

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 | 内迫 香織 |
| 学位授与の条件   | 学位規則第4条第①・2項該当 |    |       |
| 論文題目<br>無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞の放射線耐性獲得機構の細胞内分泌学的解明とその機能解析  |                |    |       |
| 論文審査担当者   |                |    |       |
| 主査  | 教授 杉山 勝        | 印  |       |
| 審査委員  | 教授 栗原 英見       |    |       |
| 審査委員  | 准教授 虎谷 茂昭      |    |       |
| <p>【目的】</p> <p>癌組織は多様な細胞集団から構成されており、その中に存在する特定の細胞集団である癌幹細胞(CSC)だけが、腫瘍形成能、維持機能を持っていると考えられている。CSC は、治療抵抗性で再発・転移の要因と考えられていることから、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。一方、癌治療に対して通常行われる手術療法、放射線療法、化学療法に加え、近年、抗 Programmed Death-1(PD-1)抗体などの免疫チェックポイント阻害薬を用いた免疫療法が脚光を浴びており、本邦でも頭頸部癌に対して保険適応された。しかしながら、PD-1 の ligand である Programmed Death Ligand-1(PD-L1)が癌細胞上で高発現する症例は、免疫逃避を示すことから従来の治療に抵抗性を示すことが問題になっている。著者の所属する研究室の先行研究で、無血清培養系を用いて種々の扁平上皮癌(SCC)細胞株より分離した放射線耐性 SCC 細胞は、癌幹細胞の特徴である sphere 形成能や癌幹細胞マーカーの発現が高いことを明らかにした。また、放射線治療の効果は、照射による直接効果だけでなく、癌微小環境での免疫細胞動態により左右されることが近年明らかにされつつある。しかしながら、癌細胞の放射線耐性獲得機構や免疫逃避機構には未だ不明な点が多い。</p> <p>一方、exosome は細胞から分泌される 100nm 前後の vesicle で、細胞間コミュニケーションの媒介役を担っていることが明らかになりつつある。従来、細胞増殖因子などの蛋白因子、ホルモンや脂質が regulatory chemical messenger(RCM)として正常あるいは癌細胞の autocrine あるいは paracrine 因子として重要な機能を担っていることが明らかにされてきたが、近年、exosome も RCM として重要な役割を果たしていると考えられてきている。</p> <p>本研究では、扁平上皮癌の放射線耐性の獲得機構及び免疫逃避機構の解明を目的として、以下の研究を行なった。</p> |                |    |       |
| <p>【方法】</p> <p>細胞株として、外陰部由来扁平上皮癌細胞株 A431 及び同細胞に low dose radiation system (LDR)及び high dose radiation system(HDR)で total 60Gy 照射後分離した耐性株、LDR-A431 及び HDR-A431 を用いた。さらに、A431 細胞に HDR で 2Gy 及び 8Gy 照射後の細胞(IR-A431)を用いた。無血清培地はダルベッコ変法イーグル培地及び Ham-F12 培地を 1:1 に混合した基礎栄養培地 DF に、インスリン、トランスフェリン、2-アミノエタノール、亜セレン酸ナトリウム、2-メルカプトエタノール及びオレイン酸 (fatty acid-free bovine serum albumin(FAF-BSA)と結合)を加えた DF6F を用いた。WT、LDR、HDR、IR-A431 における PD-L1 遺伝子及び蛋白の発現を、RT-qPCR 及び FACS を用いて検討し、RAS/MAP シグナル関連蛋白 ERK、CREB、p 38 のリン酸化をウェスタンブロッティング法及び Bio-Plex system を用いて解析した。放射線耐性細胞の細胞障害性リンパ球に対する抵抗性を明らかにするため、健常人由来末梢血より IL-2 を添加した無血清培地で誘導した lymphokine-activated killer(LAK)細胞の、WT及び LDR-A431 細胞に対する細胞障害能を<sup>51</sup>Cr遊離試験法で検討した。</p>  |                |    |       |

さらに、LDR-、HDR-A431 において高発現している IGF2 の機能を明らかにするため、DF6F からインスリンを除いた DF5F 培地を用いて、WT-、LDR-及び HDR-A431 の増殖能、運動能、及び PD-L1 発現に及ぼす IGF2 の影響を、細胞増殖試験、boyden chamber 法及び RT-qPCR で検討した。

