

[背景と目的]

腫瘍組織は、形態学的にも生物学的にも不均一な腫瘍細胞集団から構成されている。不均一な細胞集団の中で、腫瘍形成能が高いあるいは治療抵抗性を示す一部の亜集団は、幹細胞の性質を有する特殊な細胞集団（がん幹細胞）として考えられている。

我々は、A431（ヒト分化型扁平上皮癌細胞株）の Podoplanin 陽性細胞集団にがん幹細胞が濃縮されていることを世界で初めて報告した。Podoplanin 陽性細胞の方が、陰性細胞より大型コロニーの形成率が有意に高いこと、また、Podoplanin 陽性細胞集団からは Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞が、陰性細胞集団からは陰性細胞のみが産生されること、さらに、マウスへの皮下異種移植実験において Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも腫瘍形成能が高いこと、を見出した。以上から、Podoplanin ががん幹細胞マーカーであると結論付けた。

本研究では、がん幹細胞様の形質を示す Podoplanin 陽性 A431 細胞のコロニー形成率が高いことに着目した。コロニー形成率が高いこととがん幹細胞の増殖にどのような関わりがあるのか明らかにするために、単細胞レベルにおける細胞の増殖、細胞死、細胞周期を明らかにすることを本研究の目的とした。

[方法]

(1) ヒト分化型扁平上皮癌細胞株 A431 に、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を Lentivirus vector を用いて形質導入し、A431-Fucci2 を作製した。

(2) A431-Fucci2 の 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、7 日間 time-lapse imaging を行った。得られた time-lapse imaging を基に、細胞の増殖、細胞死、細胞周期の解析を行った。

[結果および考察]

(1) A431 に Fucci を導入し A431-Fucci を作製した。導入した Fucci の蛍光が細胞周期を正確に反映することをフローサイトメトリーにて確認した。

(2) ①Time-lapse imaging を基に、それぞれの細胞の分裂や細胞死を細胞運命系譜図として作成した (図 1)。次に、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の増殖率を検討した。168 時間後の time-lapse imaging を用い、播種した 1 個の細胞が何細胞になったか計数したところ、Podoplanin 陽性細胞が 4.1、陰性細胞が 1.5 で、陽性細胞の方が高い増殖率を示した (図 2)。次に、各増殖率を示す細胞が各実験においてどれほどの割合で存在していたかを検討した。Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも増殖率  $\geq 8$  の細胞の割合が高く、また、増殖率が 0 の細胞の割合が低かった (図 3)。以上の結果より、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも (i) 細胞死をきたす頻度が低い、あるいは(ii) 細胞周期が短い、事が考えられた。そこで、細胞運命系譜図を基に死細胞割合を算出した。生細胞数を 168 時間経過時点で生存していた細胞数、死細胞数を 168 時間の観察内で細胞死をきたした細胞数とし、[死細胞割合]=[死細胞数]/(生細胞数+死細胞数)と定義した。結果、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも死細胞割合が低かった (図 4)。また、細胞周期の長さを測定したところ、G<sub>1</sub>期の長さ、S/G<sub>2</sub>/M 期の長さ、細胞周期全体の長さに差は見られなかった (図 5)。以上の結果から、

