

氏 名 こじま ひろふみ
小島 博文

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 244 号

学位授与年月日 平成 29 年 6 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目 Enhanced cancer stem cell properties of a mitotically
quiescent subpopulation of p75NTR-positive cells in
esophageal squamous cell carcinoma
(食道扁平上皮癌において p75NTR 陽性の静止期癌細胞は高い
癌幹細胞様特性を示す)

論文審査委員

(主査) 教授 杉山 敏郎
(副査) 教授 井村 穰二
(副査) 教授 森 寿
(副査) 教授 將積 日出夫
(指導教員) 教授 藤井 努

論文内容の要旨

〈目的〉

細胞周期が静止期にある癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) は抗癌剤や放射線などに対する治療抵抗性を有し、また腫瘍形成能も高いため、癌細胞のなかでもより悪性度の高い表現型であると考えられている。一方、p75 ニューロトロフィン受容体 (p75 neurotrophin receptor; p75NTR) は神経成長因子受容体として広く知られており、食道扁平上皮癌における CSC マーカー候補の一つとされている。静止期癌幹細胞の同定に関する報告は白血病、リンパ腫などの非固形癌では知られているが、固形癌、とくに食道扁平上皮癌での既報は無い。我々の研究の目的は p75NTR の発現と細胞周期を解析することにより食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞を同定し、その性質を明らかにすることである。

〈方法並びに成績〉

ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (KYSEs 株; KYSE-30、KYSE-140) における p75NTR の発現と細胞周期をフローサイトメトリーで解析し、p75NTR の発現の有無と細胞周期 (静止期; G0-1、非静止期; S-G2-M) に基づき、1) p75NTR-positive/G0-1、2) p75-positive/S-G2-M、3) p75NTR-negative/G0-1、4) p75NTR-negative/S-G2-M の4つの細胞集団にソーティングし、以下の実験を行った。

real-time PCR による遺伝子解析では、p75NTR-positive/G0-1 の細胞集団で他の細胞集団よりも有意に癌幹細胞関連遺伝子 (Nanog、p63、Bmi-1) やプラチナ系抗癌剤の耐性に関わる遺伝子 (ERCC1) の発現レベル亢進を認めた。また、コロニーフォーメーションアッセイでは、p75NTR-positive/G0-1 の細胞集団は他の細胞集団よりも有意に高いコロニー形成能を示し、MTT アッセイによる抗癌剤耐性能試験では、p75NTR-positive/G0-1 の細胞集団は他の細胞集団よりも、シスプラチンに対し有意に高い抗癌剤抵抗性を示した。さらに、p75NTR-positive/G0-1 の細胞集団はヌードマウスにおける皮下腫瘍異種移植モデルで最も高い腫瘍形成能を示し、極少数の腫瘍細胞 (100 cells) の移植からでも高い腫瘍発生率を認めた。以上の結果から、p75NTR-positive/G0-1 の細胞集団は高い癌幹細胞様特性をもつ細胞集団であることが示唆された。

また、CellTrace™による細胞増殖アッセイでは KYSEs 株を7日間の通常培養環境下の後に蛍光観察し、label-retaining cell の存在を確認した。また、これらの細胞は p75NTR 陽性であった。一方、p75NTR 陰性細胞には label-retaining cell は含まれていなかった。

当院で1986年から2016年に切除された食道扁平上皮癌95症例について p75NTR の免疫組織化学染色を行い、p75NTR の発現を臨床病理学的に検討したと

ころ、単変量解析では p75NTR の発現は腫瘍の深達度と術前化学療法の有無に有意に相関していた。Kaplan-Meyer 法による予後解析では、全生存率で p75NTR 陽性細胞を多く含むグループ (n=39) で p75NTR 陰性細胞を多く含むグループ (n=56) よりも予後良好であった。

さらに、p75NTR と Ki-67 の二重免疫染色を行った食道扁平上皮癌 20 症例を解析し、免疫組織化学的に p75NTR-positive/Ki-67-negative である細胞を確認した。p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞は、高分化型よりも低分化型の食道扁平上皮癌により多く含まれていた。臨床病理学的に検討した結果、単変量解析で p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞数は組織学的に低分化であることと有意に相関していた。これらの細胞は食道扁平上皮癌細胞のなかでも比較的 immature な細胞であることが示唆された。Kaplan-Meyer 法による予後解析では、統計学的な有意差はないものの全生存率、無病生存率ともに p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞の割合が多いグループ (n=10) は p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞の割合が少ないグループ (n=10) よりも予後不良であった。

食道扁平上皮癌切除標本における p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞は、KYSEs 株において p75NTR-positive/G0-1 細胞が高い癌幹細胞様特性を持つことが示されたことと同様に、静止期癌幹細胞の特性をよく反映した細胞集団であると考えられる。

