

主論文の要旨

**Possible Association between Stem-like Hallmark and
Radioresistance in Human Cervical Carcinoma Cells**

〔 子宮頸癌細胞株におけるがん幹細胞の
同定と特徴及び放射線耐性との関与 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

熊澤 詔子

【緒言】

子宮頸癌は扁平上皮癌が多くを占めるため、放射線療法が有効であるが、照射後の照射野内再発、照射中の原発巣以外の病巣の増悪、放射線が誘因となった転移例での放射線耐性の獲得が問題となっている。

また放射線耐性のメカニズムの一つにがん幹細胞の存在が指摘されている。がん幹細胞は多分化能と自己複製能を有する少数の細胞集団であり、抗がん剤や放射線への抵抗性を示し、治療の際に残存しやすく、再発・転移の原因となり予後の悪化の一因となっていると考えられている。様々な癌種においてがん幹細胞の分離・同定がなされており、細胞表面マーカー、Spheroid 形成、薬剤代謝能(side population)などによる分離方法が報告されている。

がん幹細胞に関与した放射線耐性を究明することは、臨床で問題になっている放射線照射後の再発・転移のメカニズムの解明につながると考えられる。

【目的】

子宮頸癌細胞株において side population を用いたがん幹細胞の同定と特徴、及び放射線耐性との関与の解明をすることを目的とした。

【方法】

はじめに、子宮頸癌細胞株 HeLa にて side population を施行し、分離した side population (SP) 細胞を用いてがん幹細胞マーカーの発現 (CD133、CXCR4、Oct3/4、SOX2)、培養後の side population、非接着性培地での細胞形態的变化、マウスでの腫瘍形成能について non-SP(NSP)細胞と比較検討した。

次いで、HeLa SP/NSP を照射した時の細胞形態的变化、アポトーシス、side population を非照射時と比較検討した。また放射線耐性との関与が様々な癌で指摘されている c-Met の発現を Western blot にて検討した。

【結果】

Side population で認めた SP とは、ABC トランスポーターの色素排泄能を利用して得られる細胞分画のことで、この集団はがん幹細胞に富んでいるという報告が色々な癌で報告されている。HeLa でも SP を認め、このがん幹細胞の特徴について更に検討した (Figure. 1A)。まずがん幹細胞マーカーであるといわれている CD133、CXCR4、Oct3/4、SOX2 の発現について Western blot で検討した。いずれのマーカーも NSP と比較して SP で高発現を認めた (Figure. 1B)。次に SP と NSP を 1 週間培養し、side population を再検討した。SP は SP と NSP に分化する一方で、NSP は NSP しか分化しなかった。SP は自己複製能と多分化能を有していることが示唆された (Figure. 1C)。

次に SP と NSP を非接着性の培地で培養し、形態的变化を検討した。まず SP、NSP を 100 細胞ずつまき、12 日間培養した時の形態的变化を評価した。非接着性の劣悪な環境にも拘らず、SP は NSP より大きなコロニーを形成した (Figure. 2A)。NSP は浮遊

し脆弱でアポトーシスを示唆させる形態だった。そこで annexin V-FITC/PI の FACS を施行し、アポトーシスを評価した。SP は約 15%、NSP は 30% 後期アポトーシスを認め、NSP でよりアポトーシスを認めた (Figure. 2B)。更に、SP、NSP を 1 細胞ずつ 96 穴プレートにまき培養し、14 日目に形態的变化を評価した。トータルのコロニー数は SP:NSP=33:52 で、NSP の方が多く認めたが、1mm 以上のコロニーの数は SP:NSP=33:27、2mm 以上のコロニーの数は SP:NSP=19:2 で SP はより大きなコロニーを形成していた (Figure. 2C)。

また、SP、NSP を 10 細胞ずつ 96 穴プレートにまき培養し、9 日目と 21 日目に細胞増殖能を MTS assay で評価した。いずれのポイントでも SP は NSP より高い生存率を示した (Figure. 2D)。

SP、NSP を各々 1×10^2 、 1×10^3 細胞ずつ皮下注射し、腫瘍形成能を vivo で検討した。70 日間観察し、 1×10^2 細胞では 41 日目に SP 1 匹、 1×10^3 細胞では SP は 40、48、52 日目に 3 匹全部、NSP は 67 日目に 1 匹のみ腫瘍形成を認めた (Figure. 2E)。また、腫瘍重量も SP の方が重く、SP は NSP より増殖スピードが早く、少ない細胞数でも腫瘍形成をし、悪性度が高いことが示唆された (Figure. 2F)。

続いて放射線照射による SP、NSP の変化について検討した。まず、非照射時と 6Gy 照射時の形態的变化について検討した。非照射時でも NSP は SP と比較して小さく少数のコロニーを形成していたが、照射されるとより断片化したコロニーとなった (Figure. 3A)。

次に SP、NSP を 100 細胞ずつ 12 穴ディッシュにまき、翌日 4Gy 照射し、10 日後のコロニー形成能を評価した (Figure. 3B)。コロニーの大きさも数も SP の方が NSP より大きく、NSP では $500 \mu\text{m}$ 以上のコロニーは認めなかった (Figure. 3C)。また同条件でトリパンブルー染色を行い生存率について検討した (Figure. 3D)。SP では生存率 79%、NSP では 64% で、SP で高い生存率を示した (Figure. 3E)。更にこの条件で annexin V-FITC/PI の FACS を施行し、アポトーシスを評価した。NSP では約 20% の後期アポトーシスを認めたのに対し、SP は約 5% と NSP で顕著にアポトーシスを認めた (Figure. 3F)。

次に HeLa に $2\text{Gy} \times 10$ 回照射し side population を施行した (Figure. 4A)。コントロールの非照射群では SP は 0.2% の発現だったのに対し、照射群では 3.9% と SP の発現が増加し、SP が放射線耐性に関与している可能性が示唆された。

更に 6cm ディッシュに 1×10^3 ずつ SP、NSP をまき、0、4、8、12、16Gy 照射し、コロニー形成について検討した。8Gy 以上では両群とも死滅してしまっていたが、4Gy 照射群では、96 時間後にクリスタルバイオレット染色を行い、SP では NSP よりコロニー数が有意に増加していた (Figure. 4B、C)。

次に 6cm ディッシュに SP、NSP を回収し、120 時間後に 4Gy 照射し、照射 1、3、6、24 時間後にアポトーシスマーカーである PARP/ cleaved PARP の発現について Western blot にて解析した。NSP では cleaved PARP の発現が SP より高発現しており、NSP のアポトーシスが示唆された (Figure. 5A)。

また、回収後 1 週間培養した SP、NSP に 4Gy または 8Gy 照射し、照射 5 分または 10 分後に回収し、肝がんなどで放射線耐性との関与が指摘されている tyrosine kinase receptor である c-Met の発現を Western blot にて解析した (Figure. 5B)。C-Met は SP でいずれの条件でも NSP より高発現し、c-Met が SP の放射線耐性と関与していることが示唆された。

【結論】

HeLa において SP はがん幹細胞様の性質をもつことが示唆された。また、HeLa において SP は放射線耐性を示した。SP をターゲットとしたがん幹細胞が関与した放射線耐性を今後更に検討することで、臨床で問題になっている放射線照射後の再発・転移のメカニズムの解明につながる可能性が示唆された。