

放射線災害復興学報告書

コース名：放射線災害医療コース

氏名：中峠 洋隆

○放射線災害復興学に関して

(放射線災害復興に関する考え、携わってきた経緯、研究経過等を記載)

放射線災害時においては経済的、環境的、人体に対する肉体的、精神的な影響を及ぼすことから、他分野融合的なアプローチが必要不可欠となる、その中でも、放射線災害時における、生物学的影響は、がんや奇形の発生といった有害事象に関わる事は明らかになってきているが、これらのリスク評価を行う方法は確立していない。このことは風説の形成や、被災者への不安の増長につながり、医療、生物学的フィールドを超えて影響が拡散していく要因の重要な課題である。放射線の生物学的影響については、高線量、および低線量の放射線被曝により、腸管出血や脱毛といった急性期障害や発がんによって代表されるような晩発性障害、さらには胎内被曝による奇形などの、種々の障害が発生するが、その標的細胞は各臓器の幹細胞であると考えられている。従って、幹細胞を明らかにすることは放射線の生物学的影響を定量評価し、さらにその影響を予測する上で重要である。一方、がん治療の現場では、(1)抗がん剤に非常によく反応した症例でも投与中止後しばしば癌の再発が見られる。(2)放射線治療や化学療法で Complete Response が得られた後に、癌の再発が頻繁に見られる。(3)放射線治療、化学療法および手術療法後、長期間を経てリンパ節転移や局所再発が見られる。などの症例によく遭遇する。(1)の原因として、ABCトランスポーター分子などの細胞膜での高発現による抗癌剤の高排出細胞(耐性細胞)の存在。(2)の原因としては、放射線治療や化学療法に耐性を示す、分裂の非常に遅い細胞群の存在。(3)については、ほとんど増殖しない癌細胞の存在、などがその原因として考えられる。近年、癌組織中には未分化な細胞や分化した細胞、さらには分裂速度が異なる細胞など多種類の細胞が混在していることが知られており、放射線治療や化学療法などは分裂速度の速い細胞を標的としているため、分裂速度が遅い癌細胞には治療効果が低いことが推察され、再発や転移にはこれらの治療に抵抗性の癌細胞が関与していると考えられてきた。このような疑問を解決する糸口として、癌幹細胞の存在が考えられている。近年、幹細胞研究の著しい進展により、胚性幹細胞、造血幹細胞、組織幹細胞をはじめとする幹細胞の性状が明らかにされはじめ、幹細胞を用いた再生医療・細胞治療が期待されているが、造血器系腫瘍において癌幹細胞が発見されて以来、さまざまな固形腫瘍にも幹細胞が存在し、腫瘍の発生・進展・維持に重要な役割を果たしている可能性が明らかにされつつある。つまり、癌組織には自己複製能を有し、半永久的に娘細胞を生み続ける少数の細胞群と、高い増殖能を持つが、最終的には分化や老化により増殖能を失う大多数の細胞群からなることが明らかになってきた、このことは、正常の組織幹細胞とそれから生じた分化細胞のような関係が癌組織にも存在していることを示唆している。このような幹細胞様の癌細胞、つまり癌幹細胞は放射線や抗癌剤に対する抵抗性も高いことが予想され、先の臨床での再発例を裏付けている。癌幹細胞は、正常組織幹細胞そのものに遺伝子変化が蓄積した細胞なのか、あるいは正常幹細胞か

ら分化方向へ transit 中の細胞に遺伝子変化が蓄積し癌化した細胞なのか、あるいは 変異が蓄積した transit 細胞に何らかのリプログラミングが起こり幹細胞機能を再獲得した細胞なのか不明であるが、癌の起源となる細胞と考えられており、癌幹細胞と組織幹細胞との間には、その自己複製能や分化能の制御には多くの共通性があることが予想される。人工多能性幹 (iPS) 細胞は、エピジェネティックな変化が起こっている分化細胞に oct3/4, sox2, klf4, c-Myc の 4 種類の遺伝子を導入することにより、自己複製能と多分化能が再獲得された細胞であるが、これら遺伝子のうち、c-myc は癌遺伝子であり Klf4 は癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子としても機能することから、iPS 細胞の誘導機構に類似した機構が癌幹細胞の誘導にも関与している可能性が考えられている。一方、組織幹細胞などの正常幹細胞が未分化性と多分化能を維持するためには、それを可能にする微小環境(ニッチ)が必要と考えられており、ニッチ内で幹細胞の数や細胞分裂、分化が制御されている可能性が高い。したがって、癌幹細胞においても、正常組織幹細胞と類似した自己複製能と分化能を維持する機構すなわちニッチが存在している可能性が高い。

そこで私は、ES/iPS 細胞などの未分化な多能性幹細胞が特異的に発現する糖鎖構造を認識するレクチンである rBC2LCN の口腔扁平上皮癌細胞の幹細胞マーカーとしての可能性を検討し、その腫瘍形成のメカニズムとがん微小環境 (ニッチ) の維持メカニズムを解明し、放射線感受性や腫瘍発生メカニズムを明らかにすることを旨とした。その結果、rBC2LCN が口腔扁平上皮癌細胞の新たな癌幹細胞マーカーである可能性が示された。また、細胞生存、分化、増殖、アポトーシスに重要な機能を果たしている IGF-2 や細胞外分泌小胞である exosome が、口腔扁平上皮癌細胞における rBC2LCN 認識糖鎖の発現及び口腔癌幹細胞ニッチにおいて重要な機能を果たしていることを明らかにした。