〈総括〉

これらの結果から、p75NTR 陽性の静止期癌細胞は高い癌幹細胞様特性を持つことが示され、本研究手法により食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞を分離、同定できる可能性が示唆された。さらに、静止期癌幹細胞の維持に関わる分子過程を明らかにすることで、静止期癌幹細胞を標的とした治療戦略への応用にもつながることが期待される。

学位論文審査の要旨

「目的」

細胞周期が静止期にある癌幹細胞は抗癌剤や放射線などに対する治療抵抗性を有し、また腫瘍形成能も高いため、その同定は治療抵抗性、再発性悪性腫瘍の新規治療戦略構築のために重要である。p75 ニューロトロフィン受容体 (p75 neurotrophin receptor; p75NTR) は神経成長因子受容体として広く知られ、食道扁平上皮癌の癌幹細胞マーカーとなりうる可能性が推測されている。静止期癌幹細胞の同定に関して、白血病などの非固形癌では多数、報告されているが、固形癌、とくに食道扁平上皮癌での静止期癌幹細胞の同定の報告は少ない。

小島君は食道扁平上皮癌細胞株における検討から、p75NTR 陽性静止期癌細胞が食道扁平上皮癌の癌幹細胞マーカーとなり得るか否か、また本分子マーカーの臨床病態における意義、予後との関連を明らかにすることを目的とし、本研究を実施した。

「方法と成績」

1. ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (KYSE-30、KYSE-140) における p75NTR 発現と細胞周期をフローサイトメトリーで解析し、p75NTR 発現の有無と細胞周期 (静止期; G0-1、非静止期; S-G2-M) に基づき、(1) p75NTR-positive/G0-1、(2) p75-positive/S-G2-M、(3) p75NTR-negative/G0-1、(4) p75NTR-negative/S-G2-M の4細胞集団にソーティングし、以下の実験を行った。

2. real-time PCR 法による検討から、p75NTR-positive/G0-1 細胞集団は他の細胞集団よりも癌幹細胞関連遺伝子 (*Nanog*, *p63*, *Bmi-1*)、プラチナ系抗癌剤耐性に関わる遺伝子 (*ERCC1*) 発現が亢進していた。また、同細胞集団は有意に高いコロニー形成能を示し、MTT アッセイによる抗癌剤耐性能試験により、有意に高いシスプラチン抵抗性を示した。

3. ノードマウスにおける皮下腫瘍異種移植実験では p75NTR-positive/G0-1 細胞集団は最も高い腫瘍形成能を示し、本細胞集団は癌幹細胞様特性をもつことが示唆された。KYSEs 株を CellTrace™ でラベルすると培養7日目では細胞分裂に伴いほとんどの細胞の蛍光が消退するが、少数の細胞のみが消退せず、この細胞は p75NTR 陽性であり、癌幹細胞様特性をもつことが示された。

4. 当院で切除された食道扁平上皮癌 95 症例について免疫染色法による p75NTR 発現食道癌の臨床病理学的検討を行った。単変量解析では p75NTR 陽性症例は有意に深達度が浅かった。予後解析では、p75NTR 陽性細胞多数群 (n=39) の全生存率が高く予後良好であった。p75NTR と Ki-67 の二重免疫染色ができた 20 症例では p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞は低分化型食道扁平上皮癌が多く、予後解析では、有意差はないが全生存率、無病生存率ともに p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞多数群 (n=10) は予後不良であった。

「論文の総括」

本研究により、小島君はヒト食道扁平上皮癌培養細胞株による *in vitro* 実験およびヌードマウス移植実験から、p75NTR-positive/G0-1 細胞集団がヒト食道扁平上皮癌の癌幹細胞様特性（抗癌剤耐性遺伝子の過剰発現および腫瘍形成能）を示すことを明らかにし、p75NTR が癌幹細胞マーカーの一つとなり得る可能性を示した。他方、食道扁平上皮癌切除症例の臨床病理学的検討では p75NTR 陽性細胞多数群の全生存率は、むしろ高く、予後良好ではあったが、その中の p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞多数群は低分化型食道扁平上皮癌が多く含まれ、予後不良傾向が示された。臨床病理学的検討には他の交絡因子の介在を排除できず、さらに多数例での解析を必要とするが、p75NTR-positive/Ki-67-negative 細胞を標的とした新規食道癌治療戦略の構築により、今後の臨床応用への展開が期待される。

以上より、本審査委員会は本研究を学術的および臨床的観点から価値の高いものであると評価し、博士（医学）の学位に値するものと判定した。