

論文内容要旨

EMT型口腔扁平上皮癌細胞における 癌幹細胞特性の解析

主指導教員：菅井 基行教授
(基礎生命科学部門 細菌学)

副指導教員：津賀 一弘教授
(応用生命科学部門 先端歯科補綴学)

副指導教員：武知 正晃准教授
(応用生命科学部門 口腔外科学)

植月 亮

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) は、上皮性器官形成や創傷治癒において上皮系細胞が可逆性に間葉様細胞に転換する生理的プログラムであり、癌細胞は浸潤・転移過程においてこの可逆性プログラムを利用する。申請者が所属する研究室では、口腔扁平上皮癌細胞における転写因子 Snail の可逆的 EMT 誘導能を介した局所浸潤の分子機構を明らかにしてきた。近年、癌原発巣に少数存在する癌幹細胞の、二次腫瘍形成や治療抵抗性への寄与が想定されている。EMT は直接的に局所浸潤を制御するが、脈管内移動を経て二次腫瘍形成する過程においては癌幹細胞の特性を併せ持つと考えられている。しかし、癌細胞集団からそのような特性がどのように出現・消失するのか、未だ全貌が明かされていないため、癌の予後向上や治療戦略の改善にとって大きな研究課題となっている。

そこで、申請者は上記の命題に対し、EMT 型口腔扁平上皮癌細胞株の幹性を解析することで、以下の結果により解答を得た。

1. 重層上皮幹細胞特性は癌幹細胞特性と類似性を示すため、まず、舌癌細胞株 OM-1 における重層上皮幹細胞特性を解析した。OM-1 は接着培養皿での低密度培養において約 25% の細胞がコロニーを形成し、単一細胞からのクローナル増殖を示した。形成したコロニーには、蛍光免疫細胞染色法において細胞膜に局在する重層上皮幹細胞マーカー p75 タンパク陽性細胞、基底細胞マーカーサイトケラチン (CK) 14 陽性細胞、最終分化マーカー CK13 陽性細胞が観察され、重層上皮細胞系統を形成する重層上皮幹細胞特性を示した。
2. OM-1 は *in vitro* 三次元培養法においてコラーゲン層の上に重層上皮類似構造を形成した。
3. 上皮幹細胞増殖培地 (FAD 培地) における浮遊培養 OM-1 は幹性の指標となるスフィア形成能を示し、また、形成された腫瘍スフィアを構成する細胞には p75 の発現が確認できた。
4. OM-1 細胞が形質として示した重層上皮幹細胞特性とスフィア形成能は、p75 シグナルインヒビター処理で阻害された。
5. 接着培養 OM-1 からフローサイトメトリーで p75 陰性細胞集団をソーティングしたところ、重層上皮細胞系統とスフィア形成能は共に抑制されていた。しかし、この p75 陰性細胞集団を継代培養すると p75 陽性細胞が再出現し、重層上皮幹細胞特性およびスフィア形成能を示した。
6. 転写因子 Snail 導入 EMT 表現型 OM-1 (OM-1_Snail) において、p75 の mRNA 発現と細胞膜局在は抑制されており、低密度培養コロニーでも CK13 陽性細胞は出現しなかった。
7. OM-1_Snail は足場非依存性増殖能の亢進を示し、*in vitro* 三次元培養法においてコラーゲ

ン層へのびまん性細胞浸潤像を示したにもかかわらず、上皮幹細胞増殖培地を用いた浮遊培養で OM-1 が示したスフィア形成能は失われていた。

8. OM-1_Snail には神経幹細胞マーカーNestin 陽性細胞が見られた。そこで、神経幹細胞増殖培地においてスフィア形成能をテストしたが、腫瘍スフィアは形成されなかった。
9. 造血幹細胞増殖培地での浮遊培養 OM-1 は、癌幹細胞マーカーCD133 の mRNA 発現が誘導された。同時に内因性 Snail および多能性幹細胞マーカーOct4 の mRNA 発現上昇を示したが、免疫細胞染色において Snail および Oct4 は共に核内に局在せず、機能的細胞内部位ではなかった。また、細胞単位において Snail と Oct4 の発現は相反的である傾向が見られた。
10. 造血幹細胞増殖培地で誘導された OM-1 の CD133 と Oct4 の発現は、神経幹細胞増殖培地に移し替えることで消失した。
11. OM-1_Snail は造血幹細胞増殖培地においても CD133 と Oct4 の発現は誘導されなかった。

以上の結果から、舌癌細胞株 OM-1 は p75 シグナル依存的な重層上皮幹細胞特性とスフィア形成能を可逆的に示すことが判明した。また、EMT 誘導性転写因子 Snail は両者を不能とし、神経幹細胞マーカーNestin の発現を付与するが、神経幹細胞増殖培地におけるスフィア形成能は付与しなかった。さらに、造血幹細胞増殖培地では OM-1 細胞集団の内在性 Snail を誘導することができ、同時に多能性幹細胞マーカーOct4 と癌幹細胞マーカーCD133 を誘導したが、スフィア形成能で評価される幹性は示さなかった。重要なのは、集団中の個々の細胞が Snail と Oct4 を共発現するものではなく、単発現していても機能的細胞内部位には局在せず、細胞個々では発現が同調していなかった。

したがって、一つの OM-1 細胞が Snail 依存的 EMT 形質を示した場合、その細胞は幹細胞と等価ではないと結論した。