これらの結果は、放射線災害時及び災害後における生物学的なリスク診断、影響の定量に寄与し、放射線に関わる腫瘍発生のリスク予測の一助となる事が考えられ、放射線災害における長期的な復興に重要な課題解決につながると考えられた。

○学位論文題目

A study of rBC2LCN as a novel cancer stem cell marker of oral squamous cell carcinoma cells

(口腔扁平上皮癌細胞の新たな癌幹細胞マーカーとしての糖鎖認識レクチン rBC2LCN に関する研究)

○学位論文要旨

研究目的

口腔癌は全悪性腫瘍の 5%程度を占め、早期では比較的予後良好であるが、転移や治療耐性を獲得した症例では生命予後は極めて不良である。また、口腔は咀嚼、摂食、嚥下など、ヒトのヒトたる基本的な機能を司る重要臓器であり、その機能低下あるいは喪失は QOL の著しい低下を引き起こす。口腔癌に対して、手術療法、放射線療法、化学療法、免疫療法や、これらを組み合わせた併用療法により、一定の治療効果を上げているものの、一次治療で臨床的に完全消失を認めた症例が、数ヶ月から数年後に再発することもよく経験する。近年、この原因として癌幹細胞の存在が考えられており、造腫瘍性、放射線耐性、転移巣形成能などにおいて重要な役割を担っていることが報告されており、癌幹細胞は治療の標的細胞として注目されている。一方、口腔癌における癌幹細胞マーカーはいまだ明らかにされていない。

そこで本研究では、口腔癌の診断・治療の標的分子としての新たな口腔癌幹細胞マーカーを明らかにすることを旨として、embryonic stem (ES)/induced pluripotent stem (iPS)細胞などの未分化な多能性

幹細胞が細胞表面に発現する糖鎖構造を特異的に認識するリコンビナントレクチンである rBC2LCN の口腔癌幹細胞マーカーとしての可能性を細胞・分子生物学的に検討した。

研究方法

口腔癌細胞株として、当研究室で樹立され、細胞バンクに寄託している口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株 Ho-1-N-1 及び Ho-1-U-1 を用い、外陰部扁平上皮癌細胞(SCC)株として A431 を用いた。これら細胞は、DMEM 及び Ham F12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 基礎栄養培地に、insulin, transferrin, BSA-oleic acid, 2-mercaptoethanol 2-aminoethanol 及び sodium selenite の 6 因子を加えた DF6 無血清培地を用いて培養した。各細胞における rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞の比率は、フローサイトメトリーにて解析し、各細胞の分取はセルソーティング法にて行った。陽性及び陰性細胞の単層培養系での増殖能及び浮遊培養系での sphere 形成能を検討した。各細胞における網羅的遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法で解析し、陽性細胞で特異的に高発現している遺伝子・蛋白について機能解析を行うとともに、各細胞におけるリン酸化シグナルについても Bio-plex システムを用いて網羅的に検討した。また、各細胞が培養上清中に産生する exosome を精製し、その増殖能、sphere 形成能及び遺伝子発現に及ぼす影響についても検討した。

結果

各細胞における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞率は、いずれの細胞株においても約 1~2% であった。無血清浮遊培養系での sphere 形成試験において、rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群は陰性細胞群と比較して形成開始 3~5 日目において約 50% の sphere 数増加を示した。DNA マイクロアレイ解析の結果、rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群では、陰性細胞群と比較して Insulin growth factor(IGF)-2 遺伝子が約 60 倍高発現していることが明らかとなった。さらに、IGF-2 遺伝子発現を droplet digital PCR 法にて検討したところ、陽性細胞において約 20 倍の発現亢進を認め、ウエスタンブロッティング法においても IGF-2 蛋白の発現が亢進していた。遺伝子組換え rIGF-2 及び IGF-2 中和抗体の、rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞群における sphere 形成能に及ぼす影響を検討したところ、IGF-2 は陰性細胞群の sphere 形成能を約 20% 促進した。また、IGF-2 中和抗体は、陰性細胞群の sphere 形成能には影響を示さなかったが、陽性細胞群の sphere 形成能を低下させた。Bio-plex システムを用いた網羅的シグナリング解析の結果、rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群ではインスリン応答性シグナルである Akt パスウェイ関連分子のリン酸化が亢進していた。さらに rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞群の培養上清由来 exosome の各細胞における、sphere 形成能及び rBC2LCN 認識糖鎖の発現を検討したところ、陽性細胞由来 exosome は陰性細胞の sphere 形成能及び rBC2LCN 発現を促進した。

考察

本研究の結果、ES/iPS 細胞などの未分化な多能性幹細胞が発現する糖鎖構造を特異的に認識するレクチンである rBC2LCN が、口腔扁平上皮癌細胞の新たな癌幹細胞マーカーである可能性が示された。また、細胞生存、分化、増殖、アポトーシスに重要な機能を果たしている IGF-2 や細胞外分泌小胞である exosome が、口腔癌細胞における rBC2LCN 発現及び口腔癌幹細胞ニッチにおいて重要な機能を果たしていることが示唆されたことから、IGF-2 シグナル及び exosome を標的とした口腔癌の診断・治療法の

有用性が考えられた。

○その他学術雑誌に掲載された論文
特になし。