

氏名（本籍）	富安 聡（山口県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博甲産第14号
学位授与年月日	平成26年 3月23日
学位授与の要件	倉敷芸術科学大学学位規定第4条第3項第1号該当
学位論文題目	子宮体癌における癌幹細胞の生物学的特性解析
論文審査委員	主査 教授 坂口 卓也 副査 教授 須見 洋行 教授 岡 憲明

論文内容の要旨

癌幹細胞とは、腫瘍組織内に極少数存在し、自己複製能・分化能・造腫瘍能を有しており、癌の発生・維持に関与している細胞である。また、癌幹細胞は薬剤排出能や DNA 修復能により化学療法や放射線療法に抵抗性を示すと共に、浸潤能が亢進していることから癌の再発、転移に関与している。従って、癌幹細胞が存在する限り、癌の根治は困難であると考えられている。癌幹細胞は、1997 年に急性骨髄性白血病において白血病幹細胞として最初に同定された。これを契機に様々な固形腫瘍においても癌幹細胞が同定され、その特性解析が行われており、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が進められている。しかし、子宮体癌については、近年、食の欧米化に伴い増加傾向にあるものの、癌幹細胞は同定されておらず、解析が進んでいないのが現状である。

通常、癌幹細胞を分取するためには、癌幹細胞の薬剤排出能に基づき細胞を DNA 結合蛍光色素である Hoechst 33342 (Hoechst) により染色し、紫外線レーザーを用いて励起することで side population (SP) 分画に存在する細胞 (SP 細胞) として検出する必要がある。しかし、従来用いられている紫外線レーザー搭載型セルソーターは、高価な大型機器であり、紫外線を照射することから細胞の DNA に損傷をもたらす。さらに操作やメンテナンスが煩雑であることから専門のオペレーターを必要とする。以上の点が、SP 細胞分取による癌幹細胞研究の妨げとなっている。

本研究は、これら紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服することのできる紫色レーザー搭載型 FACSria を用いた新規解析法による子宮体癌幹細胞の分取法の確立と、さらにその子宮体癌幹細胞を選択的に標識する分子マーカーを探索した結果に関するものである。

第 1 章では、癌幹細胞の概念とその同定、再発・転移への関与について詳細に記述した。また、本邦における子宮体癌の現状（罹患率、治療法、発癌機構）とその問題点について記述し、癌幹細胞の研究対象としての重要性を述べた。

第 2 章では、ヒト子宮体癌細胞株より紫色レーザー搭載型 FACSria を用いて、紫外線レーザー

搭載型セルソーターを用いた場合と同様に SP 細胞を検出することが可能か否か検討した結果について記述した。高分化型、中分化型、低分化型のヒト子宮体癌細胞株 3 株を対象に Hoechst 染色を施し、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法により SP 細胞の存在率を解析した。その結果、それぞれの細胞株において薬剤排出能を阻害する verapamil を投与することで消失する細胞集団を検出することができた。従って、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた新規解析法は、紫外線レーザー搭載型セルソーター同様に SP 細胞を検出することが可能であると示唆された。

第 3 章では、細胞造腫瘍能解析系の確立について記述した。第 2 章において紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いた SP 細胞の分取法を確立した。しかし、分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するためには、自己複製能、分化能、造腫瘍能を解析する必要がある。特に、造腫瘍能は *in vivo* でのみ解析が可能である。そこで、分化度の異なる細胞株 3 株を免疫不全マウスへ移植し、造腫瘍能解析系の確立を目指した。また、SP 細胞を紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取する際には細胞を 4° C で 9 時間保存することになるため、その影響についても合わせて検討した。その結果、低分化型の細胞株は他の細胞株と比較して高い造腫瘍能を示した。また、細胞を 4° C で 9 時間保存することにより対照群と比較して腫瘍形成までにかかる期間の遅延が認められたが、腫瘍形成が認められたため、この実験系を用いて紫色レーザー搭載型 FACS Aria より分取した SP 細胞の造腫瘍能を解析することが可能であると示唆された。

第 4 章では、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて新規解析法により分取した SP 細胞中に癌幹細胞が存在することを証明するため、第 3 章の検討において最も高い造腫瘍能を示した低分化型細胞株の SP 細胞および非癌幹細胞で構成されていると考えられる main population (MP) 細胞を対象に自己複製能、分化能、造腫瘍能の解析を行った。その結果、SP 細胞は SP 分画を維持すると共に、MP 細胞へと分化し、自己複製能および分化能を有する細胞であることが確認された。また、SP 細胞は MP 細胞と比較して *in vivo* において高い造腫瘍能を示した。さらに、*in vitro* においても *in vivo* 同様に SP 細胞は高い増殖能を示した。これらの結果より、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中には子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。従って、癌幹細胞は、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取することが可能であり、癌幹細胞研究に有用な分取機器の一つに成り得ることが示唆された。

