

## 学位論文題名

## Distinct epigenetic profiling in head and neck squamous cell carcinoma stem cells.

(頭頸部扁平上皮癌幹細胞における特異的なエピジェネティック・プロファイリング)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 癌細胞中の小集団である癌幹細胞は、自己複製能と多分化能を持ち、発癌、再発、転移、薬剤耐性に寄与しているという癌幹細胞説が、徐々に注目を浴びている。癌幹細胞説では、現在の化学療法は分化した癌細胞のみを標的としているため、化学療法後に癌幹細胞が再び癌を形成し、再発や薬剤耐性が生じているとしている。癌幹細胞は、乳癌、前立腺癌などで同定されており、頭頸部扁平上皮癌でも 2007 年に Prince らにより、頭頸部癌組織より分離された CD44 陽性細胞のみ腫瘍形成能を認めたと報告した。一方、癌細胞でのエピジェネティックな変化として、CpG アイランドの過剰メチル化による癌抑制遺伝子不活化や、CpG アイランドの脱メチル化による癌遺伝子活性化が報告されている。また、正常ヒト ES 細胞において、DNA メチル化は分化への誘導に不可欠である。そこで我々は、癌幹細胞に特異的に活性化、または不活性化されている遺伝子を網羅的に検索し、癌治療の標的とすることが可能であれば、頭頸部癌治療における break-through になりうると考えた。

【材料と方法】 5 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株 (HEp-2, MDA1986, SA-20B, T-409, TU-167) を用いた。それぞれの細胞株は、癌幹細胞のマーカーである CD44 抗体で処理後、フローサイトメトリーを用いて細胞表面の CD44 発現により CD44<sup>hi</sup> (CD44 高発現細胞群) と CD44<sup>low</sup> (CD44 低発現細胞群) に選別した。選別後は速やかに RNA と DNA 抽出、または *in vitro* アッセイを行った。各細胞群から RNA 抽出後、cDNA を合成し、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR では、CD44、BMI1 (BMI1 polycomb ring finger oncogene)、TERT (telomerase reverse transcriptase)、ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2)、Glis3 (transcription factor GLI-similar 3) の遺伝子発現を調べた。薬剤耐性試験では、各細胞群を 3 種類の抗癌剤 (ドセタキセル、シスプラチン、5-FU) で処理し、3 日間培養した。処理後はそれぞれの生存能の計測を行った。各細胞群から DNA 抽出後、14,956 の遺伝子をカバーしている 28,544 の CpG サイトを標的に DNA メチル化の網羅的解析を行った。その方法は、メチル化部位、または非メチル化部位と結合する 2 種類のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、それぞれのプローブからの蛍光を同定し、各細胞群の DNA メチル化の値を計測した。最後に、この DNA メチル化解析の結果を検証するため、制限酵素断片長多型法 (RELP 法) を用いて、プロモーターの過剰メチル化を解析した。薬剤耐性試験では 2 要因の分散分析 (two-factor ANOVA)、遺伝子発現の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。メチル化解析では、Illumina BeadStudio software を用いた。以上により選択された遺伝子により、5 種類の細胞株が CD44<sup>hi</sup> の細胞群と CD44<sup>low</sup> の細胞群に正しく分類されるかをクラスター解析と heat map generation で確認した。

