

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	NGUYEN QUANG TAM
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Establishment and characterization of radiation resistant strains from squamous cell carcinoma cell lines in serum-free defined culture （無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞株からの放射線耐性細胞の樹立とその機能解析）			
論文審査担当者 主査 教授 柿本 直也 印 審査委員 教授 杉山 勝 審査委員 准教授 虎谷 茂昭			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>口腔扁平上皮癌（OSCC）を含む扁平上皮癌（SCC）は、世界で増加しており、特に betel-quid や areca-nut を嚙む習慣を有する東南アジア諸国では最も発症頻度の高い癌である。近年、癌は増殖能の高い細胞集団やある程度分化および成熟をした細胞集団など複数の細胞集団からなり、これらは少数の癌幹細胞（CSC）から派生していると考えられている。したがって、癌の治癒は、CSC 集団が排除された場合にのみ達成可能であると考えられている。</p> <p>OSCC を含む多くの癌に対して、外科的療法、放射線療法や化学療法が主として行われている。中でも放射線療法（RT）は OSCC の治療において主要な役割を果たしている。しかしながら、一部の腫瘍では治療中に放射線耐性示し、また治療後、臨床的に Complete response 症例であっても再発する症例が見られる。高線量率放射線（HDR）を用いた RT は種々の癌に対して有効な癌治療法として広く使用されている。また、低線量率放射線（LDR）による RT は、前立腺癌や口腔癌の治療に導入されている。したがって、HDR や LDR を用いた放射線療法における癌細胞の放射線耐性機構を解明することは、放射線耐性を克服する有効な治療法を開発するために重要である。</p> <p>これまでに、放射線耐性癌細胞の樹立については報告されているが、これら放射線耐性（RR）細胞は血清添加培地を用いて、HDR 照射系で分離されている。血清添加培地は未知あるいは既知の蛋白因子、増殖因子、脂質などを多く含むため、血清のロットによっても細胞応答が異なり、また、癌細胞自身が産生する種々の因子を明らかにすることはできない。一方、無血清培地は、基礎栄養培地に成分の明らかな増殖因子、ホルモン、輸送蛋白のみを含むため、細胞の正確な生物学的特性や細胞由来因子を再現性良く明らかにすることができる。</p> <p>本研究では、OSCC を含む SCC における RT に対する耐性機序を解明するために、無血清培養系で SCC および OSCC 細胞株から HDR および LDR の 2 種類の放射線照射系を用いて RR-SCC 株を単離し、その細胞・分子生物学的特性を明らかにし、さらにこれら細胞を用いて放射線耐性に関与する遺伝子群を明らかにした。</p> <p><u>方法</u></p> <p>外陰部 SCC 由来 A431 および OSCC 由来 NA（HO-1-N-1）を使用した。無血清培地として DF6F（ダルベッコ変法イーグル培地および Ham-F12 培地の 1：1 混合物に、インスリン（10 µg/ml）、トランスフェリン（5 µg/ml）、2-アミノエタノール（10 µM）、亜セレン酸ナトリウム（10 nM）、2-メルカプトエタノール（10 µM）、および fatty acid-free bovine serum albumin（FAF-BSA）と結合させたオレイン酸（9.4 µg/ml）を加えた無血清培地）を用いた。</p> <p>各細胞を、低線量率（LDR）システム（RM1000、中外テクノス、日本）を用いて 2.2Gy/日で毎週 4 日間、また、高線量率（HDR）システム（Gamma cell 40 Exactor、Best Theratronics、カナダ）を用いて 5Gy/5.75min で週 2 回照射し、各システムにより全線量 60Gy 照射した後、A431-HDR、A431-LDR、NA-HDR、NA-LDR 細胞を単離した。これらの細胞の放射線耐性は colony survival assay(CSA)で以下の方法で検討した。野生型（WT）細胞お</p>			

よび RR 細胞に 0Gy、2Gy、4Gy、6Gy および 8Gy の線量を照射し、培養 14 日後コロニーをギムザ染色し、コロニー数を計測し、生存率を 37%まで減ずるのに必要な線量  $D_{37}$  値を算出した。さらに、これら RR 細胞の特性を明らかにするために、単層培養系における増殖能、浮遊培養系における sphere 形成能および Boyden-chamber 法を用いた細胞運動能を無血清培養系で検討した。各細胞を 24 ウェルプレートに  $10^4$  細胞/well/ml で播種後培養し、Coulter counter にて毎日細胞数を計測した。sphere 形成は、 $10^3$  細胞/dish(35mm 低接着性皿)に播種し、5 日間培養後に sphere 数を測定した。細胞運動能は、I 型コラーゲンコートした Boyden-chamber に  $5 \times 10^4$  細胞/well の細胞密度で DF 培地に 0.1%BSA を添加した培養条件で 24 時間培養後、メンブランをギムザ染色しメンブラン下面に移動した細胞数/mm<sup>2</sup> を算出した。CD133 陽性細胞の比率はフローサイトメーターを用いて検討し、多能性幹細胞マーカー *Nanog*、*Oct4* および *Sox2* の発現を RT-qPCR で検討した。さらに、各細胞のヌードマウス (BALB/c-nu/nu) 背側皮下における造腫瘍性を検討した。WT と比較して RR 細胞で高発現する遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析で明らかにし、さらにこれら遺伝子および蛋白の発現を RT-qPCR、western blot およびヌードマウス腫瘍の免疫組織化学染色で検討した。また、これら遺伝子の発現を siRNA で抑制した RR 細胞、あるいはこれら遺伝子を強制発現した WT 細胞の放射線感受性、多能性幹細胞マーカー発現、単層培養系での増殖能、sphere 形成能を検討し、以下のことが明らかとなった。

