

## 論文の内容の要旨

論文題目 子宮頸癌に対する癌幹細胞の機能解析と癌幹細胞を標的とする  
治療の基礎的研究

氏名 藤本麻葉

### [序文]

癌組織には、自己複製能・多分化能を有する癌幹細胞が少数ながら存在しており、治療後に残存した癌幹細胞は、癌の再発、転移の原因の一つとされている。抗癌剤耐性の原因の一つとして癌幹細胞の存在が唱えられているが、その機序は明らかになっていない。

腫瘍内環境においては、不良タンパク質の蓄積などの内因性の小胞体ストレスに加え、低酸素や抗癌剤治療、放射線治療などの外因性の小胞体ストレスも存在している。細胞が小胞体ストレスを受けると、PERK 経路、IRE1 経路、ATF6 経路が活性化されて小胞体ストレス応答 (UPR) が働くが、強い小胞体ストレスが持続し UPR で処理しきれなくなった場合、細胞にはアポトーシスが誘導される。抗癌剤 cisplatin は、細胞に小胞体ストレスを与える事が知られている。癌細胞の小胞体ストレスに対する応答についての論文は散見されるが癌幹細胞に注目したものはなく、本研究では小胞体ストレスという観点から癌幹細胞の抗アポトーシスの機序について検討した。

### [目的]

本研究の目的は以下の通りである。

1. 頸癌細胞株から癌幹細胞様細胞を単離し、その特徴を解析すること。
2. 癌幹細胞様細胞の、小胞体ストレスによるアポトーシス感受性を検討すること。
3. 癌幹細胞様細胞と非癌幹細胞様細胞での、小胞体ストレスに対する細胞応答の違いを検討すること。
4. 小胞体ストレス誘導剤 (tunicmycin) と UPR 阻害剤との併用によって、癌幹細胞様細胞にアポトーシスが誘導されるかを検討すること。
5. 抗癌剤 (cisplatin) と UPR 阻害剤の併用が、癌幹細胞標的治療となりうるかを検討すること。

### [方法]

頸癌細胞株である SiHa 細胞、CaSki 細胞から sphere (球体) 形成能を用いて癌幹細胞様細胞を単離した。この sphere を構成している sphere 形成細胞と、通常の培養で得られる monolayer 細胞を比較する事で、癌幹細胞様細胞の特徴を評価した。flow cytometry でそれぞれの細胞の ALDH 活性、表面マーカー CD44、CD49f を評価し、sphere 形成細胞を癌幹細胞様細胞として扱う事が妥当であるかを検討した。また、各々から全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現を評価した。

癌幹細胞様細胞の小胞体ストレスに対する細胞応答を調べるため、一般的な小胞体ストレス誘導

剤である tunicamycin を両細胞由来の monolayer 細胞、sphere 形成細胞に添加し、PI/Annexin-V、cell cycle の flow cytometry によりアポトーシスを評価した。tunicamycin 誘導性小胞体ストレスによる UPR は、PERK 経路の下流である eIF2 $\alpha$  のリン酸化をウェスタンブロッティング法によるタンパク量解析で、IRE1 経路下流の XBP1 スプライシングの割合をリアルタイム PCR による遺伝子発現解析で評価し、小胞体ストレスによる UPR の代謝産物である CHOP、GRP78 の発現も確認した。また、tunicamycin に PERK 阻害剤、IRE1 阻害剤を添加する事でアポトーシスが誘導されるかを検討した。

DNA ダメージによるアポトーシスを除外するため、cisplatin は既報に基づき 20 $\mu$ M の低用量に設定し、同様にアポトーシスと UPR を検討した。また、cisplatin と PERK 阻害剤、IRE1 阻害剤の併用により誘導されるアポトーシスと、併用時の UPR について検討した。

#### [結果]

両細胞株由来 sphere 形成細胞の ALDH 活性を調べたところ、その多くは ALDH 活性陽性であり、CD44、CD49f も sphere 形成細胞において強陽性であった。マイクロアレイ解析では、SiHa 細胞由来 sphere 形成細胞では monolayer 細胞と比して SOX2、Oct-4、c-MYC の発現、CaSki 細胞では SOX2、NANOG、KLF4、c-MYC の発現が上昇していた。また、両細胞で共通して発現上昇している遺伝子には、癌幹細胞で発現上昇が報告されている MMP1、TM4SF1、NRP1、NT5E や、胚性幹細胞の多能性の維持に寄与していると考えられている HK2 があり、sphere 形成細胞が癌幹細胞様の性質を持っている事が示唆された。

