

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 佐藤 史幸

### 学位論文題名

チロシンキナーゼ阻害薬を用いた食道扁平上皮癌がん幹細胞を標的とした治療法の開発  
( Development of treatment against cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by tyrosine kinase inhibitors )

#### 【背景と目的】

食道扁平上皮癌は世界的に部位別死亡数で 6 番目、部位別罹患率では 8 番目の致死的な癌種として知られている。ごく早期のものであれば内視鏡的治療、局所進行性であれば化学放射線療法や手術が適応となるが、進行した食道癌はその治療法が限られており、生物学的悪性度が高い事から未だに予後不良である。

癌幹細胞は近年多くの癌種で特定されており、癌の悪性度に深く寄与していると考えられる。癌幹細胞は自己複製能や多分化能を持ち、その上で高い浸潤能と化学療法や放射線療法への治療抵抗性を有している。このような癌幹細胞の特性が、結果的に再発や転移、既存の治療法に対する抵抗性を引き起こす。このため進行した食道癌に対する治療も含め、今後は癌の新たな治療戦略として、この癌幹細胞を標的とした治療の確立が必要と考えられる。

CD44 は食道扁平上皮癌や頭頸部扁平上皮癌及び肺扁平上皮癌などにおいて癌幹細胞のマーカーとして使用されており、食道扁平上皮癌においても CD44 の発現の高い腫瘍細胞は腫瘍形成能が高い事が報告されている。また種々の癌種において CD44 の発現が高い癌幹細胞は間葉系の表現型を持っており、その維持に EMT (上皮間葉転換) が重要な役割を担っている。TGF- $\beta$ 1 が誘導する EMT により、CD44 低発現細胞が CD44 高発現細胞に転換される。さらに、食道扁平上皮癌において EMT は腫瘍浸潤部の腫瘍細胞で認められ、EMT が多く認められる症例は予後不良である。

EGFR は食道扁平上皮癌においてしばしば過剰発現しており、TGF- $\beta$ 1 によって誘導される EMT において重要な役割を担っている。従って、食道扁平上皮癌の腫瘍浸潤部における EMT は CD44 高発現癌幹細胞にとって重要であり、EGFR はその食道扁平上皮癌の癌幹細胞に対する新たな治療標的となり得ると考えられる。しかし、食道扁平上皮癌の癌幹細胞に対する EGFR 阻害薬の効果は現在まで十分に検証されておらず、その有効性を示した報告はない。そこで今回我々は organotypic 3-D culture を用いて食道扁平上皮癌の癌幹細胞に対する EGFR 阻害薬の効果を検証する事を本研究の目的とした。

#### 【材料と方法】

EPC2T と OKF6T の 2 つの cell line を使用し実験を行った。CD24 及び CD44 の抗体を用いて染色し Fluorescence activated cell sorter(FACS)にて細胞分布を調べ、それぞれの細胞集団について western blotting, real-time RT-PCR, colony formation assay, MTS assay を行いタンパク発現、遺伝子発現、非足場依存性腫瘍形成能、薬剤抵抗性について比較検討を行った。

次に EGFR 阻害薬 (Erlotinib, Cetuximab), TGF- $\beta$ 1 を単独もしくは同時投与し FACS

にて細胞分布の変化を調べ EGFR 阻害薬の効果を検討するとともに、real-time RT-PCR にて EGFR 阻害薬を投与する事による EMT や分化に関与する遺伝子発現の変化を検討した。

最後に 3 次元培養法を用いて、より生体内に近い環境下で腫瘍細胞を培養し腫瘍に対する EGFR 阻害薬の効果を免疫染色、FACS により検討した。

#### 【結果】

EPC2T と OKF6T は FACS で CD44<sup>Low</sup>/CD24<sup>High</sup> と CD44<sup>High</sup>/CD24<sup>Low</sup> の二つの細胞集団として認められ、CD44<sup>Low</sup>/CD24<sup>High</sup> の細胞は遺伝子及びタンパク発現で上皮系マーカーが有意に発現している一方で、CD44<sup>High</sup>/CD24<sup>Low</sup> の細胞では間葉系マーカーや EMT 関連の転写因子が有意に高く、非足場依存性腫瘍形成能や薬剤抵抗性も有しており癌幹細胞の特徴を有していた。

次に FACS にて EGFR 阻害薬の効果を検討したところ、非癌幹細胞集団において分化を誘導し EMT を抑制する事で EMT による癌幹細胞の増加を抑制する事が示唆されたが、既存の癌幹細胞に対しての効果は認められなかった。遺伝子発現でも EGFR 阻害薬を投与する事で、分化マーカーの発現が上昇する一方で EMT に重要な転写因子である ZEBs の発現は抑制される結果であった。

最後に 3 次元培養法にて EGFR 阻害薬の効果を検討したところ EGFR 阻害薬を投与する事により EGFR 活性が抑制され、上皮系マーカーである E-cadherin の発現が上昇し、腫瘍の増生や浸潤も抑制された。腫瘍増殖能についても Ki67 陽性細胞は EGFR 阻害薬により著明に減少した。腫瘍細胞の CD44 発現については EGFR 阻害薬投与により抑制され、実際に腫瘍を分離し FACS を行ったところ CD44<sup>High</sup>/CD24<sup>Low</sup> の細胞集団は減少していた。

#### 【考察】

本研究では EGFR 阻害薬は ZEBs の発現を抑制し EMT を防ぐ事により癌幹細胞の維持及び増加を抑制できる結果を得た。さらに癌幹細胞を抑制すると同時に、ZEBs の中でも食道扁平上皮癌の EMT において特に重要な ZEB1 の発現が低下する事によりケラチノサイトの分化も誘導すると考えられた。しかしながら、既存の癌幹細胞に対しては EGFR 阻害薬の効果は認められず、既存の癌幹細胞は EGFR の阻害に対して治療抵抗性であると考えられた。このため、EGFR 阻害は TGF- $\beta$ 1 など周囲の微小環境からの影響による癌幹細胞の維持及び増加に対して効果的であると証明できたが、一方で進行食道扁平上皮癌の根治には併せて既存の癌幹細胞を標的としたさらなる治療戦略の確立が必要と考えられた。

3 次元培養では EGFR 阻害薬は腫瘍の増生を抑制し、腫瘍浸潤部で起きている EMT を抑制する事により腫瘍浸潤を抑制した。今回の研究結果では、癌幹細胞の発生及び維持に適した環境を与えるのに、食道扁平上皮癌の浸潤部においてニッチが組織されている可能性が示唆された。この癌幹細胞ニッチは癌幹細胞の治療標的となりうる可能性も考えられる。この 3 次元培養系の限界点として、癌幹細胞ニッチに重要な炎症細胞や血管内皮細胞などは含まれていない事が挙げられる。癌幹細胞及び癌幹細胞ニッチをさらに正確に理解するためには新たな 3 次元培養系の構築、*in vivo* での食道扁平上皮癌モデルを用いたさらなる研究が重要と考えられた。

#### 【結論】

EMT は癌幹細胞の増幅及び維持に重要な過程であり、EMT が生じている食道扁平上皮癌の浸潤部は癌幹細胞ニッチを形成していると考えられた。EGFR 阻害薬はこの浸潤部での EMT を抑制し、食道扁平上皮癌の癌幹細胞の増幅及び維持に対する一つの治療オプションとなり得ると考えられた。