【結果】 フローサイトメトリーで CD44 の発現を評価し、CD44 を高発現する上位 10%

の細胞群を癌幹細胞 (CD44<sup>hi</sup>)、CD44 を低発現する下位 10%の細胞群を非癌幹細胞 (CD44<sup>low</sup>) として 5 種類の細胞株から分離した。各細胞群に対して、リアルタイム PCR で幹細胞マーカーである 4 個の遺伝子 (CD44、BMI-1、TERT、ABCG2) について発現解析を行った。TU-167 を除いた 4 種の細胞株で、CD44<sup>low</sup> と比較して CD44<sup>hi</sup> が、有意に幹細胞マーカー遺伝子の発現亢進を認めた。CD44<sup>hi</sup> と CD44<sup>low</sup> の薬剤耐性試験を行った結果、すべての細胞株において、CD44<sup>hi</sup> は CD44<sup>low</sup> より有意に薬剤耐性を認めた。DNA メチル化の網羅的解析の結果、CD44<sup>low</sup> と比較して CD44<sup>hi</sup> に 17 個の脱メチル化遺伝子と 9 個の過剰メチル化遺伝子を同定した。17 個の CD44<sup>hi</sup> で脱メチル化された遺伝子の発現は、SQ-20B を除いて ( $p=0.3$ )、CD44<sup>low</sup> との間に有意差 ( $p < .05$ ) を認めた。9 個の CD44<sup>hi</sup> で過剰メチル化された遺伝子の発現は、TU-167 を除いて ( $p=0.7$ )、CD44<sup>low</sup> との間に有意差を認めた。17 個の CD44<sup>hi</sup> で脱メチル化された遺伝子と 9 個の CD44<sup>hi</sup> で過剰メチル化された遺伝子について、クラスター解析を行った結果、全ての細胞株の CD44<sup>hi</sup> と CD44<sup>low</sup> は、異なる群を形成した。5 種類の細胞株の CD44<sup>hi</sup> と CD44<sup>low</sup> について、リアルタイム PCR を用いて Glis3 の発現レベルを解析した。Glis3 は、細胞の分化に関与しており、癌幹細胞では分化を抑制し幹細胞としての特徴を維持するために、この遺伝子の発現が抑制されていると考えられている。その結果、TU-167 を除くすべての細胞株で、CD44<sup>low</sup> と比較して CD44<sup>hi</sup> において、Glis3 の発現が有意に抑制されていた。また、減少した Glis3 の発現は、Glis3 の過剰メチル化と相関していた。また、RELP 法を用いてプロモーターの過剰メチル化の確認を行ったところ、CD44<sup>low</sup> と比較して CD44<sup>hi</sup> に CPO (carboxypeptidase O) と HCCS (holocytochrome c synthase) の過剰メチル化を認めた。これらの結果は、DNA メチル化の網羅的解析の結果と一致した。

**【考察】** 本研究では DNA メチル化の網羅的解析を行い、頭頸部扁平上皮癌細胞株の CD44<sup>low</sup> と比較して、CD44<sup>hi</sup> で有意に脱メチル化された 17 個の遺伝子と過剰メチル化された 9 個の遺伝子を同定した。さらにこの結果を検証するため、リアルタイム PCR を用いて Glis3 の発現レベルを解析し、RELP 法を用いて CPO と HCCS のプロモーターの過剰メチル化を解析した。その結果、DNA メチル化の網羅的解析と同様の結果を得た。頭頸部扁平上皮癌幹細胞におけるこれら 26 個の遺伝子の正確な役割は未だ明らかではないが、Glis3 といった、既に幹細胞との関連が報告されている遺伝子も含まれていた。これらの遺伝子を同定することは、頭頸部扁平上皮癌幹細胞を根絶するための分子標的になる可能性がある。本研究は、癌幹細胞のエピジェネティックな制御に対する理解を深め、頭頸部扁平上皮癌幹細胞を標的とした革新的な治療の発展に、貴重な情報を寄与すると考えた。

**【結論】** 頭頸部扁平上皮癌幹細胞において、17 個の脱メチル化遺伝子と 9 個の過剰メチル化遺伝子からなる独特なエピジェネティック・プロファイルを認めた。これらの遺伝子は、癌幹細胞の幹細胞としての性質や多能性を維持するのに極めて重要と考えられ、頭頸部癌幹細胞を根絶することを目的とした癌治療の新たな分子標的治療の標的になる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 櫻 木 範 明  
副 査 教 授 白 土 博 樹  
副 査 教 授 福 田 諭

## 学位論文題名

### Distinct epigenetic profiling in head and neck squamous cell carcinoma stem cells.

(頭頸部扁平上皮癌幹細胞における特異的なエピジェネティック・プロファイリング)

