劑能力，將細胞染上Hoechst 33342 染劑後，經由流式細胞儀分析出少數不帶有染劑的細胞，這群細胞被稱為次族群 (Side population, SP) (Song *et al*, 2010)，或是利用幹細胞及癌源幹細胞較其他細胞具有較高的醛脫氫酶 (Aldehyde dehydrogenase) 活性，利用帶有螢光的醛脫氫酶受質作為測試，再利用流式細胞儀即可將具有醛脫氫酶活性的細胞分離出來細胞(Krishnamurthy S *et al*, 2010; Lo *et al*, 2011; Yu *et al*, 2011)。三、利用流式細胞儀 (flow cytometry) 辨識癌源幹細胞上特殊細胞表面標誌，將癌源幹細胞分選出，例如，利用 $CD133$ 或 $CD44$ 表面標誌分離出口腔癌源幹細胞(Damek-Poprawa *et al*, 2011; Prince *et al*, 2007; Yang *et al*, 2010)。口腔癌源幹細胞對口腔癌起始及化療阻抗性之角色已被驗證(Lo *et al*, 2011; Yu *et al*, 2011)，臨床病理意義上，口腔癌幹細胞標記表性與腫瘤惡性程度呈正相關性，可用來當做口腔癌患者存活率之預後標記(Chiou *et al*, 2008; Yang *et al*, 2010)。癌源幹細胞模式不只有在基礎癌症研究上具有重大的意義在臨床癌症治療也具有重要的意涵。經過化學性療法和放射性治療之後癌源幹細胞存活下來可能為造成癌症復發之主因(Baumann *et al*, 2008)。癌源幹細胞會表現較高ATP-binding cassette(ABC)家族膜蛋白(如P-glycoprotein MRP1、MRP2、及Bcrp1/ABCG2 (ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)，因此對傳統化學藥物產生高度阻抗性(Dean *et al*, 2005; Jordan *et al*, 2006)。因此針對癌源幹細胞的新穎標靶療法研發策略(Zhou *et al*, 2009)，將有助於口腔癌症病患對傳統化療藥物之不適，期待能提昇化療敏感性及病患存活率。

計畫目的

早期口腔癌的臨床治療方法為手術切除或放射治療，化療及化療與放射治療合併使用已被採用於治療

晚期及復發。雖然隨著醫療技術、診斷的進步，口腔癌似乎受到控制，但長期存活率最多也只能延長十年，而且預後很差，超過 50% 的病患在五年內死於此疾病或其併發症。推測造成此結果主要原因可能是腫瘤細胞具有異質性，以及傳統治療的目標或許不是主要產生腫瘤的癌細胞族群。藉由本三年之轉譯醫學研究計畫，我們欲觀察ALA光動力療法是否能成為傳統化療藥物(如cisplatin) 的輔佐藥物，預期能利用ALA光動力療法開發口腔癌幹細胞的新穎標靶療，提昇化學性療法敏感性，減輕口腔癌病患接受化療時的不適，改善治療期間的生活品質。

計畫重要性

本研究計畫係結合臨床與基礎人員共同來研究 ALA 光動力療法協同傳統化療藥物對口腔癌之治療潛力及新穎調控機轉，提供未來進一步於臨床治療口腔癌的思考方向，有助於基礎與臨床間的研究整合，開啟新的觀點及方向。

研究方法、進行步驟及執行進度

癌幹細胞球體培養

利用無血清幹細胞生長因子培養液自口腔癌細胞篩選並且培養瘤源幹細胞。無血清幹細胞生長因子培養液配方如下：DMEM/F-12 (Gibco)、bFGF 20 ng/ml、EGF 20 ng/ml、N2-supplement (R&D System, Minneapolis, MN)。先種 1×10^4 細胞於直徑 10 公分的低貼附細胞培養皿，隔天將培養液換成選擇性培養液，持續觀察一週，細胞由原本貼附在培養皿的狀態，漸漸聚集成許多細胞所構成的球體，這些球體在之後的實驗作為口腔癌源幹細胞 (oral cancer initiating stemness cells) 代表。