#### 結果

1. LDR および HDR システムで無血清培養系を用いて A431-WT および NA-WT 細胞から、それぞれ A431-LDR、A431-HDR、NA-LDR および NA-HDR を樹立した。A431-WT、A431-LDR、A431-HDR、NA-WT、NA-LDR および NA-HDR の  $D_{37}$  値はそれぞれ 2.3Gy、5Gy、3.7Gy、4.6Gy、7.5Gy および 5.5Gy で、本研究で樹立した細胞は放射線耐性であることが明らかとなった。
2. RR 細胞は WT 細胞と比較して、CD133 癌幹細胞マーカーを高発現し、さらに高い sphere 形成能、細胞運動能およびヌードマウスでの造腫瘍性を示した。
3. LDR 細胞は HDR 細胞よりも高い放射線耐性を示し、*Nanog* の高発現、および高い細胞運動能および造腫瘍性を示した。
4. DNA マイクロアレイおよび RT-qPCR 解析の結果、RR 細胞では WT 細胞と比較して *IGF2* および *krt13* が高発現していた。
5. A431-LDR-siNC、A431-HDR-siNC、A431-LDR-siIGF2 および A431-HDR-siIGF2 の  $D_{37}$  値は、それぞれ 5.5Gy、5.9Gy、3.8Gy および 3.2Gy で、*IGF2* 発現抑制により A431-RR 細胞は放射線感受性となった。同様に、NA-LDR-siNC、NA-HDR-siNC、NA-LDR-siIGF2 および NA-HDR-siIGF2 の  $D_{37}$  は、それぞれ 5.5Gy、5.6Gy、3.8Gy および 4.5Gy となり、NA-RR 細胞は放射線感受性を示した。
6. A431-LDR-siNC、A431-HDR-siNC、A431-LDR-si*krt13* および A431-HDR-si*krt13* の  $D_{37}$  値はそれぞれ 5.5Gy、5Gy、2.8Gy、1.9Gy で、*krt13* 遺伝子の発現を siRNA で抑制した A431-RR 細胞は高い放射線感受性を示した。
7. A431-LDR における *IGF2* の発現抑制は *krt13*、*Nanog* および *Oct4* の発現を低下させた。
8. *Krt13* 過剰発現 WT-A431 細胞の増殖能、sphere 形成能、細胞運動能は亢進し、*IGF2*、*Nanog* および *Oct4* の発現上昇を示した。

以上の結果から、放射線耐性 SCC 細胞は *IGF2* や *krt13* などの遺伝子を過剰発現させることでその耐性形質を発現・維持するとともに、癌幹細胞集団比率の上昇、運動能や造腫瘍性の亢進により、放射線療法後の癌再発をもたらしている可能性が考えられた。また、無血清培養系を用いた HDR および LDR による放射線耐性癌細胞モデルは、口腔がんの放射線耐性機構を解明する強力なツールとなり、さらには、放射線治療効果の予測や、より効果的な放射線治療法の開発に貢献するものと考えられた。

本論文は、口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。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。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	NGUYEN QUANG TAM
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Establishment and characterization of radiation resistant strains from squamous cell carcinoma cell lines in serum-free defined culture (無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞株からの放射線耐性細胞の樹立とその機能解析)			
最終試験担当者			
主査	教授	柿本 直也	印
審査委員	教授	杉山 勝	
審査委員	准教授	虎谷 茂昭	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年12月20日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年8月3日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 High dose rate (HDR)および low dose rate (LDR)システムでの <i>in vitro</i> での放射線照射と臨床での放射線治療との関連性について</li> <li>2 HDR および LDR システムを用いて無血清培養系で放射線耐性細胞を分離した意義について</li> <li>3 <i>Krt13</i> および <i>IGF2</i> 遺伝子以外に DNA マイクロアレイ解析で発現変動があった遺伝子群について</li> <li>4 これまでに報告されている放射線耐性細胞と今回分離した耐性細胞との相違について</li> <li>5 幹細胞マーカーおよび未分化幹細胞マーカー陽性細胞と放射線耐性細胞との関連性について</li> <li>6 放射線耐性細胞の抗がん剤感受性について</li> <li>7 <math>D_{37}</math> 値の生物学的意義について</li> <li>8 放射線耐性細胞の単層培養系での増殖能、浮遊培養系での sphere 形成能とヌードマウス背部皮下での造腫瘍性の相違について</li> <li>9 今回明らかにした IGF2 および <i>krt13</i> の臨床応用の可能性について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			