

Title	Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho - 1 - N - 1
Author(s)	矢島, 哲郎
Journal	歯科学報, 110(4): 538-539
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/2001">http://hdl.handle.net/10130/2001</a>
Right	

氏名(本籍)	矢島哲郎 (東京都)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1825号(甲第1096号)
学位授与の日付	平成21年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1
掲載雑誌名	International Journal of Oncology 第35巻 273~280頁 2009年
論文審査委員	(主査) 柴原 孝彦教授 (副査) 山根 源之教授 井上 孝教授 水口 清教授 東 俊文教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

近年、癌の発生と進展において幹細胞の関与が注目されている。これらの細胞は癌幹細胞と呼ばれ高い薬剤抵抗性や増殖能力を有すると報告されている。Side population(SP)細胞は、もともと骨髓幹細胞を純化、濃縮する方法で開発されたが、現在では癌細胞の中にも存在することが判明し、このSP細胞の中に癌幹細胞が濃縮されているという議論がある。我々はこの方法を応用し、今まで解明されていない口腔扁平上皮癌からSP細胞の分離を試みた。口腔扁平上皮癌細胞株 Ho-1-N-1 からSP細胞を分離し、非SP細胞との遺伝子発現の相違と各細胞機能の解析も実施し、癌幹細胞的特性及び抗癌剤治療と密接に関連するアポトーシスについて検討を行った。

#### 2. 研究方法

ヒト由来口腔扁平上皮癌細胞株 Ho-1-N-1 を用い、Hoechst33342で染色した細胞をフローサイトメーター(FACS Vantage SE, FACS Aria)にて2波長解析と分離を行った。SP細胞と非SP細胞からそれぞれRNAを抽出し、Gene Chip microarray(Affymetrix HG-U133A)によって網羅的な遺伝子解析を行った。Gene Chipから得られた情報をもとに8種類のABCトランスポーターと抗アポトーシスに関連する遺伝子をReal-time RT-PCR(Prism7700)で解析した。機能解析として、Ho-1-N-1のSP細胞の自己複製能力、抗癌剤感受性試験を用いて抗癌剤抵抗性を調べるとともに、免疫蛍光染色法、TUNEL法にて抗アポトーシスに関する機能検査も行った。

#### 3. 研究成績および考察、結論

Ho-1-N-1をHoechst染色し、2波長解析FACSで展開するとSP細胞に特有の分布を示す細胞集団が確認され、繰り返し分離、培養を行うと幹細胞特性である自己複製能力を示した。遺伝子発現解析でこの癌SP細胞は非SP細胞と比較し、細胞内からの薬剤排出に関与するABCトランスポーターや細胞死に対する抵抗性を示す抗アポトーシスに関連する遺伝子発現の相違が認められた。ABCトランスポーターでは特にmulti-drug resistance(MDR)に関係しているABCB1/MDR1やHoechst33342の排出に関係しているABCG2の発現が有意に認められた。抗アポトーシスではカスパーゼカスケードにおいて細胞死の発端となるcaspase8の

活性化を抑制する CFLAR, ミトコンドリアからのシトクロム c の放出を抑制する BCL2, BCL2A1 の発現が有意に認められた。さらに免疫蛍光染色法でこれら抗アポトーシスに関連するタンパクの発現が認められ、TUNEL 法でも SP 細胞は非 SP 細胞よりアポトーシスを起こしにくいことが示唆された。Ho-1-N-1 の癌 SP 細胞は抗癌剤感受性試験においても非 SP 細胞より高い生存率を示した。以上より Ho-1-N-1 の SP 細胞は ABC トランスポーターによる薬剤排出のみならずアポトーシスに対しても抵抗性を有しており、これらが抗癌剤耐性に関与していることが示唆された。SP 細胞は癌幹細胞的特性を有しており、今後の癌の治療法における新たな標的細胞なり得ることが示された。

### 論文審査の要旨

組織幹細胞は全ての組織に存在し、組織の修復過程において重要な役割を示している。近年では、癌の発生源母地として組織幹細胞が癌化することが注目され、絶対数は少ないが他の癌細胞と比較し高い薬剤抵抗、抗アポトーシスそして自己複製能力を有すると報告されている。なかでも Side population (SP) 細胞は、もともと骨髄幹細胞から純化と分離することで発見されたが、現在では癌細胞の中にも存在することが判明し、癌幹細胞様の機能が注目されている。本研究ではこの点に着目し、今まで解明されていない口腔扁平上皮癌細胞株 Ho-1-N-1 から SP 細胞を分離・同定し、その性質として遺伝子および機能を解析したものである。その結果、高い抗癌剤抵抗性を示すと共に、これまで報告のない癌 SP 細胞における抗アポトーシス関連遺伝子 CFLAR, BCL2, BCL2A1 を同定し、その発現によるアポトーシス抵抗性との関連を明確にした。

本審査委員会は、1) 用いた口腔扁平上皮癌細胞株の特徴、2) 癌幹細胞と癌 SP 細胞との関係、3) 臨床応用への feed back、4) 他臓器における癌 SP 細胞の特徴、5) 使用した薬剤と ABC トランスポーターの関連性、などについて質疑が行われ、概ね妥当な回答が得られた。今後は、癌 SP 細胞における癌幹細胞的特性についてより詳細な解析などの要望がなされた。

本研究で得られた結果は、歯学(口腔外科学)の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。