



Title	口腔扁平上皮癌における 3D スフェロイドとシスプラチン耐性細胞を用いた癌幹細胞様性質の網羅的遺伝子発現解析
Author(s)	光吉, 希
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105329
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 光 吉 希 ）	
論文題名	口腔扁平上皮癌における 3D スフェロイドとシスプラチン耐性細胞を用いた癌幹細胞様性質の網羅的遺伝子発現解析
論文内容の要旨 【序論】 口腔扁平上皮癌（Oral Squamous Cell Carcinoma；OSCC）は、口腔癌の約 90% を占め、進行期では 5 年生存率が約 50% 台まで低下する予後不良な悪性腫瘍である。標準治療として手術を中心とした集学的治療が行われているが、一定の割合で再発を来し、再発・転移症例に対するシスプラチンを用いた化学放射線療法や免疫チェックポイント阻害薬の治療効果も限定的であることから、治療抵抗性は依然として大きな臨床課題となっている。近年、これら治療抵抗性や腫瘍再発の背景因子として、癌幹細胞（Cancer Stem Cell；CSC）の関与が注目されている。乳癌など一部の癌種では、細胞表面マーカーに基づく CSC 集団の分離手法が確立されてきた一方で、OSCC においては CSC 関連マーカーは、確立されておらず、特定の細胞集団として CSC を定義することには限界がある。さらに、OSCC の CSC 研究において、三次元（3D）培養環境と薬剤選択圧を組み合わせ、CSC 様性質を包括的かつ体系的に解析した研究は依然として限定的である。そこで本研究では、細胞周期を可視化する Fucci システムを導入した OSCC 細胞株 SAS-Fucci を用い、マトリゲル 3D 培養、およびシスプラチン耐性獲得を組み合わせた新規 <i>in vitro</i> CSC モデルを構築し、機能解析および網羅的遺伝子発現解析を通じて、OSCC における CSC 様性質の分子背景を明らかにすることを目的とした。 【方法】 本研究では、OSCC における CSC 様性質に関わる分子機構を解明し、新規治療標的を同定することを目的とした。まず、腫瘍微小環境を模倣する 3D 培養モデルとして、SAS-Fucci 細胞をマトリゲル中で培養した。これにより、二次元（2D）培養条件と比較した際の細胞周期分布および CSC 様性質の獲得の有無を評価した。3D 培養した SAS-Fucci を normal 3D SAS と定義した。 次に、CSC 様性質の誘導を目的として、SAS-Fucci に対してシスプラチンを用いた長期暴露を行った。初期 half maximal inhibitory concentration（IC50）を算出した後、シスプラチン投与と回復培養を反復することで耐性株を樹立し、これを cisR 2D SAS と定義した。さらに、耐性獲得細胞をマトリゲル 3D 培養条件下で培養した細胞を cisR 3D SAS とした。 作製した各細胞群（normal 2D, normal 3D, cisR 2D, cisR 3D）に対して、フローサイトメトリーを用いた CD44 発現解析および RT-qPCR による CSC 関連遺伝子（<i>CD44</i> , <i>ALDH1</i> など）の発現解析を行った。 細胞周期動態の評価には Fucci システムを用い、生細胞イメージングにより G0/G1 期および S/G2/M 期に属する細胞の比率を定量した。さらに、CSC の機能的指標である自己複製能を評価するため、セルソーターを用いて単一細胞播種を行い、Single-cell Spheroid Formation Assay によりスフェロイド形成能を比較した。薬剤耐性の評価としては、形成された多細胞スフェロイドに対してシスプラチンを投与し、処理後のスフェロイド径の変化量を指標として感受性を定量化した。 加えて、CSC 様性質を獲得した細胞群を対象として RNA シークエンス解析を実施し、網羅的遺伝子発現データに基づく Differentially Expressed Gene（DEG）の抽出、Gene Ontology（GO）解析および Gene Set Enrichment Analysis（GSEA）解析を行った。さらに、Venn 解析により共通高発現遺伝子群を抽出し、公開臨床データベースを用いた生存解析と統合することで、CSC 様性質の誘導・維持に関与する候補因子を同定した。 【結果】 SAS-Fucci に対してシスプラチン長期暴露を行った結果、初期 IC50 と比較して上昇し、有意に IC50 が増加し、シスプラチン耐性を獲得した細胞集団（cisR 2D SAS）が樹立された。さらに、cisR 2D SAS をマトリゲル 3D 培養条件下で培養することで、cisR 3D SAS を作製した。 フローサイトメトリー解析では、normal 2D SAS, normal 3D SAS , cisR 2D SAS , cisR 3D SAS の全群において CD44 陽性細胞は高率に存在しており、有意な差を示さなかった。一方で、cisR 2D SAS および cisR 3D SAS では、	

normal 2D SAS と比較して CD44 強陽性細胞集団の比率が有意に増加した。

RT-qPCR 解析では、cisR 2D SAS において、normal 2D SAS と比較して、*CD44*, *ALDH1* が有意に高発現した。また、normal 3D SAS および cisR 3D SAS において、*CD44*, *CD133* に加え、*SOX2*, *OCT4*, *c-MYC*, *KLF4*, *NANOG* など、自己複製および未分化性維持に関与する転写因子が有意に高発現した。