ALA 光動力療法作用

於直徑 6 公分的一般培養皿中分別種入 2×10^5 細胞，待細胞六分滿時，移除培養液，以 PBS 洗滌兩次，將培養液換成只包含 1% L-glutamine 和 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B 的 DMEM 培養液，且加入 1mM 5-ALA (sigma) 培養於溫度 37°C 含有 5% CO₂ 之培養箱 3 小時，3 小時之後於培養箱中取出細胞，將處理 1mM 5-ALA 的細胞照射波長 633-nm 的紅光 3 小時進行後續實驗。

細胞總量 RNA 萃取

細胞以胰蛋白酶 (trypsin) 處理使細胞懸浮後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘並吸去上清液，加入 1ml TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies)，混合後靜置 5 分鐘，之後加入 BCP (bromochloropropane) 100µl，上下搖晃使其混和均勻，靜置室溫 5 分鐘後以 12000 rpm (Eppendorf, F45-30-11) 在 4°C 離心 15 分鐘，吸取上層液體到新的離心小管，再加入異丙酮 (isopropanol) 混和均勻靜置 5 分鐘，於 4°C 12000 rpm (Eppendorf, F45-30-11) 離心 10 分鐘，去除上清液，並且以 75% 酒精 500µl 清洗沈澱於管底的 RNA，再於室溫 12000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉酒精且於抽風櫃中風乾 RNA，RNA 沉澱物乾後加入 20 µl diethylpyrocarbonate (DEPC) 處理過的水回溶，測量其 260 nm 吸光值並計算 RNA 濃度。

即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析

將 1 µg 之 RNA 反轉錄為互補去氧核糖核酸 (cDNA)，然後於 PRISM ABI7700 Sequence Detecting System (美國 Applied Biosystems 公司) 進行定量即時聚合酶鏈反應 (quantitative real-time transcriptional PCR) 實驗。

蛋白質製備

吸去培養液，以預冷 PBS 液(4°C)洗滌兩次，在預冷 PBS 液中(1 ml)，以細胞刮匙(rubber policeman)刮取所有細胞，置入塑膠試管中，以 15000 r.p.m 離心 2 分鐘，吸棄上清液，加入 100 µl 細胞溶解液(內含 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 10 ng/ml Leupeptin, 10 µg/ml Atroinin; 1 x TNE : 50

mM Tris-HCl, pH 8, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP 40), 於冰桶內作用 30 分鐘, 利用超音波震蕩器混合 10 分鐘, 分離上清液。加入 5 倍體積 protein sample buffer (內含 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 ml; β -mercaptoethanol, 0.4 ml; 10 % SDS, 1.6 ml; Glycerol, 0.8 ml; 0.05 % bromophenol blue, 0.2 ml; 加入 ddH₂O 至 8 ml), 再以 95°C 水浴加熱作用 5 分鐘, 待冷卻後即可用。

膠凝體電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

將玻璃以 70 % 酒精擦拭乾淨後, 架設 Bio-Rad mini-gel system 電泳裝置。配製 6 % 或 10 % separating gel 溶液 (以要觀察的蛋白質大小作為膠濃度依據), 注入玻璃片空隙, 加入 70 % 酒精壓平膠體, 待膠體凝固, 倒去酒精。配製 5 % stacking gel 溶液, 加於 separating gel 上層, 插入齒梳 (comb), 待其凝固後裝置於電泳槽, 加入含 10 % SDS 的 1 X running buffer。每格加入已用 6 X dye 染色的 15 μ g 蛋白質, 每樣本利用 RIPA 調整至相同體積, 進行電泳分析 (180 V, 1 hr)。

西方墨點法 (Western blot)