次に、癌幹細胞の小胞体ストレスに対する細胞応答を検討した。

SiHa 細胞に tunicamycin を投与したところ、monolayer 細胞では PI 陰性/Annexin-V 陽性細胞、sub-G1 期の細胞が増加したのに対し、sphere 形成細胞ではアポトーシスが誘導されなかった。monolayer 細胞では tunicamycin 添加により IRE1 $\alpha$  の活性化の結果生じる XBP1 のスプライシングが増加しており、tunicamycin+IRE1 阻害剤の併用によって有意にアポトーシスが増加した。一方、sphere 形成細胞では PERK 経路の活性化の結果生じる eIF2 $\alpha$  のリン酸化が増加しており、tunicamycin+PERK 阻害剤の併用により sphere 形成細胞にも 15%程度のアポトーシスが誘導された。

続いて cisplatin に誘導される小胞体ストレスについて検討した。小胞体ストレスによるアポトーシスを検討するために設定した低用量の cisplatin では、SiHa 細胞由来 monolayer 細胞、sphere 形成細胞のいずれもアポトーシスを起こさなかった。cisplatin 投与では PERK 経路が活性化されないと報告があるが、本研究においても cisplatin 単独投与により PERK 経路はほとんど活性化されなかった。一方、IRE1 経路の活性化により生じる XBP1 のスプライシングは sphere 形成細胞においてのみ増加傾向にあり、cisplatin+IRE1 阻害剤の併用により sphere 形成細胞にアポトーシスが誘導され、小胞体ストレスの代謝産物である CHOP の発現も上昇していた。この時、eIF2 $\alpha$  のリン酸化の増加はわずかであった。

CaSki 細胞についても同様に tunicamycin、cisplatin 誘導性小胞体ストレスによるアポトーシスを検討した。

SiHa 細胞とは異なり、CaSki 細胞では tunicamycin 投与により monolayer 細胞のみならず sphere 形成細胞でもアポトーシスが誘導された。monolayer 細胞では tunicamycin 投与時に XBP1 のスプライシングが明らかに増加していたが、eIF2 $\alpha$  のリン酸化の増加は明らかではなかった。sphere 形成細胞も XBP1 のスプライシングは増加傾向にあったが、eIF2 $\alpha$  のリン酸化の増加は認めず、CaSki 細胞では monolayer 細胞においても sphere 形成細胞においても、IRE1 経路が優先的に活性化されていた。また、tunicamycin に UPR 阻害剤を併用したところ、monolayer 細胞、sphere 形成細胞共に tunicamycin+PERK 阻害剤、tunicamycin+IRE1 阻害剤の併用でアポトーシスは増加傾向にあった。CaSki 細胞では tunicamycin 投与なしの control の状態で monolayer 細胞と sphere 形成細胞で UPR に差があったが、tunicamycin 投与による UPR には明らかな差はなく、併用により誘導されるアポトーシスも両細胞で同様の傾向があった。

cisplatin による小胞体ストレスへの CaSki 細胞の細胞応答を検討したが、低用量の cisplatin では monolayer 細胞も sphere 形成細胞もアポトーシスは誘導されず、また、UPR 阻害剤を併用してもアポトーシスは誘導されなかった。

#### [考察]

本研究では、sphere を形成させる事で SiHa 細胞、CaSki 細胞から癌幹細胞様細胞を単離した。単離した sphere 形成細胞は表面マーカー、遺伝子発現から癌幹細胞の特徴を有している事が示唆された。

SiHa 細胞では癌幹細胞様細胞は非癌幹細胞よりも tunicamycin に対する感受性が低く、非癌幹細胞様細胞とは小胞体ストレスに対する細胞応答が異なっていた。非癌幹細胞様細胞では IRE1 経路が優先的に活性化されており IRE1 阻害剤の併用によって相乗的にアポトーシスが増加したが、癌幹細胞様細胞では PERK 経路が優先的に活性化されており、PERK 阻害剤の併用によってアポトーシスを誘導する事が可能であった。cisplatin による小胞体ストレスでは、IRE1 阻害剤の併用で癌幹細胞様細胞にアポトーシスが誘導され、CHOP が増加していた。一方、CaSki 細胞では癌幹細胞様細胞も tunicamycin 投与によりアポトーシスを起こし、tunicamycin 投与時の細胞応答に癌幹細胞様細胞と非癌幹細胞様細胞で大きな違いはなかった。cisplatin と UPR 阻害剤併用にも効果は認められなかった。DNA ダメージを起こさない範囲での cisplatin の増量や、両 UPR 阻害剤の同時添加によりアポトーシスが誘導される可能性があり、今後の研究課題である。

細胞株を用いた実験のみである事、癌幹細胞様細胞として扱っている sphere 形成細胞が腫瘍内環境における癌幹細胞を完全には再現できていない事は本研究の弱点である。また、臨床においても阻害剤が有効な症例、無効な症例がある事が予想され、バイオマーカーを含めた更なる検討が必要であるが、癌幹細胞の治療において小胞体ストレスに注目した報告はほとんどなく、新規性があると考えられる。

#### [結語]

抗癌剤と UPR 阻害剤の併用療法が新たな癌幹細胞治療となる可能性が示唆された。