

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	箸方 美帆
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目 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 <sup>high</sup> 細胞の抗癌剤抵抗性のメカニズムの解析			
論文審査担当者 主 査 教授 岡本 哲治 印 審査委員 教授 杉山 勝 審査委員 准教授 飛梅 圭			
〔論文審査の要旨〕  ヒト癌において自己複製能や多分化能などの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、幹細胞様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。そのため、今回、癌幹細胞マーカーとして CD44 の発現強度を用いて、頭頸部扁平上皮癌細胞から細胞集団を sorting し、抗癌剤抵抗性のメカニズムについて以下の解析を行った。  口腔扁平上皮癌組織を用いて CD44 および ESA(epithelial specific antigen)をマーカーとしてフローサイトメトリーを行った。正常組織と比較して、癌組織において CD44 <sup>high</sup> 細胞は高い割合を認めた。また、高分化型の扁平上皮癌組織では CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>high</sup> 細胞の割合が多く、低分化～中分化型の扁平上皮癌組織では CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>high</sup> 細胞の割合は減少し、CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>low</sup> 細胞の割合が高い傾向を示した。さらに、リンパ節転移例では原発巣癌組織に CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>low</sup> 細胞の占める割合がより高い傾向を示したことから、CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>low</sup> 細胞は癌の組織学的悪性度および転移に関与している可能性が示唆された。  頭頸部扁平上皮癌細胞株 HTB41, LUC4, HSC2 を用いてフローサイトメトリーを行い、通常培養時における CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>low</sup> 細胞, CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>high</sup> 細胞, CD44 <sup>low</sup> 細胞集団の出現を確認した。各集団を sorting 直後に培養を行った結果、CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>low</sup> 細胞は培養ディッシュ上で線維芽細胞様形態を示し、CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>high</sup> 細胞は上皮様形態を示した。実際、CD44 <sup>high</sup> ESA <sup>low</sup> 細胞は間葉形質として Vimentin, Snail の高発現や遊走能を特異的に保有していた。  作用機序の異なる抗癌剤 Cisplatin, Docetaxel, 5-FU, Anti-EGFR monoclonal 抗体に対			

する各集団の感受性を検討し、CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞が各抗癌剤のターゲットに特異的な逃避経路を有することを証明した。

CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞はすべての抗癌剤に対して、最も高いアポトーシス抵抗性を示したが、抗癌剤抵抗性により生存したCD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞を継続培養したところ CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>表現型が CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>に変化し、ESA 表現型のバリエーションを再構築したことから、CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞はクローナルに癌の再発巣や転移巣を形成したとしても ESA 発現強度のバリエーションを築くことが示唆された。

申請者らは先行研究にて、PGE<sub>2</sub>により誘導される NR4A2(nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2)が癌細胞における抗癌剤抵抗性に関与していることを見出し、報告してきた。実際、PGE<sub>2</sub>添加により CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>細胞の 5-FU 感受性は有意に減弱し、PGE<sub>2</sub>受容体のインヒビターにより有意に増加した。また、NR4A2 ノックダウンは、PGE<sub>2</sub>存在下でのアポトーシス抑制因子 Bcl-2 発現を抑制する一方、アポトーシス促進因子 Bax 発現を増強した。この結果より、CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>細胞のアポトーシス抵抗性に外的 PGE<sub>2</sub>供給が関与することが示唆された。

培養腫瘍細胞株においても CD44, ESA の発現の表現型はバリエーションを示し、集団を形成した。申請者は、これら集団間において最も強い抗癌剤抵抗性を示した CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>集団が抗癌剤感受性を示す CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>集団の抗癌剤感受性に液性因子を介し影響があると予測したため、GFP 遺伝子導入で継続培養可能な CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞を標識し、sorting 直後の CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞と CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>細胞を混在させて、5-FU 感受性を測定したところ GFP 陰性細胞はアポトーシス抵抗性を獲得した。PGE<sub>2</sub> レセプター阻害剤は GFP 陰性細胞のアポトーシス抵抗性の獲得を抑制し、CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>細胞のアポトーシス抵抗性に CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>集団からの PGE<sub>2</sub>供給が関与することが示唆された。

一方 CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>細胞集団に PGE<sub>2</sub>を単独添加し経時変化を検討したところ、CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞の出現を認め、ESA<sup>low</sup>表現型への可塑性を介した抗癌剤抵抗性の経路の存在も示唆された。

近年、抗癌剤抵抗性をもつ癌細胞に対して GSK3β 阻害剤が分化誘導を介して感受性を改善することが報告されている。5-FU 抵抗性を示す CD44<sup>high</sup>ESA<sup>low</sup>細胞において、GSK3β 阻害剤を併用したところ、CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>表現型への変換とともにアポトーシス抵抗性の減弱を認めた。さらに CD44<sup>high</sup>ESA<sup>high</sup>細胞においても、GSK3β 阻害剤処理は CD44<sup>high</sup>集団から、より 5-FU に感受性を示す CD44<sup>low</sup>細胞出現を誘導した。

以上の結果から、本論文は、今後の頭頸部扁平上皮癌における化学療法において、表現型の可塑性を有する CD44<sup>high</sup>細胞をターゲットとすることが重要であると考えられ、アポトーシス抵抗性を減弱させることを目的とした分化誘導療法が有効である可能性が示唆される、と結論づけた。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。