SDS-PAGE 完成後, 切除 stacking gel, 剪裁與膠片大小相當的 3 M 濾紙 2 張及 NC 紙 (nitrocellulose paper) 1 張, 將 NC 紙以一次水浸泡 15 秒, 依序以負極電板 → 網狀夾板 → 海綿組合, 以 transfer buffer 浸濕, 在依序擺上 3 M 濾紙 → 膠體 → NC 紙 → 3 M 濾紙 → 海綿 → 網狀夾板 → 正極電板, 組合於 blotting system (Bio-Rad) 中, 以電流 0.99 微安培、29 V 進行轉漬 (transfer) 1 小時。結束後將 NC 紙以 TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) 緩衝液泡製之 5 % 脫脂牛奶溶液於室溫搖晃進行 blocking 30 分鐘, 接著以 TBST 緩衝液清洗, 再加入含有適當濃度一級抗體與 5 % 脫脂牛奶溶液, 置於室溫反應兩小時或於 4°C 反應至隔天。以 TBST 緩衝液清洗, 再加入適當濃度二級抗體 (conjugated with horseradish peroxidase) 與 5 % 脫脂牛奶於室溫反應 1 小時, 再以 TBST 緩衝液清洗, 再以 ECL 呈色, 與 X 光片進行曝光顯像, 以 Image J 軟體分析該蛋白質表現。ECL-plus 用量為 0.1 ml/cm² (溶液 A: 溶液 B = 1:1)。

醛脫氫酶試驗 (Aldehyde dehydrogenase, ALDH assay)

細胞以 trypsin 處理後使細胞懸浮, 每個樣品取個樣品取 1×10^6 細胞, 以 PBS 清洗, 用 1000 rpm (Eppendorf, A-4-44) 離心 5 分鐘, 吸去上清液之後使用 ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies), 將細胞懸浮於 ALDEFLUOR Assay Buffer 1 ml, 加入 5 μ l 已活化的 ALDEFLUOR 受質 - BAAA (BODIPYTM-aminoacetaldehyde), 混合均勻後立即取 500 μ l 至另一管已經含有 5 μ l ALDH 抑制劑 diethylaminobenzaldehyde (DEAB) 的離心管中, 並混和均勻, 兩管避光於 37°C 水浴槽反應 30 分鐘, 用 assay buffer 清洗, 再用 1000 rpm (Eppendorf, A-4-44) 離心 5 分鐘並吸去上清液, 將細胞懸浮於 500 μ l assay buffer 後, 並通過 40- μ m 細胞過濾膜 (BD Falcon), 即可利用流式細胞儀 (BD, FACS Calibur) 進行分析。

軟瓊脂細胞群落生成試驗 (Soft agar colony formation assay)

將 agar 以 PBS 配製成 3 % 後, 放入微波爐加熱溶解, 以滅菌鍋或是置於沸水中隔水加熱 20 分鐘, 以達到滅菌效果, 趁凝固前分裝到 1.5 ml 離心小管。實驗前需稀釋製備上、下層 agar, 上層含有 0.3 % agar、15 % FBS 以及含 1 % P/S 的細胞培養液。下層 agar 則含有 0.5 % agar、15 % FBS 以及含 1 % P/S 的細胞培養液。操作步驟為先使用 6-well 培養盤製備下層 agar, 每 well 加入 1 ml, 倒入時應避免氣泡產生, 可放入培養箱待下層凝固後, 隔天再製備上層。將已製備完成的上層膠混合 10^4 細胞加入, 放回 37°C 細胞培養箱, 14 天後可觀察到細胞群落。每格加入 0.05% 結晶紫 (crystal violet) (Sigma-ALDRICH) 0.5 ml 染色 15 分鐘, 利用顯微鏡觀察細胞群落, 每個觀察五個視野, 平均值為細胞形成群落能力, 每次實驗各組皆做 3 重複。

細胞侵襲試驗 (Cell invasion assay)

