

## 論文内容要旨

論文題目 口腔扁平上皮癌細胞における Aldehyde Dehydrogenase 1(ALDH1)の発現と癌幹細胞形質との関係

学位申請者 清野 紗矢香

癌幹細胞は、自己複製能と分化能を持つことにより、腫瘍の再発や転移に深く関与すると考えられている。CD44 は頭頸部扁平上皮癌においても、癌幹細胞マーカーとして有効である。また、近年、GSK3 $\beta$  が癌幹細胞マーカーとして着目されている。ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) は、癌幹細胞で高い活性を示すことが知られており、その発現が高い癌組織を有した症例は予後不良であることが報告されている。しかしながら、口腔扁平上皮癌における ALDH1 の発現および機能については、未だ十分な検討がなされていない。

今回、口腔扁平上皮癌における ALDH1 と癌幹細胞形質との関係を明らかにする目的で、口腔扁平上皮癌細胞および組織を用いて研究を行った。

口腔扁平上皮癌細胞株 OM-1, HOC621, ZA を用いて、CD44 陽性細胞の割合を FACS 解析したところ、通常培養時において、OM-1 が CD44 陽性細胞集団を常に高い比率で保有することが判明した。OM-1 の幹細胞性はスフィア形成により評価した結果明らかであり、さらにスフィアには ALDH1 酵素活性をもつ構成細胞が必ず存在した。

OM-1 細胞から CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞を sorting し、その性状を解析したところ、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>low</sup> 細胞では認められなかった幹細胞マーカー (sox2, oct4, nanog) 発現や高いスフィア形成能を示した。また、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞における上皮/間葉形質を検索したところ、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞の約 24%が、上皮形質マーカーESA 陰性を示した。また、invasion assay により、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞は高い浸潤能を持つことが明らかとなった。CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞の間葉系性質に上皮間葉形質転換のマスター因子 Snail の高発現が伴う一方、Snail 強制発現 OM-1 細胞では CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞集団が著しく増加したことから、Snail は CD44 高発現、ALDH1 活性誘導の両者も担うことが示唆された。

近年ヒト癌細胞においては、GSK3 $\beta$  キナーゼ活性が癌幹細胞形質に必要であり、癌幹細胞における重要なマーカーの一つと考えられている。CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞は CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>low</sup> 細胞と比較して高い GSK3 $\beta$  の蛋白発現を示した。また、GSK3 $\beta$  ノックダウン CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞は幹細胞マーカー遺伝子の発現減弱とスフィア形成能の低下を示した。ALDH1 の発現と活性の低下が伴ったため、GSK3 $\beta$  は CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞の癌幹細胞形質に ALDH1 自体の発現を制御して関与することが示唆された。このことは、CD44<sup>high</sup>/ALDH1<sup>high</sup>/GSK3 $\beta$ <sup>high</sup> 細胞における幹細胞マーカーOCT4 の特異的発現でも確認された。

一方申請者は、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>low</sup> 細胞が、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞と比較して著しい細胞増殖能を示すことを発見した。M 期の紡錘体形成に関わる RHAMM は CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>low</sup> 細

## 別紙様式 2

胞で高発現を示した。また CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>low</sup> 細胞は、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞と比較して、細胞増殖が速く、CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>low</sup> 細胞の増殖は、RHAMM のノックダウンにより抑制され、RHAMM の高発現がこの細胞集団の特徴である増殖形質に関与することが明らかとなった。

口腔扁平上皮癌組織における ALDH1 mRNA の発現は、リンパ節転移例、STAGE III/IV の症例、組織学的分化度の中分化から低分化例で高い傾向を示した。また、免疫組織学的検索の結果、高分化型扁平上皮癌組織では、CD44 陽性の例を認めたが、ほとんどの症例で ALDH1 の発現は陰性であった。一方低分化型扁平上皮癌では、多くの症例で CD44 および ALDH1 の共陽性を示し、ALDH1 の発現と腫瘍の転移および組織学的分化度との関連性が示唆された。

本研究の結果から、従来クローナルと考えられていた口腔扁平上皮癌細胞においても、癌幹細胞形質を保有するサブポプレーションすなわち CD44<sup>high</sup>ALDH1<sup>high</sup> 細胞集団が存在し、ALDH1 は臨床的悪性形質に深く関与していることが示され、臨床病理学的に重要な因子の一つであると考えられた。