頭頸部癌治療における課題として、切除不可能な原発巣と頸部リンパ節転移巣、化学療法に耐性を持った病変、遠隔転移巣に対する対処が挙げられる。これらの課題を解決するために、癌幹細胞説とエピジェネティック・チェンジに注目し、分子生物学的アプローチを用いて研究を行った。癌幹細胞説によれば、癌細胞中の小集団である癌幹細胞は、自己複製能と多分化能、腫瘍形成能を持ち、発癌、再発、転移、薬剤耐性に寄与しているとされている。一方、エピジェネティック・チェンジには DNA のメチル化が含まれ、正常ヒト胚性幹細胞において、DNA メチル化は分化への誘導に不可欠であるとされている。そこで、他の大多数の癌細胞と比較して、癌幹細胞に特異的な遺伝子を網羅的に検索し、癌治療の標的とすることが可能であれば、頭頸部癌治療におけるブレーク・スルーになりうると考えた。本研究では、頭頸部扁平上皮癌幹細胞に特異的な遺伝子の同定を試みたものである。フローサイトメトリーを用いて、CD44 の発現により 5 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株より癌幹細胞群 (CD44 高発現細胞群) と非癌幹細胞群 (CD44 低発現群) を選別回収した。選別後は速やかに RNA と DNA を抽出、または *in vitro* アッセイを行った。各細胞株の癌幹細胞群と非癌幹細胞群の間で、リアルタイム PCR を用いて幹細胞に特異的な遺伝子である CD44、BMI-1 (BMI1 polycomb ring finger oncogene)、TERT (telomerase reverse transcriptase)、ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) の発現比較を行った。また、抗癌剤 (ドセタキセル、シスプラチン、フルオロウラシル) への感受性の比較試験を行った。その結果、癌幹細胞群で有意に幹細胞に特異的な遺伝子の発現亢進、抗癌剤への耐性を認め、癌幹細胞群の癌幹細胞としての特徴を証明した。次に、Infinium HumanMethylation27 BeadChip キットを用いて DNA メチル化の網羅的解析を行った。その結果、非癌幹細胞群と比較して、癌幹細胞群で 17 個の脱メチル化された遺伝子と 9 個のメチル化された遺伝子を同定した。この 26 個の遺伝子について、クラスター解析を行った結果、全ての細胞株の癌幹細胞群と非癌幹細胞を明確に区別することができた。さらに、リアルタイム PCR、RELP (制限酵素断片長多型) 法を用いてメチル化解析の結果を検証したところ、結果の一致が認められた。頭頸部扁平上皮癌幹細胞において、これら 26 個の遺伝子の正確な役割は未だ明らかではないが、Glis3 (transcription factor GLI-similar 3) や GOSR1 (Golgi SNAP receptor complex member 1) といった、既に幹細胞との関連が報告されている遺伝子も含まれていた。今後これらの遺伝子の役割を同定することは、頭頸部扁平上皮癌幹細胞を根絶するための重要な分子標的になる可能性がある。本研究は、頭頸部扁平上皮癌幹細胞のエピジェネティックな制御に対する理解を深め、頭頸部扁平上皮癌幹細胞を標的とした革新的な治療の発展に貴重な情報を提供すると考えられた。

口頭発表後、副査・櫻木範明教授から本研究で同定した 26 個の遺伝子の癌関連性、頭頸部扁平上皮癌幹細胞のマーカーとしての CD44 の妥当性等に関して質問があった。次いで、

副査・白土博樹教授から beta-value の取り扱い等に関する質問がなされた。副査・福田諭教授から癌幹細胞の同定において CD44 以外の癌幹細胞マーカーの組み合わせ、組織検体での CD44 による免疫組織染色等に関して質問があった。最後に、主査・秋田弘俊教授から特異な結果を示した細胞株 TU-167 について、今後の研究の展望、臨床への応用に関して質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の研究結果や文献的考察に基づいて適切に回答した。

この論文は、癌幹細胞説に基づいた頭頸部扁平上皮癌幹細胞に関連した特異的な遺伝子を明らかにした点で高く評価され、今後の癌研究と治療への応用につながることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。