

Identification and Characterization of Cancer Stem Cells in Human Squamous Cell Carcinoma Using Side Population Analysis

(Side population 法によるヒト扁平上皮癌がん幹細胞の同定及びその性質の検討)

2007 年 3 月修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生証番号 56502 厚海奈穂

指導教官 落合淳志教授

【序論】

がん幹細胞は、自己複製能及び不均等分裂能を有する細胞と定義され、その概念は正常組織の幹細胞と対応するものである。自己複製能ゆえに、がん細胞集団中に枯渇することなく維持されると共に、不均等分裂によって産み出された前駆細胞が増殖することによってがん細胞集団の増殖、進展を保っている。正常組織の幹細胞はニッチと呼ばれる微小環境によってその自己複製が調節されていることが腸管上皮幹細胞、造血幹細胞、毛包上皮細胞において報告されている。がん幹細胞においても同様に、その周囲微小環境を構成する細胞がニッチを形成して自己複製を調節していることが予想される。自己複製機構を破壊することが、がん細胞集団の根絶に寄与する可能性があるため、その機構の解明が望まれている。

ヒト扁平上皮癌は分化段階のそれぞれ異なるヘテロながん細胞集団から構成され、腫瘍胞巣を形成する。胞巣の辺縁部から中心に向かって分化が進んでおり、分化に伴って、細胞形態、分化マーカーや未分化マーカーの発現の変化が見られる。我々は、がん細胞集団の中でより未分化である辺縁細胞ががん幹細胞であると考え、このがん幹細胞の同定を試みた。

【結果および考察】

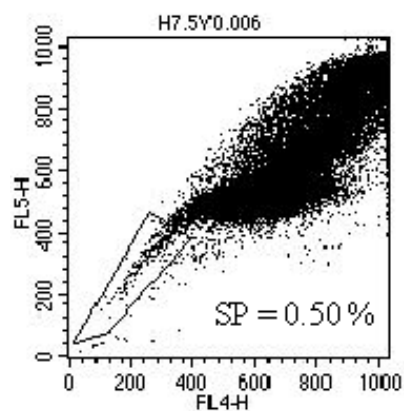
がん幹細胞を定義するにあたって生体内における腫瘍産生能を有する必要があることから、ヒト扁平上皮癌培養細胞株 A431 を免疫不全マウスの皮下に移植して腫瘍を産生するかどうかを調べ、A431 細胞が適切なモデルであるか否かを検討した。A431 移植腫瘍は免疫染色の結果、ヒト扁平上皮癌手術切除組織と同様の形態像および分化マーカー (Cytokeratin 1) や未分化マーカー (CD44) の発現様式を示した。このことから、A431 細胞がヒト腫瘍を再構築する能力を有するモデルとして適切であることが示唆された。また、我々ががん幹細胞であると仮定した辺縁細胞はインテグリン $\beta 1$ を選択的に発現していた。A431 培養細胞からがん幹細胞候補集団を分取する際の指標として、Side population (SP) を用いた。SP とは超生体染色色素である Hoechst 33342 排出能が高い集団であり、様々な組織の正常幹細胞およびがん幹細胞の特性としての報告がある。A431 細胞中の SP 細胞ががん幹細胞の定義である腫瘍産生能および腫瘍再構築能を有するかどうかを検討した。フローサイトメリーの結果、A431 細胞中に 0.5-4 % (Fig. 1) の SP 細胞の存在を認めた。分取した 1×10^5 個の SP 細胞および non-SP 細胞を免疫不全マウスにそれぞれ移植したところ、50 日目において SP 由来腫瘍のほうが non-SP 由来腫瘍より大きかった。また、 1×10^4 個を移植した際は SP 細胞は全例腫瘍を産生したのに対して、non-SP 細胞は腫瘍を産生しなかった (Fig. 2, n=3)。以上より、SP 細胞は non-SP 細胞より高い腫瘍産生能を示し、この集団にがん幹細胞が含まれている可能性が示唆された。さらに、分取した SP 細胞ががん幹細胞としての性質を有するかどうかを調べるために、*in vitro* における増殖能の検討を行っ