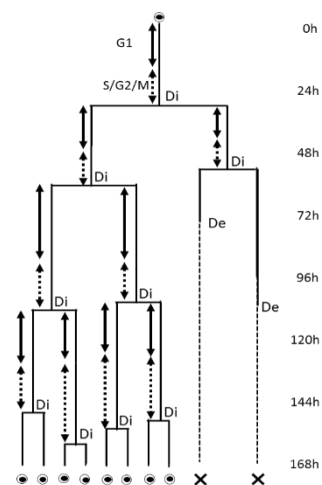


図 1 細胞運命系譜図

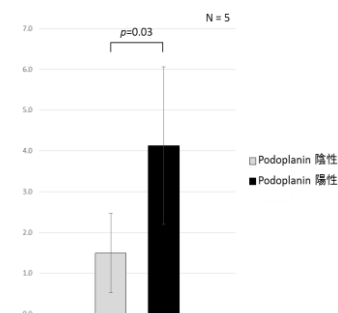


図 2 平均増殖率

Podoplanin 陽性細胞のコロニー形成率の高さには細胞死をきたしにくいことが重要であることが示唆された。

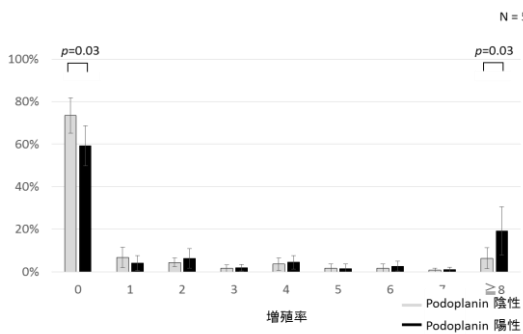


図3 1 well あたりの増殖率

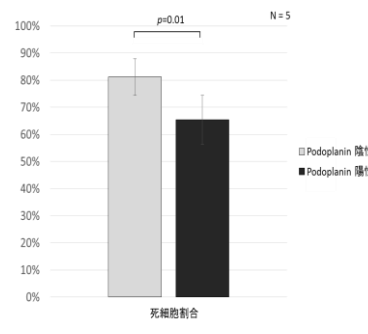


図4 死細胞割合

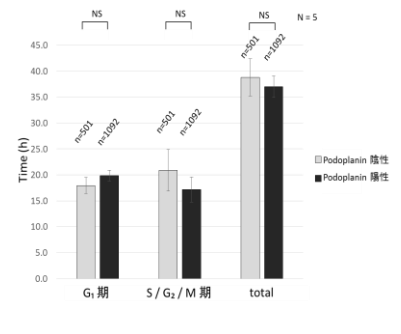


図5 細胞周期の長さ

②次に、各世代における死細胞割合と細胞周期の長さを測定した。播種した細胞を第一世代とし、分裂して産生された娘細胞を次世代とした。各世代の生細胞数は、播種後もしくは分裂後から 168 時間経過時点で生存、もしくは観察終了までに分裂した細胞数とした。死細胞数は播種後もしくは分裂後に細胞死をきたした細胞数とし、 $[\text{死細胞割合}] = [\text{死細胞数}] / (\text{生細胞数} + \text{死細胞数})$  と定義した。第一世代から第三世代までは Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも死細胞割合が低い、有意な差は認められず、第四世代では有意に Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも低かった (図 6)。また、細胞周期の長さは、各世代を通して Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞で有意な差は認められなかった (図 7)。以上の事から、Podoplanin 陽性細胞のコロニー形成率の高さには、各世代ごとに Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも死細胞割合が低いことが重要であることが示唆された (図 8)。

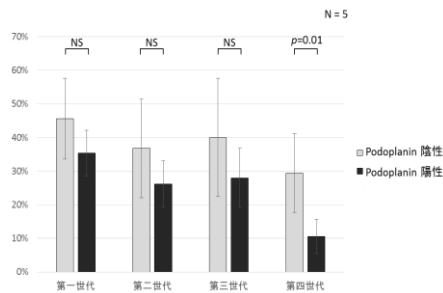


図6 世代ごとの死細胞割合

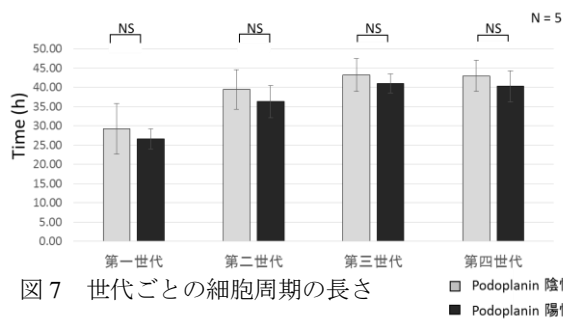


図7 世代ごとの細胞周期の長さ

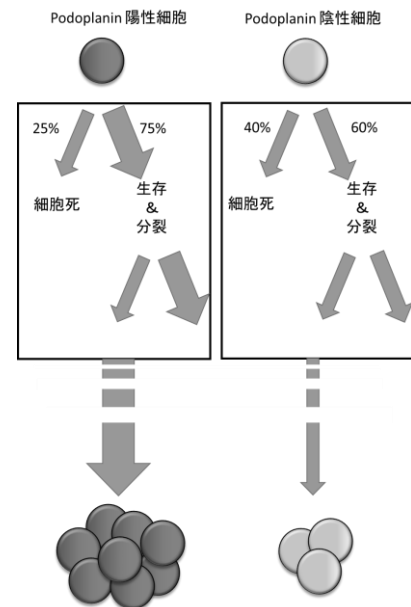


図8 Podoplanin 陽性細胞モデル図

[結論]

がん幹細胞様の形質を示す Podoplanin 陽性 A431 は、その増殖過程において細胞死をきたしにくいことによって、Podoplanin 陰性細胞よりも高い増殖率を示すことが明らかになった。