

## 論文の内容の要旨

論文題目 Time-lapse imaging に基づくがん幹細胞の生物像の解明

氏名 宮下 知之

### 背景と目的

腫瘍組織は一見、均一ながん細胞から構成されている様に見えるが、実際には形態学的にも生物学的にも不均一ながん細胞から構成されていることが知られている。不均一ながん細胞の中で、がん幹細胞と呼ばれる亜集団は、転移や再発に深く関わっていると考えられている。我々は、扁平上皮癌においては、膜タンパク質である Podoplanin が陽性の細胞集団にがん幹細胞が濃縮されていることを明らかにしてきた (Atsumi N. 2008 BBRC)。

がんはその進展過程で、組織間質へ浸潤した後、血流やリンパ流を経て転移先の臓器に定着することで転移巣が形成される。脈管に侵入したがん細胞は、単細胞、もしくは少数の細胞からなる細胞塊の状態転移臓器に定着し、そこで増殖することにより転移巣を形成する。がん幹細胞は高い浸潤能を持ち、異所への高い生着能を持ち増殖することで転移巣を形成すると考えられている。

しかし、がん幹細胞が間質に浸潤していく過程や、単細胞/少数細胞の状態からどのようにして増殖していくのか、については未だ不明な点が多い。本研究では、がん幹細胞の特徴として、転移巣の形成能の高さおよび浸潤能の高さに着目した。がん幹細胞が非がん幹細胞と比較して少数の状態でもどのように増殖し腫瘍塊 (コロニー) を形成するのか、間質に対しどのように浸潤していくのかを time-lapse imaging を基に捉え、がん幹細胞の生物学的特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。

### 結果

1 コロニー形成過程におけるがん幹細胞の細胞運命の解明

1-1 がん幹細胞の単細胞レベルにおけるコロニー形成能

がん幹細胞が単細胞の状態でもどのように増殖するのかを視覚的に捉える為に、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)(Fig. 1) をヒト分化型扁平上皮癌細胞株 A431 に導入した (A431-Fucci 細胞)。A431-Fucci 細胞の

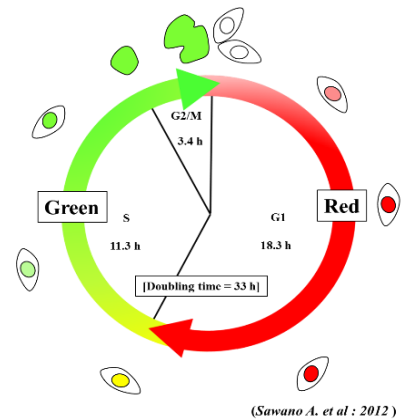


Fig. 1 Fucci 概要

Podoplanin 陽性細胞分画と陰性細胞分画をそれぞれ 384 well plate に単細胞播種し、1 時間ごとに 7 日間 time-lapse imaging を行った。得られた time-lapse imaging を基に、最終的な細胞数、細胞死、細胞周期の解析を行った。Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも 8 細胞以上からなるコロニーの形成頻度が高かった (Fig. 2)。単細胞からのコロニー形成過程において、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞ではその細胞周期には差が認められなかった (Fig. 3) が、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも細胞死をきたす頻度が低かった (Fig. 4)。これらの結果より、Podoplanin 陽性がん幹細胞は細胞死を回避し、高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