實驗進行前先將轉移盤上層鋪上 MatrigelTM (BD Pharmingen, NJ, USA), 將每樣品取 10^5 細胞與不含血

清的培養液 100 μ l 加入轉移盤 (Transwell®, 8 μ m pore size, polycarbonate membrane, Corning® Costar) 之上層盤中，並於下層盤加入 750 μ l 含有 10 % FBS 的培養液，放入細胞培養箱培養。24 小時後，將轉移盤取出，並以 PBS 沾濕的棉花棒將上層盤內未移行的細胞清除，以 4 % paraformaldehyde 固定 10 分鐘，用 PBS 清洗 2 次，將上層盤的膜小心切下放於載玻片，再用 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) 染細胞核。以螢光顯微鏡 100 X 視野觀察，每個膜取 5 個視野，平均值為細胞相對侵襲能力，每次實驗各組皆做 3 重複。

結果

1. ALA-PDT effectively eliminates ALDH1 activity in OSCC cells

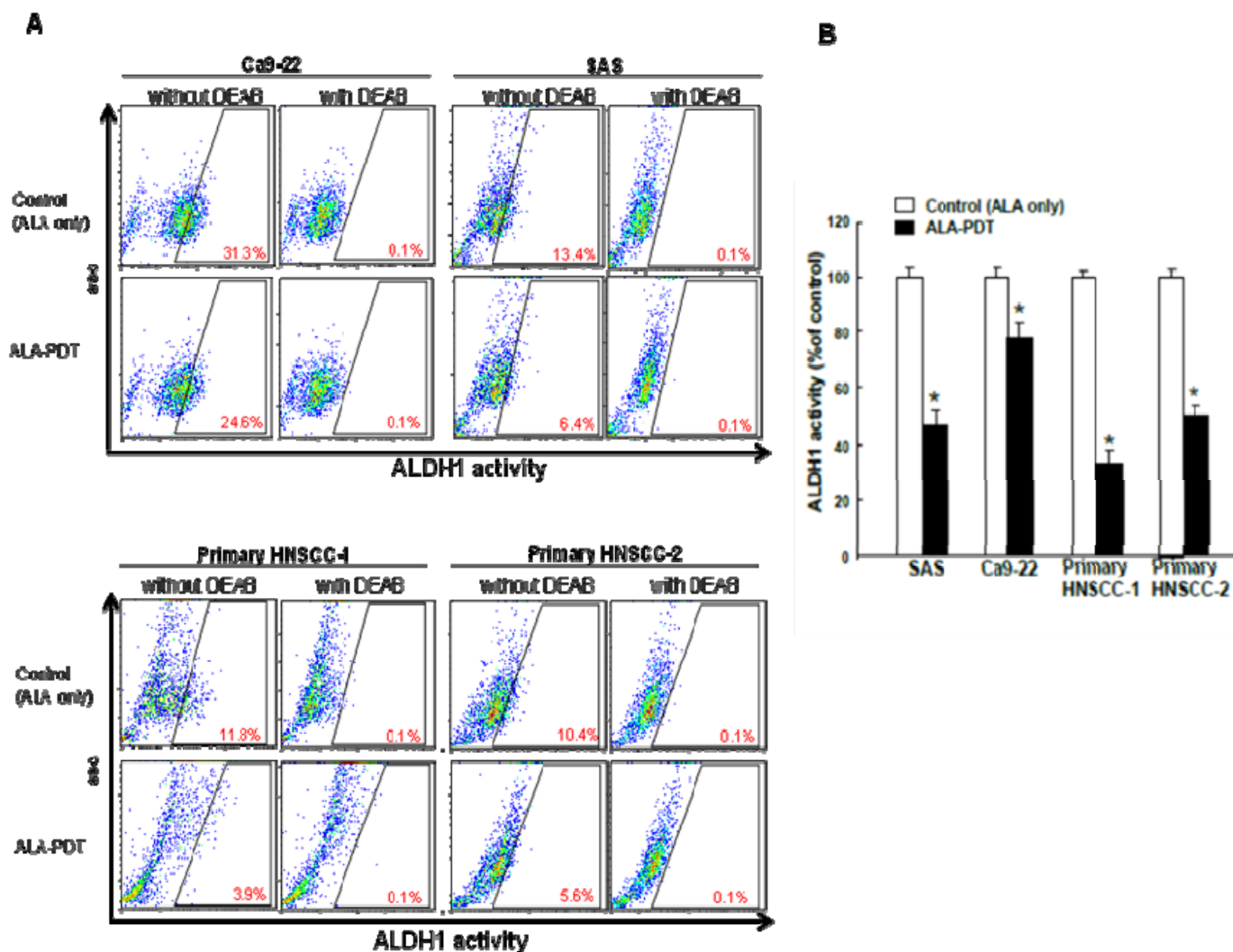


Figure 1. Effects of aminolevulinic acid based photodynamic therapy (ALA-PDT) on ALDH1 activity in OSCC cell lines and primary OSCC cells

(A) OSCC cell lines (SAS and Ca9-22) and primary OSCC cells (OSCC -1 and OSCC-2) were seeded as 1×10^6 cells/well in 6-well-plate and then pretreated 1 mM ALA for 3 hr followed by PDT with red light at a dose of 4 J/cm² or ALA only treatment control group. ALDH⁺ cells were determined by Alderfluor assay and viable cells (7-AAD negative) were used for analysis. DEAB-treated cells were used as negative control. (B) The quantification results were shown in bar graph. The experiments were repeated three times and representative results were shown. Results are presented as means \pm SD *, $p < 0.05$.