Fucci システムを用いた細胞周期解析では、normal 3D SAS, cisR 2D SAS, および cisR 3D SAS において、G0/G1 期細胞の比率が normal 2D SAS と比較して有意に増加した。特に cisR 3D SAS において、G0/G1 期細胞の比率は、最も高値を示した。Single-cell Spheroid Formation Assay においては、cisR 2D SAS は、normal 2D SAS と比較してスフェロイド形成能が有意に亢進した。また、RNA シークエンス解析の結果、マトリゲル 3D 培養およびシスプラチン耐性獲得の両条件に共通して、脂肪酸代謝や NAD 代謝を含むエネルギー代謝関連遺伝子群の有意な発現変動が示された。Venn 解析により、CSC 様性質を獲得した群に共通して高発現する遺伝子群が抽出され、これらの遺伝子群を公開臨床データベースと統合解析した結果、膜貫通型細胞接着分子である PCDHB2 が、OSCC 患者において高発現群で有意に生存率が低下する候補因子として同定された。次に、cisR 2D SAS を対象として ゲノム編集を行い、*PCDHB2* 発現抑制群 である PCDHB2 - cisR 2D SAS を用い、機能評価を実施した。RT-qPCR 解析により、*PCDHB2* の発現抑制に伴い、*CD44* および *ALDH1* の遺伝子発現が有意に低下した。

Fucci システムを用いた細胞周期解析を行った結果、PCDHB2 - cisR 2D SAS において、G0/G1 期細胞の比率は、cisR 2D SAS と比較して有意に減少した。さらに、PCDHB2 - cisR 2D SAS に対してシスプラチン処理を行った結果、cisR 2D SAS と比較してシスプラチン感受性が有意に増加した。

【考察】

本研究では、OSCC 細胞に対して、腫瘍微小環境を模倣するマトリゲル 3D 培養と、シスプラチン長期暴露という異なる条件を付与し、複数の評価系を組み合わせる CSC 様性質を解析した。本研究で構築した *in vitro* CSC モデルを用いて、他癌種で報告されている代表的な CSC 関連マーカーである CD44 の発現率をフローサイトメトリーにて解析した結果、CD44 陽性細胞が全群で高率に存在していた一方、シスプラチン耐性獲得細胞では CD44 強陽性細胞集団が有意に増加した。OSCC においては、単一の表面マーカーによって CSC 集団を明確に定義することが難しいことが指摘されており、本研究の結果も、CSC 評価においては発現陽性の有無のみではなく、他の機能指標を併せて解釈する必要があることを示すものと考えられた。次に細胞周期に関して、Fucci システムを用いた解析では、マトリゲル 3D 培養およびシスプラチン耐性獲得細胞において G0/G1 期細胞の比率が有意に増加した。細胞周期の静止状態は、抗がん剤に対する感受性低下や生存能の維持と関連することが知られており、本研究において G0/G1 期細胞の増加が確認された点は、OSCC における治療抵抗性と細胞周期動態との関連を検討する上で重要な所見であった。

さらに、機能的評価として Single-cell Spheroid Formation Assay を行った結果、シスプラチン耐性獲得細胞でスフェロイド形成能が有意に亢進した。スフェロイド形成能は、CSC の代表的な機能である自己複製能の指標であり、遺伝子発現変化や細胞周期変化と併せて評価することで、OSCC における CSC 様性質を機能面から裏付ける結果になったと考えられた。

また、RNA シークエンス解析を行った結果、CSC 様性質を示す群に共通して、脂肪酸代謝や NAD 代謝を含むエネルギー代謝、ならびに抗酸化作用に関連する遺伝子群の変動が示された。これらの所見は、OSCC においても代謝制御が CSC 様性質と関連する可能性を示唆するものであり、既報で指摘されている代謝リプログラミングとの整合性が高いと考えられた。また、Venn 解析で抽出した共通高発現遺伝子群を臨床データと統合解析した結果、PCDHB2 が予後と関連する候補因子として同定された。PCDHB2 は細胞接着分子に分類される分子であり、細胞間相互作用や微小環境との関係を介して CSC 様性質に関与する可能性が考えられた。さらに、cisR 2D SAS において *PCDHB2* 発現抑制細胞を用いて、機能評価を行った結果、CSC 関連遺伝子発現の低下、G0/G1 期細胞の比率の減少、およびシスプラチン感受性の増加を示した。これらの結果は、PCDHB2 が OSCC における CSC 様性質および治療抵抗性に関与する候補因子の一つであることを、機能面から支持する結果であると示唆された。

【結論】

OSCC 細胞株である SAS-Fucci を用いたマトリゲル 3D 培養法およびシスプラチン耐性獲得細胞を組み合わせた本モデルは、有用な新規 *in vitro* CSC モデルであることが示された。

SAS-Fucci において、エネルギー代謝や抗酸化作用機構は、CSC 様性質を特徴づける重要な機能である可能性が示唆され、PCDHB2 は SAS-Fucci における CSC 様性質の誘導や維持を調節する因子である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （ 光 吉 希 ）			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	田中 晋
	副 査	教授	鵜澤 成一
	副 査	教授	波多 賢二
	副 査	講師	宇佐美 悠

論文審査の結果の要旨

本研究では、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞株を用い、マトリゲル 3D 培養法およびシスプラチン長期曝露により *in vitro* 癌幹細胞 (CSC)モデルの構築を試みるとともに、CSC 様性質の制御に関与する候補因子の探索を目的として検討を行った。

その結果、構築されたモデルは、有用な新規 *in vitro* CSC モデルであることが示された。また、PCDHB2 は、OSCC における CSC 様性質の誘導に関わる因子である可能性が示唆された。

以上の結果は、OSCC における CSC 様性質に関わる分子機序を解明する上で重要な知見を提供するものであり、よって博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。