

# 稲田 美加 論文内容の要旨

主 論 文

Analysis of multiple markers for cancer stem-like cells in human thyroid carcinoma cell lines

ヒト甲状腺癌細胞株における癌幹細胞マーカーの網羅的解析

嶋村美加、永山雄二、松瀬美智子、山下俊一、光武範吏

(Endocrine Journal, 2014 in press)

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 放射線医療科学専攻  
(主任指導教員：永山雄二 教授)

## 【背景】

癌幹細胞は癌組織中に存在する少数の細胞で、自己複製能・分化能を持ち、癌の進展や転移に必須と考えられている。さらに、従来の放射線治療や化学療法に抵抗性であり、再発にも重要な役割を果たしていると考えられている。よって、癌幹細胞の同定と解析、さらにはそれらを標的とした治療法の開発は、癌克服のための大きな研究課題である。現在までのところ、種々の癌において癌幹細胞が同定され、そのマーカーや特徴が明らかにされつつあるが、甲状腺癌においては癌幹細胞の研究は幾つか散見されるものの、再現性のあるデータは報告されていない。よって本研究では、複数の甲状腺癌細胞株を用い、種々のマーカー候補について網羅的に検討することを目的とした。

## 【方法】

まず、8種類の甲状腺癌細胞株（未分化癌由来細胞株: FRO、KTC2/3、ACT1、8505C；乳頭癌由来細胞株: KTC1、TPC1；濾胞癌由来細胞株: WRO）を用いて、癌幹細胞同定法として最も信頼性が高いとされている免疫不全マウスにおける *in vivo* 腫瘍形成能と *in vitro* スフィア形成能を検討した。

次に、現在まで他臓器の癌幹細胞マーカーと報告されている9種類の細胞表面抗原（CD13、CD15、CD24、CD44、CD90、CD117、CD133、CD166、CD326）の発現と Aldefluor assay を用いた aldehyde dehydrogenase (ALDH) 酵素活性をフローサイトメトリー法にて解析した。これらマーカーの発現プロファイルを作製し、腫瘍形成細胞での共通のマーカーがないかを検討した。

さらに、個々の細胞株におけるマーカーの有用性を検討するため、セルソーターを用いて腫瘍形成細胞株において各細胞株で発現の見られた表面抗原の陽性分画と陰性分画（もしくは高発現分画と低発現分画）の細胞をソーティングし、スフィア形成能の違いを検討した。

また、スフィア形成に差が見られた分画において、幹細胞の特性である自己複製能、多分化能を調べた。

#### 【結果・考察】

8種類の癌細胞株のうち未分化癌由来である FRO、KTC3、ACT1、8505C の4つの細胞株だけに *in vivo* 腫瘍形成能が見られ、その他の細胞株では見られなかった。この結果より、これら4つの腫瘍形成細胞株は、他の細胞株に比べ多くの癌幹細胞を含んでいると思われた。また、*in vitro* スフィア形成能でも同じ細胞株でのみスフィア形成が見られたため、スフィアアッセイ法が、腫瘍形成能を評価できる代替手段となることが示唆された。

各細胞株のマーカー発現プロファイルでは、すべての細胞株において CD44 と CD166 の発現が見られ、CD133 はどの細胞株にも発現が見られなかった。ALDH 陽性細胞の割合も様々であったが、癌幹細胞を含んでいると考えられる4つの腫瘍形成細胞株のみに共通して見られるマーカーは見つからなかった。

そのため、個々の細胞株におけるマーカーの有用性を検討したところ、FRO、KTC3、ACT1 では ALDH 活性とスフィア形成能に高い相関が見られ、ALDH 活性が有用なマーカーの1つになることが示唆されたが、8505C では相関は見られず、ALDH が普遍的なマーカーとは確定できなかった。また、FRO では CD326 においてもスフィア形成能に有意な差が見られたため、これら2つのマーカー候補の関係性を二重染色で調べたところ、CD326<sup>hi</sup>分画では ALDH<sup>pos</sup>、ALDH<sup>neg</sup> の両分画を含んでいたのに対し、CD326<sup>low</sup>分画ではすべての細胞が ALDH<sup>neg</sup>分画である事がわかった。その後、それぞれの分画でスフィアアッセイを行うと、CD326<sup>hi</sup>/ALDH<sup>pos</sup>ではスフィア形成能が高く、CD326<sup>low</sup>/ALDH<sup>neg</sup>では低かった。しかしながら、CD326<sup>hi</sup>/ALDH<sup>neg</sup>分画でも CD326<sup>hi</sup>/ALDH<sup>pos</sup>と同様にスフィア形成能は高く、FRO 細胞においては CD326 は ALDH 活性より厳密なマーカーになる可能性が示唆された。

最後に、FRO で有意にスフィア形成能に差があった分画で幹細胞の特性である自己複製能、分化能を検討した。その結果、陰性細胞から陰性細胞と陽性細胞へ、陽性細胞から陽性細胞と陰性細胞への両方向への変化が見られ、癌幹細胞と非癌幹細胞間での可逆的移行、すなわち可塑性が示唆された。

以上より、甲状腺癌幹細胞のマーカー候補として ALDH 活性が最も有力ではあるものの、これが普遍的なマーカーではなく、さらには個々の症例によってマーカーが異なる可能性も示唆され、今後もさらなる検討が必要であると考えられた。