2. Inhibition of self-renewal capacity in OSCC under ALA-PDT treatment

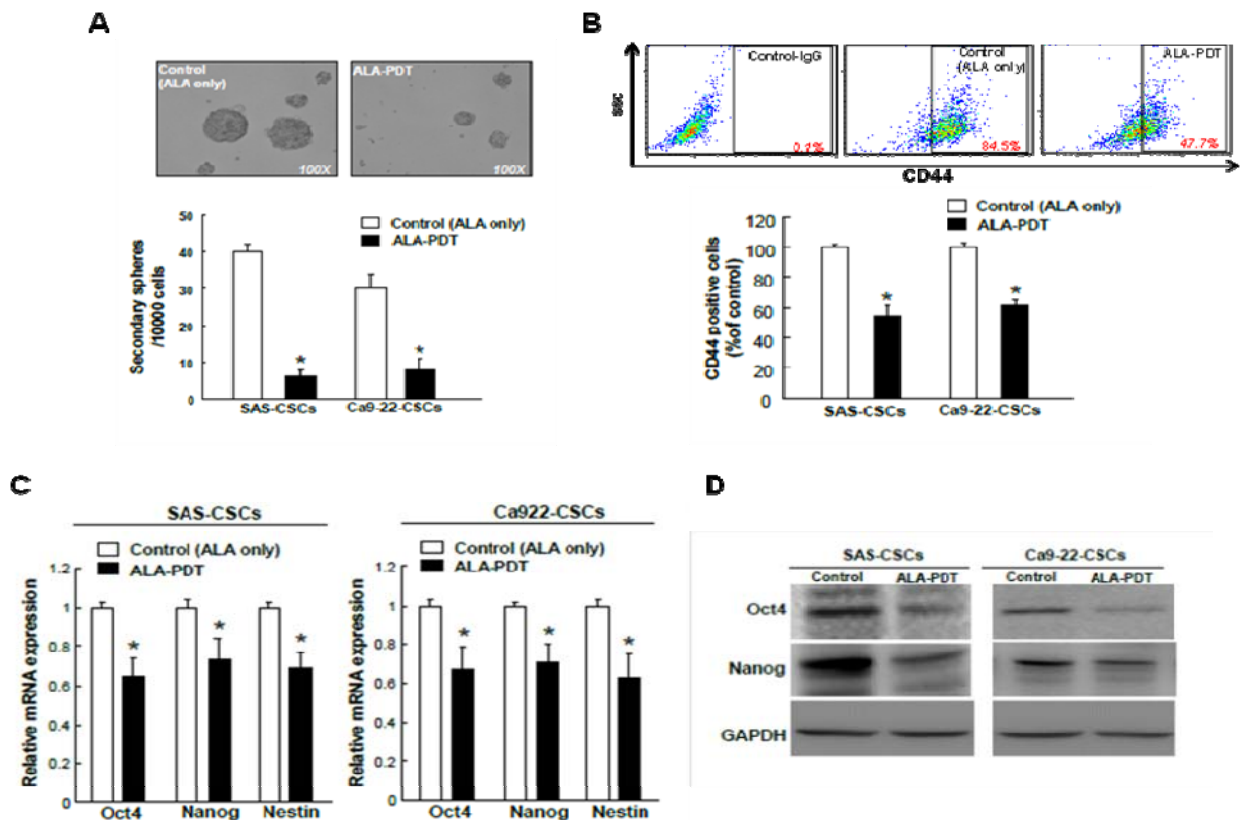


Figure 2. ALA-PDT suppressed secondary sphere-forming capability, CD44 activity, and stemness marker expression in OSCC-CSCs

(A) For self-renewal analysis, single cell suspension was obtained from primary OSCC -CSCs spheres by accutase digestion and secondary sphere formation capacity was determined with primary sphere culture procedure except the plating cell density as 10000 cells/ml. (B) The expression of CD44 positivity of control and ALA-PDT-treated HNC-CSCs was determined by flow cytometry analysis. Data shown here are the mean \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ vs. Control. SAS or Ca9-22-derived OSCC-CSCs treated with control or ALA-PDT and analyzed transcripts and protein level of Oct-4, Nanog, and Nestin by real-time RT-PCR (C) and immunoblotting analysis (D), respectively. *, $p < 0.05$ vs. Control.