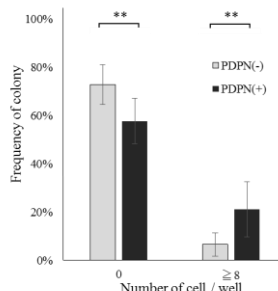


Fig. 2 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞のコロニー形成率

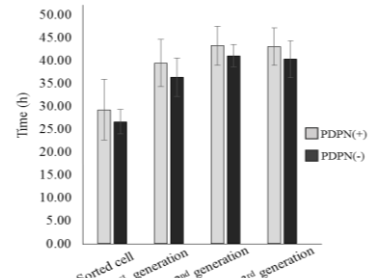


Fig. 3 細胞周期の長さ

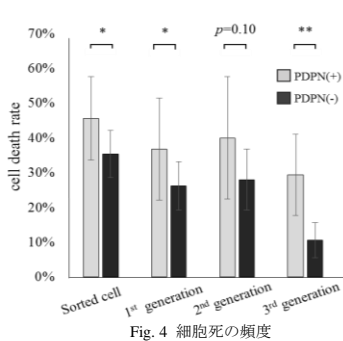


Fig. 4 細胞死の頻度

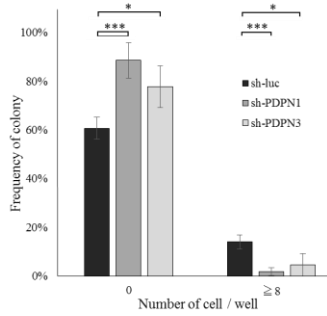


Fig. 5 sh-RNA 導入細胞のコロニー形成率

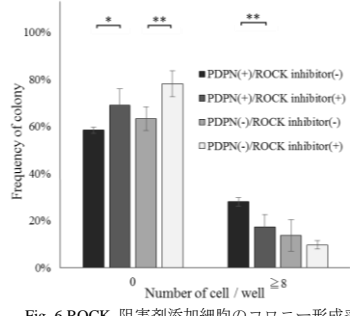


Fig. 6 ROCK 阻害剤添加細胞のコロニー形成率

## 1-2 がん幹細胞のコロニー形成における Podoplanin の機能の検討

単細胞レベルのコロニー形成における Podoplanin の機能を検討した。Sh-RNA を用いた Podoplanin のノックダウンにより A431-Fucci の単細胞レベルにおけるコロニー形成能は抑制された (Fig. 5)。Podoplanin はその下流に Rho-ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) シグナルの存在が知られている。そこで ROCK 阻害剤を用いて Podoplanin の下流シグナルの阻害を行うと、単細胞レベルにおけるコロニーの形成は阻害された (Fig. 6)。以上より、Podoplanin 陽性がん幹細胞は Podoplanin-ROCK シグナルを通じて単細胞レベルにおける高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

## 2 がん幹細胞の浸潤様式の解明

### 2-1 線維芽細胞依存的な癌細胞の浸潤

作製した A431-Fucci を用い、癌細胞単独群と、線維芽細胞と癌細胞の共培養群を作製し、collagen invasion assay を行った (Fig. 7)。12 時間ごとに 72 時間、time-lapse imaging を行い、浸潤細胞数、浸潤様式、細胞死、細胞周期の解析を行った。

線維芽細胞との共培養群では、単独群と比較して癌細胞の浸潤が促進されていた (Fig. 8)。また、線維芽細胞依存的な浸潤では、非依存的な浸潤と比較して、小数の細胞からなる腫瘍塊を形

成しながら浸潤することが明らかとなった。次に浸潤様式を大きく A) 非浸潤部から連続性の浸潤、B) 非連続性かつ6細胞以上からなる胞巣、C) 非連続性かつ5細胞以下からなる胞巣、に分類した (Fig. 9)。線維芽細胞依存的な浸潤では B), C) の浸潤様式が有意に多かった (Fig. 10)。

