

# 論文審査の結果の要旨

氏名 厚海奈穂

本論文は、11章からなる。

## 第1章 序論

### 第2章 癌幹細胞マーカー候補のスクリーニング

分化型扁平上皮癌胞巣辺縁の細胞は、その形態や性質が正常上皮幹細胞と共通していることから、この癌胞巣辺縁細胞に癌幹細胞が含まれるという仮説を立てた。そこで、肺扁平上皮癌外科手術材料を用いて癌胞巣辺縁選択的に陽性となる分子の探索を行い、podoplanin (PDPN) を見出した。PDPN はヒト扁平上皮癌培養細胞株 A431 全細胞中の  $38.3 \pm 13.0\%$  に限局して発現するため、癌幹細胞を分取するマーカーとして適切だと考えられた。これより、PDPN が *in vivo* (癌組織内)、*in vitro* (A431 細胞) 両方において有用な、癌幹細胞マーカー候補であると考えた。

#### PDPN の癌幹細胞マーカーとしての妥当性の検討

(1) *in vitro* —ソーティングした A431 の PDPN<sup>+</sup> 細胞 (以下、PDPN<sup>+</sup>) の PDPN 陽性率が、ソーティング直後に比べて減少していったことから、PDPN<sup>+</sup> は PDPN<sup>+</sup> と PDPN<sup>-</sup> 細胞 (以下、PDPN<sup>-</sup>) を産生することが示唆された。一方、同様の検討で、PDPN<sup>-</sup>からは PDPN<sup>-</sup>しか産生されなかった。これらは、がん幹細胞の概念上の性質である、不均等分裂能および自己複製能と一致する結果であった。PDPN<sup>+</sup> は PDPN<sup>-</sup> よりも高いコロニー形成能と、doxorubicin への高い耐性を示した。

(2) *in vivo* —PDPN<sup>+</sup> と PDPN<sup>-</sup> とを免疫不全マウス皮下に移植して、PDPN<sup>+</sup> が高い腫瘍形成能を有することを示した。さらに、PDPN<sup>+</sup> が分化を伴った移植腫瘍を形成したことから、PDPN<sup>+</sup> は自己複製と、より分化した細胞の産生によって元の腫瘍を再構築することが示された。マウス尾静注による肺の癌胞巣形成モデルにおいても、これらが示された。PDPN<sup>+</sup> の腫瘍形成能の機構を探るために、他の種類の癌幹細胞で高発現している遺伝子発現を検討したところ、PDPN<sup>+</sup> は Sonic Hedgehog (SHH) を選択的に発現していた。SHH は癌の原因遺伝子でもあり、A431 を含めた扁平上皮癌培養細胞の増殖に寄与するので、SHH 発現が PDPN<sup>+</sup> の腫瘍形成能の原因である可能性が示唆された。

### 第3章 PDPN が癌幹細胞の機能を調節するかの検討

免疫不全マウス皮下移植モデルと、マウス尾静注モデルの両方において、PDPN ノックダウンによる腫瘍形成の抑制が確認された。また、PDPN ノックダウンにより、doxorubicin への耐性も抑制された。以上の結果から、PDPN は A431 PDPN<sup>+</sup> の腫瘍形成および薬剤耐性において機能を担うことが示唆された。

### 第4章 PDPN<sup>+</sup> / PDPN<sup>-</sup> A431 細胞および、A431 マウス移植腫瘍の癌胞巣辺縁 / 非辺

## 縁細胞の網羅的遺伝子発現解析

A431 移植腫瘍の癌細胞縁細胞と、非縁細胞とをレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により分取して、その遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、癌細胞縁細胞で PDPN が高発現していて、免疫染色の結果が裏付けられた。また、*in vitro* PDPN+ と LCM により得た *in vivo* の PDPN 陽性細胞は類似した遺伝子発現パターンを示した。これより、*in vitro* A431 から得た、高腫瘍形成能を有する PDPN+ が、癌細胞縁細胞を模倣する可能性が示唆された。また、*in vitro* と *in vivo* の両方の PDPN 陽性細胞で高発現していた複数の膜タンパクを、PDPN と組み合わせることで、さらに高い腫瘍形成能を有する、より少数の癌幹細胞の同定が可能になるかもしれない。

**第5章 臨床検体を用いた解析** 食道扁平上皮癌 PDPN 陽性原発巣のうち、転移巣も陽性であったのは 88.4% で、PDPN 陰性原発巣における陽性の転移巣の割合 (10.0%) より有意に高かった。これより、原発巣における PDPN 陽性細胞が転移先で腫瘍を形成しやすいことが示唆された。また、形成された転移巣は原発巣と同様に、分化を伴う癌細胞巣を形成したことから、PDPN 陽性細胞が癌の起点となり、転移先で元の腫瘍の組織型を再現したことが示唆された。

## 第6章～第11章

総括、実験材料と方法、謝辞、引用、図、表、凡例、(補足) 図、表、凡例

なお、本論文第2章の一部は、石井源一郎・小嶋基寛・真田賢・藤井聡志・落合淳志との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。