た。分取した SP 細胞は、非分取細胞や non-SP 細胞と比較して高い増殖能を示した。培養後の細胞中の SP 細胞の割合を測定したところ、7 日目に SP 細胞からは 4.38 % の SP 細胞および 95.62 % の non-SP 細胞が産生されており、SP 細胞が不均等分裂能を有することが示唆された。これらの腫瘍産生能および高い細胞増殖能、不均等分裂能から *in vitro* で培養した A431 細胞から分取した SP 細胞にはがん幹細胞が含まれることが示唆された。しかし、分取した non-SP 細胞も SP 細胞よりは低いながらも腫瘍産生能を有し、分取後の培養の結果、SP 細胞が検出されたため、がん幹細胞は SP 分画のみならず non-SP 分画にも含まれると考えられた。

A431 マウス移植腫瘍中からの SP 細胞の検出とその性質の検討を試みたところ、移植腫瘍中に 3.25 % の SP 細胞を認めた (Fig. 3)。胞巣辺縁に強く発現していたインテグリン $\beta 1$ 陽性の細胞と、この SP 細胞との関係を調べたところ、移植腫瘍中の SP 細胞のうち 0.86 % がインテグリン $\beta 1$ 陽性、99.13 % が陰性であり、*in vivo* において SP はインテグリン発現集団とは異なる集団であることが示された。また、*in vitro* で培養した A431 細胞における $\beta 1$ 他数種のインテグリンの発現が、移植腫瘍細胞中における発現と異なっていた。そのため、*in vitro* と *in vivo* における SP 細胞の性質が異なる可能性を疑い、SP 細胞のインテグリンの発現について両者の比較を行った。*In vitro* の A431 細胞中の SP 細胞の 99.4 % がインテグリン $\beta 1$ 陽性であったのに対し、*in vivo* の A431 移植腫瘍由来の SP 細胞ではわずかに 0.86 % がインテグリン $\beta 1$ 陽性であった。これらの結果から、異なる環境由来の SP 細胞は異なる表現型を示すことが示され、*in vitro* 由来の細胞と *in vivo* 由来の細胞とを区別する必要が考えられた。がん幹細胞が周囲の細胞から受ける自己複製調節機構の解明を目指してその同定を行っていくにあたり、周囲に間質が存在する移植腫瘍中からがん幹細胞候補集団を分取してきた方が、よりヒト生体内でがん幹細胞が受けられる影響を反映した細胞集団を分取することが可能になると思われる。今後は *in vivo* 由来の細胞中で SP、インテグリンの発現等のいずれかががん幹細胞マーカーになり得るかを検討すると共に、がん幹細胞—間質相互作用の検討を可能とする実験モデルの構築を目指したい。

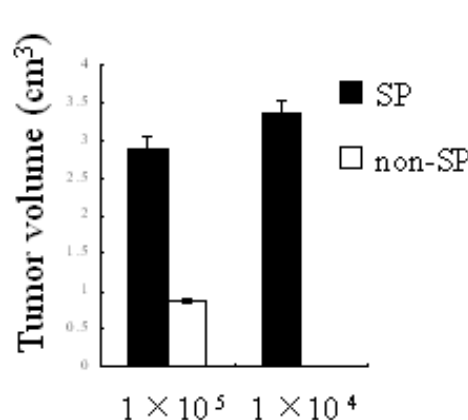
【キーワード】

がん幹細胞、Side population、扁平上皮癌、インテグリン $\beta 1$



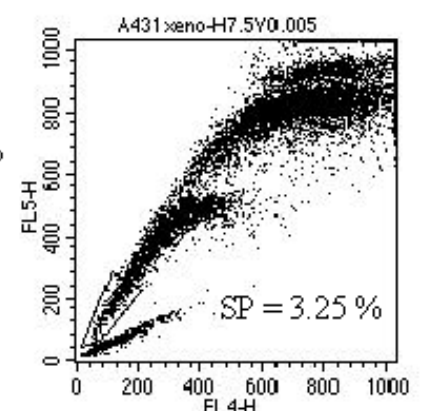
SP cells in cultured A431 cells

Fig. 1



Number of injected cells

Fig. 2



SP cells in A431 xenograft

Fig. 3