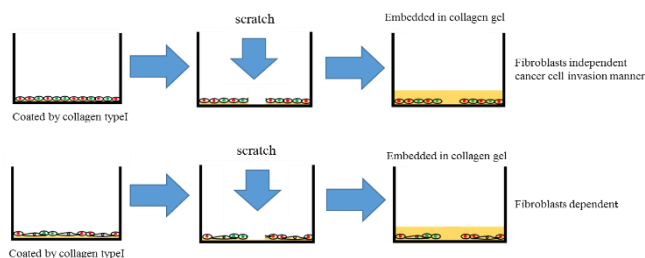


Fig. 7 collagen invasion assay 概要

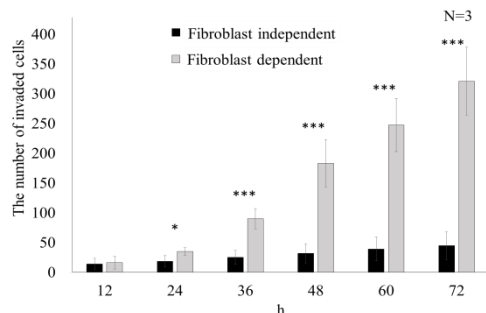


Fig. 8 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における浸潤癌細胞数

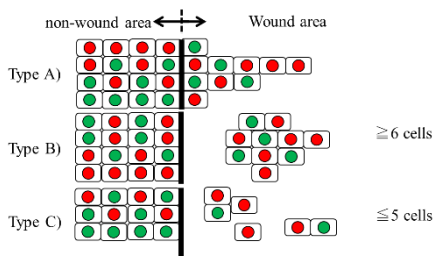


Fig. 9 癌細胞の浸潤様式

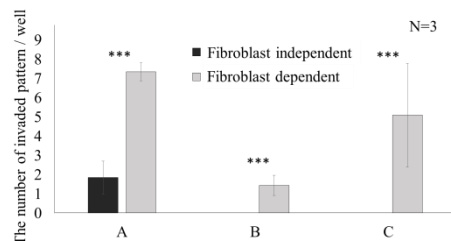


Fig. 10 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における各浸潤様式数

次に浸潤細胞の細胞死の頻度を算出した。細胞死の同定には caspase apoptosis assay kit を用い、caspase が活性化した細胞の核を抽出し、浸潤細胞あたりの細胞死を起こした細胞の数を apoptotic ratio として算出した。線維芽細胞依存的な浸潤と非依存的な浸潤における apoptotic ratio を比較すると、細胞死を起こす頻度に差が無いことが明らかとなった (Fig. 11)。

浸潤部における癌細胞の細胞周期について Fucci の蛍光を基に解析した。線維芽細胞非依存的な浸潤と比較して線維芽細胞依存的な浸潤では、増殖期の癌細胞の割合が高かった (Fig. 12)。このことから、線維芽細胞依存的な浸潤様式の特徴として 1) 少数の腫瘍塊を形成すること、2) 高い増殖能を伴う、ことが明らかとなった。

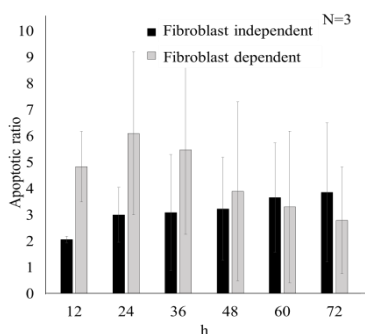


Fig. 11 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における細胞死の頻度

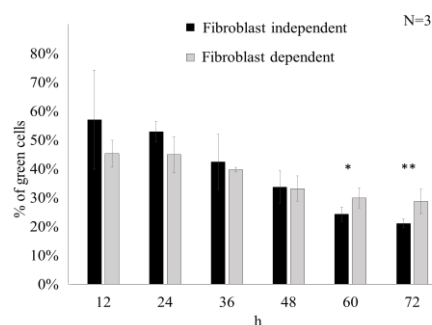


Fig. 12 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における増殖細胞割合

## 2-1 線維芽細胞依存的ながん幹細胞の浸潤

上記の結果を基に、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞における、線維芽細胞依存的、非依存的な浸潤において浸潤細胞数、浸潤様式、細胞周期の解析を行った。線維芽細胞非依存的な浸潤にお

