

博士論文等内容の要旨

申請者氏名 富安 聡

論文題目 子宮体癌における癌幹細胞の生物学的特性解析

癌幹細胞とは、腫瘍組織内に極少数存在し、自己複製能・分化能・造腫瘍能を有しており、癌の発生・維持に関与している細胞である。また、癌幹細胞は薬剤排出能や DNA 修復能により化学療法や放射線療法に抵抗性を示すと共に、浸潤能が亢進していることから癌の再発、転移に関与している。従って、癌幹細胞が存在する限り、癌の根治は困難であると考えられている。癌幹細胞は、1997 年に急性骨髄性白血病において白血病幹細胞として最初に同定された。これを契機に様々な固形腫瘍においても癌幹細胞が同定され、その特性解析が行われており、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が進められている。しかし、子宮体癌については、近年、食の欧米化に伴い増加傾向にあるものの、癌幹細胞は同定されておらず、解析が進んでいないのが現状である。

通常、癌幹細胞を分取するためには、癌幹細胞の薬剤排出能に基づき細胞を DNA 結合蛍光色素である Hoechst 33342 (Hoechst) により染色し、紫外線レーザーを用いて励起することで side population (SP) 分画に存在する細胞 (SP 細胞) として検出する必要がある。しかし、従来用いられている紫外線レーザー搭載型セルソーターは、高価な大型機器であり、紫外線を照射することから細胞の DNA に損傷をもたらす。さらに操作やメンテナンスが煩雑であることから専門のオペレーターを必要とする。以上の点が、SP 細胞分取による癌幹細胞研究の妨げとなっている。

本研究は、これら紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服することのできる紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法による子宮体癌幹細胞の分取法の確立と、さらにその子宮体癌幹細胞を選択的に標識する分子マーカーを探索した結果に関するものである。

第 1 章では、癌幹細胞の概念とその同定、再発・転移への関与について詳細に記述した。また、本邦における子宮体癌の現状（罹患率、治療法、発癌機構）とその問題点について記述し、癌幹細胞の研究対象としての重要性を述べた。

第 2 章では、ヒト子宮体癌細胞株より紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて、紫外線レーザー搭載型セルソーターを用いた場合と同様に SP 細胞を検出することが可能か否か検討した結果について記述した。高分化型、中分化型、低分化型のヒト子宮体癌細胞株 3 株を対象に Hoechst 染色を施し、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法により SP 細胞の存在率を解析した。その結果、それぞれの細胞株において薬剤排出能を阻害する verapamil を投与することで消失する細胞集団を検出することができた。従って、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法は、紫外線レーザー搭載型セルソーター同様に SP 細胞を検出することが可能であると示唆された。

第 3 章では、細胞造腫瘍能解析系の確立について記述した。第 2 章において紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた SP 細胞の分取法を確立した。しかし、分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するためには、自己複製能、分化能、造腫瘍能を解析する必要がある。特に、造腫瘍能は *in vivo* でのみ解析が可能である。そこで、分化度の異なる細胞株 3 株を免疫不全マウスへ移植し、造腫瘍能解析系の確立を目指した。また、SP 細胞を紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取する際には細胞を 4°C で 9 時間保存することになるため、その影響についても合わせて検討した。その結果、低分化型の細胞株は他の細胞株と比較して高い造腫瘍能を示した。また、細胞を 4°C で 9 時間保存することにより対照群と比較して腫瘍形成までにかかる期間の遅延が認められたが、腫瘍形成が認められたため、この実験系を用いて紫色レーザー搭載型 FACS Aria より分取した SP 細胞の造腫瘍能を解析することが可能であると示唆された。

第 4 章では、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて新規解析法により分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するため、第 3 章の検討において最も高い造腫瘍能を示した低分化型細胞株の SP 細胞および非癌幹細胞で構成されていると考えられる main population (MP) 細胞を対象に自己複製能、分化能、造腫瘍能の解析を行った。その結果、SP 細胞は SP 分画を維持すると共に、MP 細胞へと分化し、自己複製能および分化能を有する細胞であることが確認された。また、SP 細胞は MP 細胞と比較して *in vivo* において高い造腫瘍能を示した。さらに、*in vitro*

においても *in vivo* 同様に SP 細胞は高い増殖能を示した。これらの結果より、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中には子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。従って、癌幹細胞は、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取することが可能であり、癌幹細胞研究に有用な分取機器の一つに成り得ることが示唆された。

第 5 章では、子宮体癌幹細胞分子マーカーの探索について記述した。第 2 章および第 4 章より紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中に子宮体癌幹細胞の存在が証明されたことから、SP 細胞に特異的に発現する分子を検索することで、子宮体癌幹細胞分子マーカーの同定を試みた。そこで、子宮体癌の発生に関与していることが知られている Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) に着目し、KRAS の発現について mRNA および蛋白発現解析を行った。その結果、SP 細胞では KRAS の mRNA および蛋白発現共に MP 細胞と比較して有意に高値を示した。このことから、KRAS が子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーと成り得ることが示唆された。また、近年の癌幹細胞研究において、マウス卵巣上皮細胞に *C-myc* および *v-Ki-ras2* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*Kras*) を導入することで卵巣癌幹細胞が作製できたという報告がある。この報告より、ヒトの子宮体癌幹細胞の発生・維持においても KRAS が関与していることが考えられる。

以上の結果から、紫外線レーザー搭載型セルソーターを用いた場合と同様に、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞を分取できることが示された。また、ヒト子宮体癌細胞株より分取した SP 細胞は、自己複製能および分化能を有すると共に、MP 細胞と比較して高い造腫瘍能を有することから、SP 細胞中に子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。さらに、悪性度の高いヒト子宮体癌細胞株において、SP 細胞は KRAS 陽性細胞を優勢に含むことから、癌幹細胞は KRAS を発現し、癌の発生・維持に関与していると考えられる。加えて、KRAS は高悪性度の子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーとして診断に有用であることが示された。また、紫色レーザー搭載型 FACS Aria は紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服しており、この技術を用いた癌幹細胞分取の報告は、本研究が最初である。従って、本

研究で提示した紫色レーザー搭載型 FACS Aria による癌幹細胞分取法を検討評価することにより、癌幹細胞研究の更なる効率化が期待される。