

論文内容要旨

A study of rBC2LCN as a novel cancer stem cell marker of oral squamous cell carcinoma cells

(口腔扁平上皮癌細胞の新たな癌幹細胞マーカーとしての糖鎖認識

レクチン rBC2LCN に関する研究)

主指導教員：岡本 哲治 教授

(応用生命科学部門 分子口腔医学顎顔面外科学)

副指導教員：高田 隆 教授

(基礎生命科学部門 口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：菅井 基行 教授

(基礎生命科学部門 細菌学)

副指導教員：奥田 敏統 教授

(総合科学研究科)

副指導教員：坂田 桐子 教授

(総合科学研究科)

中峠 洋隆

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

研究目的

口腔癌は全悪性腫瘍の5%程度を占め、早期では比較的予後良好であるが、転移や治療耐性を獲得した症例では生命予後は極めて不良である。また、口腔は咀嚼、摂食、嚥下など、ヒトのヒトたる基本的な機能を司る重要臓器であり、その機能低下あるいは喪失はQOLの著しい低下を引き起こす。口腔癌に対して、手術療法、放射線療法、化学療法、免疫療法や、これらを組み合わせた併用療法により、一定の治療効果を上げているものの、一次治療で臨床的に完全消失を認めた症例が、数ヶ月から数年後に再発することもよく経験する。近年、この原因として癌幹細胞の存在が考えられており、造腫瘍性、放射線耐性、転移巣形成能などにおいて重要な役割を担っていることが報告されており、癌幹細胞は治療の標的細胞として注目されている。一方、口腔癌における癌幹細胞マーカーはいまだ明らかにされていない。

そこで本研究では、口腔癌の診断・治療の標的分子としての新たな口腔癌幹細胞マーカーを明らかにすることを目指して、embryonic stem (ES)/induced pluripotent stem (iPS)細胞などの未分化な多能性幹細胞が細胞表面に発現する糖鎖構造を特異的に認識するリコンビナントレクチンである rBC2LCN の口腔癌幹細胞マーカーとしての可能性を細胞・分子生物学的に検討した。

研究方法

口腔癌細胞株として、当研究室で樹立され、細胞バンクに寄託している口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株 Ho-1-N-1 及び Ho-1-U-1 を用い、外陰部扁平上皮癌細胞(SCC)株として A431 を用いた。これら細胞は、DMEM 及び Ham F12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 基礎栄養培地に、insulin, transferrin, BSA-oleic acid, 2-mercaptoethanol 2-aminoethanol 及び sodium selenite の 6 因子を加えた DF6 無血清培地を用いて培養した。各細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性及び陰性細胞の比率は、フローサイトメトリーにて解析し、各細胞の分取はセルソーティング法にて行った。陽性及び陰性細胞の単層培養系での増殖能及び浮遊培養系での sphere 形成能を検討した。各細胞における網羅的遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法で解析し、陽性細胞で特異的に高発現している遺伝子・蛋白について機能解析を行うとともに、各細胞におけるリン酸化シグナルについても Bio-plex システムを用いて網羅的に検討した。また、各細胞が培養上清中に産生する exosome を精製し、その増殖能、sphere 形成能及び遺伝子発現に及ぼす影響についても検討した。

結果

各細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性細胞率は、いずれの細胞株においても約 1~2% であった。無血清浮遊培養系での sphere 形成試験において、rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性細胞群は陰性細胞群と比較して形成開始 3~5 日目において約 50% の sphere 数増加を示した。DNA マイクロアレイ解析の結果、rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性細胞群では、陰性細胞群と比較して Insulin growth factor(IGF)-2 遺伝子が約 60 倍高発現していることが明らかとなった。さらに、IGF-2 遺伝子発現を droplet digital PCR 法にて検討したところ、陽性細胞において約 20 倍の発現亢

進を認め、ウエスタンブロッティング法においても IGF-2 蛋白の発現が亢進していた。遺伝子組換え rIGF-2 及び IGF-2 中和抗体の、rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性及び陰性細胞群における sphere 形成能に及ぼす影響を検討したところ、IGF-2 は陰性細胞群の sphere 形成能を約 20% 促進した。また、IGF-2 中和抗体は、陰性細胞群の sphere 形成能には影響を示さなかったが、陽性細胞群の sphere 形成能を低下させた。Bio-plex システムを用いた網羅的シグナリング解析の結果、rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性細胞群ではインスリン応答性シグナルである Akt パスウェイ関連分子のリン酸化が亢進していた。さらに rBC2LCN 認識糖鎖発現陽性及び陰性細胞群の培養上清由来 exosome の各細胞における、sphere 形成能及び rBC2LCN 認識糖鎖発現を検討したところ、陽性細胞由来 exosome は陰性細胞の sphere 形成能及び rBC2LCN 発現を促進した。

考察

本研究の結果、ES/iPS 細胞などの未分化な多能性幹細胞が発現する糖鎖構造を特異的に認識するレクチンである rBC2LCN が、口腔扁平上皮癌細胞の新たな癌幹細胞マーカーである可能性が示された。また、細胞生存、分化、増殖、アポトーシスに重要な機能を果たしている IGF-2 や細胞外分泌小胞である exosome が、口腔癌細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現及び口腔癌幹細胞ニッチにおいて重要な機能を果たしていることが示唆されたことから、IGF-2 シグナル及び exosome を標的とした口腔癌の診断・治療法の有用性が考えられた。