

Title	SSEA-3 as a novel amplifying cancer cell surface marker in colorectal cancers
Author(s)	鈴木, 陽三
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59801">https://hdl.handle.net/11094/59801</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	すずき ようぞう 鈴木 陽三
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 25941 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	SSEA-3 as a novel amplifying cancer cell surface marker in colorectal cancers  (大腸癌における増殖癌細胞表面マーカーとしての SSEA-3)
論文審査委員	(主査) 教授 森 正樹  (副査) 教授 松浦 成昭 教授 竹原 徹郎

## 論文内容の要旨

## 【目的】

Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) は糖脂質であり、その発現はヒト正常胚細胞, embryonic stem cell (胚性幹細胞; ES 細胞) induced stem cell (誘導多能性幹細胞; iPS 細胞) の他、正常組織間質に少数存在する多能性幹細胞 (Muse 細胞) にみられ、細胞が分化するにつれて減弱・消失していくことが知られており、未分化性を有した細胞を分離する有用な細胞表面 marker であると考えられる。SSEA-3<sup>+</sup> 細胞の存在は一部の癌種においても報告されているが消化器癌においては全く解明されていない。一方、近年癌においても自己複製能を有する幹細胞様細胞集団が存在することが知られるようになり癌幹細胞 (cancer stem cell; CSC) と称されている。癌幹細胞は癌を構成する階層構造の基盤として癌の維持に重要な役割を果たしている。SSEA-3<sup>+</sup> 癌細胞は幹細胞性を有することが示唆されるものの、CSC としての性質に関する報告は無い。そこでわれわれは、大腸癌においてSSEA-3<sup>+</sup> 細胞が実際に存在するのか、SSEA-3<sup>+</sup> 細胞がどのような生物学的特性を持つのかについて、癌の幹細胞生物学と関連付けて解明することを目的に研究を行った。

## 【方法ならびに成績】

正常部と癌部を含むヒト大腸癌切除標本 10例 (高分化腺癌 2例, 中分化腺癌 6例, 低分化腺癌 2例) の凍結切片を用いてヒト大腸癌における SSEA-3 の発現を蛍光免疫染色で評価した結果、正常部では間質に一部みられるのみであったが、癌部では高分化腺癌で 50% (2例中 1例), 中分化腺癌で66.7% (6例中 4例), 低分化分腺癌で100% (2例中 2例) と分化度の低い症例でより高頻度に発現が認められ、SSEA-3<sup>+</sup> 細胞数も多い傾向がみられた。Flow cytometry により6種類のヒト大腸癌細胞株 (Caco-2, DLD-1, HT-29, SW480, HCT116, およびCaR-1) を用いてSSEA-3 の発現を評価した結果、CaR-1 を除く5種で発現が認められた。SSEA-3 の発現は Caco-2, DLD-1, HT-29, SW480 で 0.1~0.2% とわずかであったが、分化度の低い HCT116 で高く (21.7±8.3%), その発現は細胞蛍光免疫染色によって裏付けられた。以下、HCT116 を用いてSSEA-3 の発現の有無による細胞学的特性の相違を評価した。Flow cytometry により SSEA-3 と既知の幹細胞 marker (CD44, CD166, ALDH, CD24) および間葉系幹細胞/Muse細胞 marker (CD105) との相違を評価した結果、SSEA-3 とそれらとの関連はみられず、またHCT116 に CD105<sup>+</sup> 細胞分画は認められなかった。Flow cytometer で単離した SSEA-3<sup>+</sup> 細胞の持つ幹細胞性について SSEA-3<sup>+</sup> 細胞と比較して評価した結果、SSEA-3<sup>+</sup> 細胞が SSEA-3<sup>-</sup> 細胞と比べて腫瘍形成能 (in vivo) はやや優り、増殖能 (in vivo, in vitro) も有意に高かったが、sphere 形成能は有意に劣っていた。また、正常 SSEA-3<sup>+</sup> 細胞で発現の高い iPS 関連遺伝子 (Oct4, NANOG, SOX2 および c-MYC)

の発現について quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) および Western blot 法で調べた結果、Oct4 および SOX2 はSSEA-3<sup>+</sup> 細胞と SSEA-3<sup>-</sup> 細胞の間で有意差は見られず、NANOG と c-MYC は SSEA-3<sup>+</sup> 細胞の方が SSEA-3<sup>-</sup> 陰性細胞よりもむしろ低かった。増殖能の相違の背景を知るために double thymidine block 法による細胞周期解析を行った結果、SSEA-3<sup>+</sup> 細胞は SSEA-3<sup>-</sup> 細胞と比べて G1 期から S 期および S 期から G2 期への移行が有意に早かった。細胞周期の長さの違いの背景を知るために Western blot 法による細胞周期関連因子の発現を評価した結果、SSEA-3<sup>+</sup> 細胞の p21<sup>Cip1/Waf1</sup> および p27<sup>Kip1</sup> の発現がSSEA-3<sup>-</sup> 細胞と比べて有意に低かった。

## 【総括】

大腸癌において SSEA-3<sup>+</sup> 細胞は未分化腺癌において発現が高い傾向がみられた。大腸癌における SSEA-3<sup>+</sup> 細胞は、SSEA-3<sup>-</sup> 細胞と比べて増殖能・腫瘍形成能は高いが sphere 形成能は低く、また reprogramming 関連遺伝子の発現様式もむしろ低い傾向がみられるなど、正常の SSEA-3<sup>+</sup> 細胞とは少なくともその遺伝子発現様式などにおいて相違がみられ、幹細胞性のやや低い状態まで分化しながら旺盛な増殖能を保った癌前駆細胞としての性質を持つ細胞集団であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) は糖脂質で、ヒト多能性幹細胞に発現するが分化するにつれて消失する。大腸癌におけるSSEA-3<sup>+</sup> 細胞の存在と特性を癌幹細胞性との関係から明らかにすることを目的に研究が行われた。ヒト大腸癌切除標本の凍結切片を用いてSSEA-3 の発現を蛍光免疫染色で評価した結果、分化度の低い症例でより高頻度に発現が認められた。Flow cytometry によりヒト大腸癌細胞株を用いてSSEA-3 の発現を評価した結果、分化度の低いHCT116 で特に高い発現がみられた。既知の癌幹細胞 markerとSSEA-3とで共染色すると陽性細胞群をさらに2群に大別できたが相関はみられなかった。SSEA-3<sup>+</sup> 細胞は SSEA-3<sup>-</sup> 細胞と比べて腫瘍形成能・増殖能が高いが自己複製能・iPS 関連遺伝子の発現が低く、p21<sup>Cip1/Waf1</sup> および p27<sup>Kip1</sup> の発現低下による早い細胞周期移行がみられた。

本研究によって、大腸癌における SSEA-3<sup>+</sup> 細胞は、幹細胞性のやや低い状態まで分化しながら旺盛な増殖能を保った癌前駆細胞としての性質を持つ細胞集団であることがはじめて明らかとなった。

以上の内容は癌研究における新たな知見と考えられるため学位の授与に値すると考えられる。