

新たな大腸癌幹細胞モデルCD44陽性COL0 201細胞の 同定ならびにその性質解析

奥山, 裕久

<https://doi.org/10.15017/4060097>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 奥山 裕久

論文題名 : 新たな大腸癌幹細胞モデル CD44 陽性 COLO 201 細胞の同定ならびにその性質解析

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

背景・目的 : 大腸癌は世界中で最も罹患患者が多い癌種の一つであり、癌種の中でも 4 番目に高い死因である。新たな大腸癌治療法の確立は人類における喫緊の課題である。腫瘍組織はヘテロジェネティクが高く、近年、腫瘍生物学の発展により癌幹細胞と呼ばれる微小集団の存在が明らかになってきた。癌幹細胞は自己複製能及び分化能力を有しており、腫瘍の増殖と維持に必要な不可欠な存在であるとされている。また、非癌幹細胞に比べて化学療法や放射線療法、免疫療法に対して感受性が低いことが報告されている。したがって、癌治療によって完全寛解には至らず、癌の再発をもたらす原因の一つだと考えられている。これまでに、多くの研究者によって、急性骨髄性白血病、乳癌、膵癌、肺癌といった様々な癌腫で、複数の分子の表面マーカーを指標に癌幹細胞が同定されている。大腸癌の表面マーカーとして、CD44 や CD133、CD166 が報告されている。癌幹細胞の選抜は、癌患者の腫瘍から細胞表面マーカーを使って分離し *in vitro* におけるスフェア形成能や免疫不全マウスにおける腫瘍形成能試験が行われることがほとんどであった。しかし、臨床サンプルから安定した結果を得るのが難しいなど課題点も多い。癌幹細胞を標的にした治療法の開発には非臨床モデルが必須である。そこで、非臨床モデルになりうる細胞株を見出すべく、ヒト大腸癌細胞株から癌幹細胞を単離することを試みた。

方法・結果 : 20 種のヒト大腸癌細胞株を用いて、CD44、CD133 および、CD166 の発現を調べたところ、複数の細胞株には発現が異なる亜集団が存在した。このうち CD44 陽性集団と CD44 陰性集団に分かれる COLO 201 細胞に注目して研究を行った。この 2 つの細胞集団をそれぞれ免疫不全マウスの背部皮下に移植し、腫瘍形成能試験を行ったところ、CD44 陰性細胞は生着したが腫瘍が増大しなかった。一方、CD44 陽性細胞の腫瘍は経日的に増大した。それぞれの腫瘍の組織解析を行ったところ、CD44 陰性細胞から形成された腫瘍は日数が経過するにしたがって癌細胞実質の領域が小さくなり粘膜が溜まっている像が見受けられた。一方、CD44 陽性細胞から形成された腫瘍は日数が経過しても癌細胞の実質で満たされた腫瘍像を示した。免疫染色から CD44 陽性細胞から形成された腫瘍には CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞から構成され、両細胞ともに増殖マーカーである Ki-67 が陽性であった。したがって、*in vivo* では CD44 陰性細胞だけでは腫瘍の増殖・維持することはできないが、CD44 陽性細胞は陽性細胞と陰性細胞を生み出し、腫瘍の増殖・維持が可能であることを見

出した。次に、血清無添加のスフェア培地で癌細胞を培養することで癌幹細胞の濃縮が可能であることから、COLO 201 をスフェア培地で培養したところ、CD44 陽性細胞の濃縮が観察され、幹細胞マーカーの一つである *nanog* の発現が亢進していた。したがって、CD44 陽性細胞が幹細胞の特徴を示した。また、96 ウェルプレートのウェルに CD44 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれシングルセルで培養したところ、CD44 陰性細胞を培養したウェルからは CD44 陽性細胞がほとんど産生されなかった。一方、CD44 陽性細胞を培養したウェルからは、陽性細胞と陰性細胞の両方が全てのウェルで産生された。CD44 陽性細胞は、自己複製能及び分化能力を保持していることが示唆された。次に、癌患者に汎用される抗癌剤である fluorouracil (5-FU) を用いて、抗癌剤に対する感受性について調べた。COLO 201 を *in vitro* で 5-FU で処理したところ、5-FU の濃度依存的に CD44 陽性細胞の濃縮が認められた。さらに、それぞれの細胞に対する 5-FU のアポトーシスおよびネクローシス誘導能について評価したところ、CD44 陰性細胞に比べて CD44 陽性細胞ではこれらの誘導能が低かった。*In vivo* においても、COLO 201 から形成された腫瘍は、5-FU や carboplatin (CBDCA) に対して抵抗性を示した。したがって、CD44 陽性細胞は 5-FU に対して抵抗性を示すことが明らかになった。次に、これらの癌幹細胞の性質を理解するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、癌幹細胞の性質に関連する遺伝子 (CXCR4、ALDH1A1、ALDH3A1、WNT5A) の mRNA 発現が CD44 陽性細胞で亢進していた。

結論・考察：*In vivo* において、CD44 陰性細胞は増腫瘍性を持たないにも関わらず、CD44 陽性細胞は高い増腫瘍能力を持っていることや、さらに CD44 陽性細胞は癌幹細胞の特徴である 幹細胞性、自己複製能および多分化能を保持していることから、CD44 陽性 COLO 201 細胞を癌幹様細胞と結論づけた。さらに、CD44 陽性細胞は 5-FU に対して抵抗性を示したことから、癌幹細胞を標的とした創薬研究に有用なモデルになりえることが示唆された。今後、このモデルを用いてより詳細な分子メカニズムを解明することができれば、癌幹細胞を標的とした新たな治療方法に開発につながることを期待される。