いては、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に、浸潤癌細胞数に差は認められなかった (Fig. 13)。一方で線維芽細胞依存的な浸潤において Podoplanin 陽性細胞のほうで有意に浸潤数が促進されていた (Fig. 14)。そこで先述の様に癌細胞の浸潤様式を検討したところ、両者の浸潤様式に差は認められなかった (Fig. 15)。

次に、線維芽細胞依存的な浸潤における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期について検討を行ったところ両者に差を認めることは出来なかった (Fig. 16)。

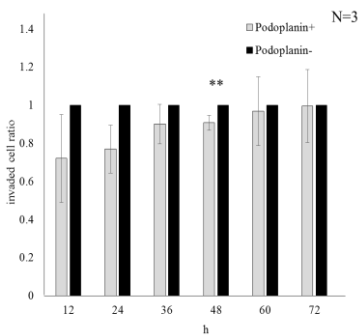


Fig. 13 線維芽細胞非依存的な Podoplanin

陽性細胞と陰性細胞の浸潤癌細胞数

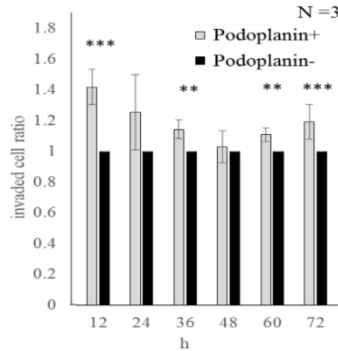


Fig. 14 線維芽細胞依存的な Podoplanin

陽性細胞と陰性細胞の浸潤癌細胞数

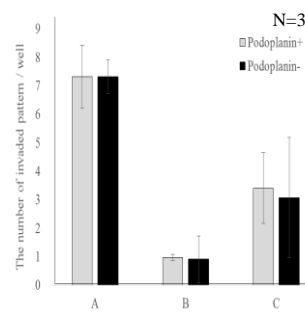


Fig. 15 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の

各浸潤様式数

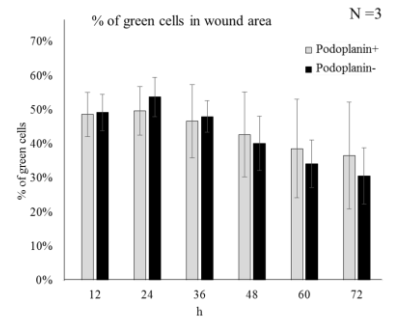


Fig. 16 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の浸潤癌細胞

の細胞周期

## 結論と展望

本研究では、time-lapse imaging を用い、単細胞レベルにおけるがん幹細胞のコロニー形成能と、間質に浸潤する際の生物像を明らかにした。単細胞レベルにおいて Podoplanin 陽性細胞は高いコロニー形成能を示し、陰性細胞と比較して細胞死をきたす頻度が低かった。さらに、がん幹細胞マーカーである Podoplanin をノックダウン、Podoplanin の下流シグナルの抑制を行うと単細胞レベルにおけるコロニー形成能は抑制されたことから、Podoplanin 陽性がん幹細胞は Podoplanin-ROCK シグナルを通じて細胞死を回避し、単細胞レベルにおける高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

がん細胞の組織間質への浸潤における特徴として、線維芽細胞依存的な様式と非依存的な様式が知られている。本検討では線維芽細胞非依存的な浸潤においては Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に浸潤数の差を認めることは出来なかった。しかし、線維芽細胞依存的な浸潤においては Podoplanin 陽性細胞は陰性細胞と比較して有意に浸潤細胞数は増加していた。しかし、増殖細胞割合の差を認めなかった。このことから、がん幹細胞と非がん幹細胞では線維芽細胞による増殖促進効果には差が無い一方、がん幹細胞の持つ内因的な要因により浸潤が促進されていることが示唆された。

今後は、Podoplanin 分子の発現抑制（がん幹細胞における内因性因子の抑制）を介して浸潤における Podoplanin の機能を確認し、がん幹細胞の浸潤における生物像を明らかにしたいと考える。