3. ALA-PDT treatment delivery enhances the efficacy of chemotherapy in OSCC-CSCs

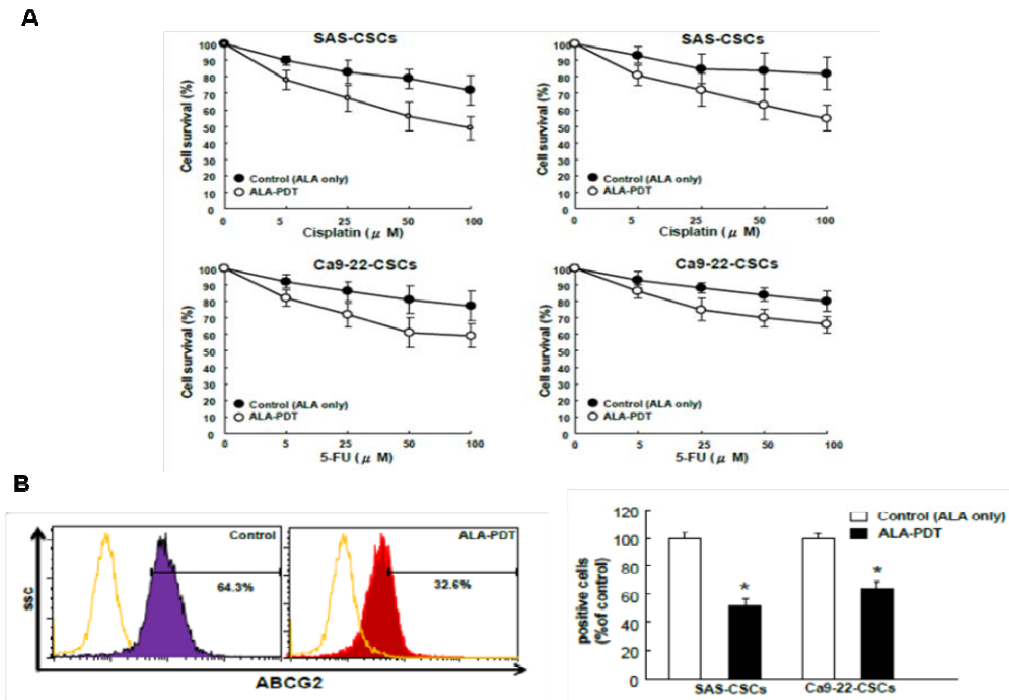


Figure 3. ALA-PDT treatment enhances the efficacy of chemotherapy

(A) OSCC -CSCs with ALA-PDT or control treatment were subjected to treatment with different concentrations of cisplatin or 5-FU. Cell viability was determined by MTT assay. (B) Flow cytometry analysis of the expression level of drug-resistant marker ABCG2 expression in the OSCC-CSCs as indicated.

4. ALA-PDT treatment abrogated invasiveness tumorigenicity of OSCC-CSCs

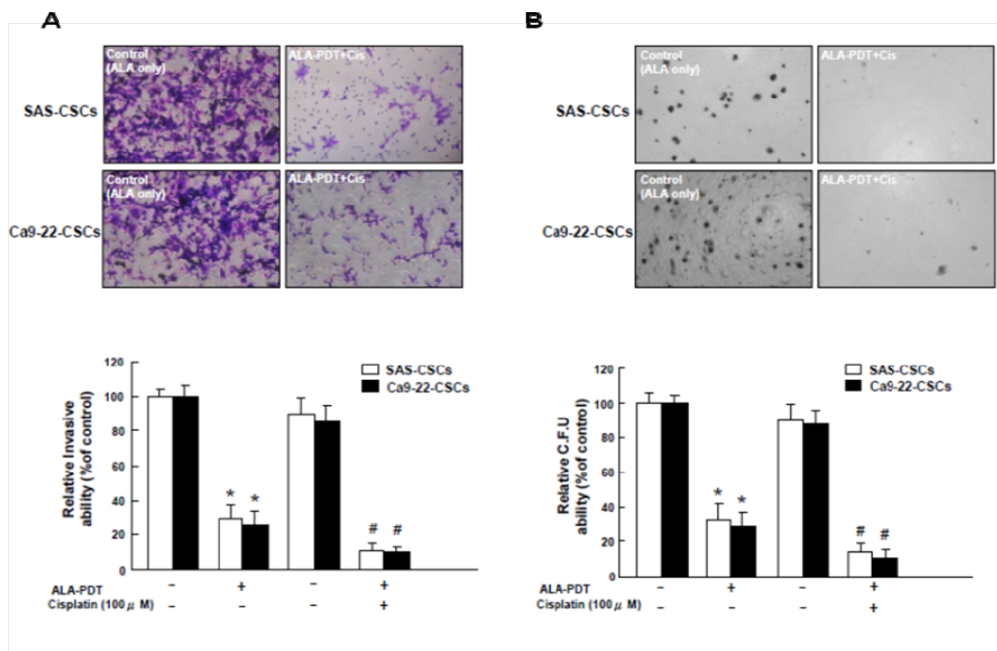


Figure 4. Reduced oncogenic properties in OSCC-CSCs by ALA-PDT combined with cisplatin treatment

(A) Invasion ability and (B) colony-forming ability in OSCC-CSCs was assessed synergistically treated with ALA-PDT combined with cisplatin chemotherapy. *, $p < 0.05$ ALA-PDT vs. Control; #, $p < 0.05$ ALA-PDT + Cisplatin vs. ALA-PDT alone.