また、LDR-、HDR-及び IR-A431 が培養上清中に分泌する exosome を沈降法で精製し、ウェスタンブロッティング及び粒子計を用いてその特性を評価した。さらに、各 exosome の WT-A431 細胞の増殖能、放射線感受性、PD-L1 遺伝子及び蛋白の発現に及ぼす影響を、増殖試験、放射線感受性試験、RT-qPCR 及びウェスタンブロッティングで検討した。放射線感受性試験は各 exosome を処理した WT-A431 に、放射線を 0、2、4、6、8Gy 照射した後、照射量に応じてそれぞれ 300、400、800、1200、1600 個の細胞を dish に播種し、さらに exosome を添加した培地で 10 日間培養し、コロニー形成率を算出した。

#### 【結果】

1. LDR-A431 は WT と比較して IGF2 及び PD-L1 を恒常的に高発現していた。また、IR-A431(2Gy、8Gy) においてもこれら発現は線量依存的に上昇していた。
2. LDR-、HDR-A431 では ERK、CREB、p 38 蛋白のリン酸化が亢進していた。
3. LDR-A431 及び WT-A431 に対する LAK 細胞の細胞障害試験の結果、LDR-A431 は LAK 細胞に対して有意に耐性を示した。
4. WT-A431 の増殖は IGF2 に依存していたが、LDR-A431 の増殖は IGF2 に依存せず、IGF2 非存在下あるいは存在下でも同等の高い増殖能を示した。
5. IGF2 は WT-A431 における PD-L1 遺伝子及び蛋白発現を促進した。
6. 沈降法で精製した exosome は、表面にテトラスパニンファミリー(CD9)を発現し、粒子計にてサイズが 100~150nm であることが示された。
7. LDR-、HDR-、及び IR-A431 由来 exosome は、WT-A431 の細胞増殖能を有意に低下させた。さらに LDR-、HDR-A431 由来 exosome は WT-A431 の放射線耐性能を誘導した。
8. LDR-A431 及び IR-A431 由来 exosome は WT-A431 における PD-L1、及び IGF2 遺伝子発現を上昇させた。さらに IGF2 は、WT-A431 における PD-L1 遺伝子及び蛋白発現を上昇させた。

#### 【考察】

放射線耐性細胞株 LDR-A431 が過剰発現する IGF2 は、同細胞の自己増殖促進因子として働いていることが明らかとなった。また、IGF2 や LDR-、HDR-A431 由来 exosome は、野生型細胞の PD-L1 発現を上昇させ、さらに放射線耐性能も誘導したことから、生体における腫瘍微小環境において、がん幹細胞の性質を有する放射線耐性癌細胞から分泌される IGF2 や exosome などの RCM は、自己増殖促進因子として機能するのみならず放射線耐性能を誘導し、さらに免疫細胞などの間質細胞の機能を制御していることが強く示唆された。したがって、これら RCM を標的とした扁平上皮癌の診断及び治療への有用性が考えられた。

以上の結果から、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。

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 | 内迫 香織 |
| 学位授与の条件  | 学位規則第4条第①・2項該当 |    |       |
| 論文題目<br>無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞の放射線耐性獲得機構の細胞内分泌学的解明とその機能解析   |                |    |       |
| 最終試験担当者  |                |    |       |
| 主査   | 教授 杉山 勝        | 印  |       |
| 審査委員   | 教授 栗原 英見       |    |       |
| 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30年12月26日の第7回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月7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 Low dose radiation system (LDR)および High dose radiation system (HDR)と臨床での放射線治療との関連性について</li> <li>2 放射線耐性細胞の定義および D37 値について</li> <li>3 LDR-A431 細胞, HDR-A431 細胞および単回照射 A431 細胞の特徴について</li> <li>4 放射線治療後の再発と放射線耐性との関連性について</li> <li>5 癌幹細胞について</li> <li>6 癌幹細胞と放射線耐性細胞の特徴について</li> <li>7 Exosome の特徴と精製法について</li> <li>8 放射線耐性細胞株および単回照射細胞由来 exosome により野生株に放射線耐性能が誘導される機構について</li> <li>9 放射線治療の bystander 効果と abscopal 効果について</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> |                |    |       |