第 5 章では、子宮体癌幹細胞分子マーカーの探索について記述した。第 2 章および第 4 章より紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて分取した SP 細胞中に子宮体癌幹細胞の存在が証明されたことから、SP 細胞に特異的に発現する分子を検索することで、子宮体癌幹細胞分子マーカーの同定を試みた。そこで、子宮体癌の発生に関与していることが知られている Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) に着目し、KRAS の発現について mRNA および蛋白発現解析を行った。その結果、SP 細胞では KRAS の mRNA および蛋白発現共に MP 細胞と比較して有意に高値を示した。このことから、KRAS が子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーと成り得ることが示唆された。また、近年の癌幹細胞研究において、マウス卵巣上皮細胞に C-myc および v-Ki-ras2 Kirsten rat

sarcoma viral oncogene homolog (Kras) を導入することで卵巣癌幹細胞が作製できたという報告がある。この報告より、ヒトの子宮体癌幹細胞の発生・維持においても KRAS が関与していることが考えられる。

以上の結果から、紫外線レーザー搭載型セルソーターを用いた場合と同様に、紫色レーザー搭載型 FACS Aria を用いて SP 細胞を分取できることが示された。また、ヒト子宮体癌細胞株より分取した SP 細胞は、自己複製能および分化能を有すると共に、MP 細胞と比較して高い造腫瘍能を有することから、SP 細胞中に子宮体癌幹細胞が存在することが証明された。さらに、悪性度の高いヒト子宮体癌細胞株において、SP 細胞は KRAS 陽性細胞を優勢に含むことから、癌幹細胞は KRAS を発現し、癌の発生・維持に関与していると考えられる。加えて、KRAS は高悪性度の子宮体癌において癌幹細胞分子マーカーとして診断に有用であることが示された。また、紫色レーザー搭載型 FACS Aria は紫外線レーザー搭載型セルソーターの欠点を克服しており、この技術を用いた癌幹細胞分取の報告は、本研究が最初である。従って、本研究で提示した紫色レーザー搭載型 FACS Aria による癌幹細胞分取法を検討評価することにより、癌幹細胞研究の更なる効率化が期待される。

審査結果の要旨

癌細胞は体細胞に遺伝子変異が蓄積し発生するものと理解され、癌細胞特性を解析することで、癌発生機構の解明そして癌の診断と治療が成立すると考えられて来た。だが近年、癌幹細胞という癌細胞を産生する源泉の存在が報告され、その特性解析が急務とされている。既に特定の癌種については癌幹細胞が同定され、その知見を基盤として新規診断・治療が画策されているが、富安君は国内において罹患者が急増しているにもかかわらず癌幹細胞の同定されていない子宮体癌に着目した。博士論文において彼は、子宮体癌癌幹細胞の生物学的特性解析を行い、悪性度の高い低分化型子宮体癌細胞株に増殖と密接に関連する Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) 遺伝子を高発現する細胞群の存在を見出した。この細胞群は、薬剤排出能・造腫瘍能・自己複製能・分化多能性を併せ持つことから癌幹細胞と考えられ、子宮体癌癌幹細胞を同定した最初の報告として本研究を高く評価することが出来る。

この結果から KRAS を指標とする新しい子宮体癌診断技術の開発が期待されるが、解析のプロセスで癌幹細胞を検出する新しい技術を確立したことで、本研究の価値はより高く評価されるであろう。従来癌幹細胞は紫外線レーザーを搭載する細胞分取機器 FACS Vantage を用いて分取されて来たが、この機種は高価であり操作が難しく、紫外線レーザーを用いる結果として細胞損傷が想定されるという欠点があった。これら欠点を克服すべく、紫色レーザー搭載型細胞分取機器 FACS Aria を用いることで前記の欠点を改善する細胞分取技術が本研究で確立されたことは、注目に値する。

博士論文は理論的・体系的に構築されており、前述した研究の価値を適切に表現しているものとして審査委員会は評価した。従って、本論文は、倉敷芸術科学大学・大学院・産業科学技術研究科・機能物質化学専攻・博士論文として相応しいものであると結論される。