重要參考文獻

1. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
2. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):545-54
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3(7):730-7.
4. Chen HM, Chen CT, Yang H, Kuo MY, Kuo YS, Lan WH, Wang YP, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Oral Oncol*. 2004;40(6):630-7.
5. Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF- κ B/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(6):483-9
6. Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, Lo JF. CD133/Src Axis Mediates Tumor Initiating Property and Epithelial-Mesenchymal Transition of Head and Neck Cancer. *PLoS One*. 2011;6(11):e28053.
7. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF. Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-Like Cells and High Grade Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4085-95.
8. Damek-Poprawa M, Volgina A, Korostoff J, Sollecito TP, Brose MS, O'Malley BW Jr, Akintoye SO, DiRienzo JM. Targeted inhibition of CD133+ cells in oral cancer cell lines. *J Dent Res*. 2011;90(5):638-45.
9. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews* 2005;5(4):275-84.
10. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):380-7.
11. Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi G, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer*. 1996 1;78(7):1374-83.
12. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med*. 2009; 15(9):1010-2.
13. Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature reviews* 2005;5(4):311-21.
14. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
15. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006;355(12):1253-61.
16. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, Wicha MS, Nör JE. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010;70(23):9969-78.
17. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-8.
18. Lin HP, Chen HM, Yu CH, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Topical photodynamic therapy is very

- effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythroleukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(8):624-30.
19. Lo JF, Yu CC, Chiou SH, Huang CY, Jan CI, Lin SC, Liu CJ, Hu WY, Yu YH. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. *Cancer Res.* 2011;71(5):1912-23.
 20. Lo WL, Yu CC, Chiou GY, Chen YW, Huang PI, Chien CS, Tseng LM, Chu PY, Lu KH, Chang KW, Kao SY, Chiou SH. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J Pathol.* 2011;223(4):482-95
 21. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):973-8.
 22. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* 2009;324(5935):1670-3.
 23. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401
 24. Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One.* 2010;5(7):e11456.
 25. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8(10):755-68.
 26. Wu MJ, Jan CI, Tsay YG, Yu YH, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Chen YS, Lo JF, Yu CC. Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Mol Cancer.* 2010;9:283.
 27. Yang TH, Chen CT, Wang CP, Lou PJ. Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncol.* 2007;43(4):358-65
 28. Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, Huang CH, Kao SY, Tzeng CH, Tai SK, Chang SY, Lee OK, Wu KJ. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 2010;12(10):982-92
 29. Yu CC, Chen YW, Chiou GY, Tsai LL, Huang PI, Chang CY, Tseng LM, Chiou SH, Yen SH, Chou MY, Chu PY, Lo WL. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. *Oral Oncol.* 2011;47(3):202-10.
 30. Yu CC, Lo WL, Chen YW, Huang PI, Hsu HS, Tseng LM, Hung SC, Kao SY, Chang CJ, Chiou SH. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *J Oncol.* 2011; 609259
 31. Yu CH, Lin HP, Chen HM, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Comparison of clinical outcomes of oral erythroleukoplakia treated with photodynamic therapy using either light-emitting diode or laser light. *Lasers Surg Med.* 2009;41(9):628-33.
 32. Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. *Oral Oncol.* 2008;44(6):595-600.
 33. Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(10):806-23

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/25

國科會補助計畫	計畫名稱: 5-氨基酮戊酸 (ALA)光動力療法於癌源幹細胞特性、化療敏感性、及作為輔助性口腔癌新穎治療法之轉譯醫學研究
	計畫主持人: 余權航
	計畫編號: 101-2314-B-040-016- 學門領域: 牙醫學
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：余權航		計畫編號：101-2314-B-040-016-					
計畫名稱：5-胺基酮戊酸 (ALA)光動力療法於癌源幹細胞特性、化療敏感性、及作為輔助性口腔癌新穎治療法之轉譯醫學研究							
成果項目		量化			單位	備註 (質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數 (被接受或已發表)	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

於第 34 屆 APDC 亞太牙醫大會發表論文

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>榮獲【第 34 屆 APDC 亞太牙醫大會】Travel Award</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究強調基礎研究與臨床應用接軌的重要性，提期待能證實 ALA 光動力治療法有潛力成為對抗口腔癌的化療輔佐藥劑，提供未來個人化醫療之應用。