



Title	膠芽腫の治療抵抗性に関与するがん幹細胞性の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鈴木, 淳
Description	配架番号 : 2387
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13008号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70419
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Suzuka_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 鈴鹿 淳

審査担当者	主査	教授	神谷 温之
	副査	准教授	志賀 哲
	副査	教授	渡邊 雅彦
	副査	教授	吉岡 充弘

学 位 論 文 題 名

膠芽腫の治療抵抗性に関与するがん幹細胞性の解析

(Analysis of therapy-resistant mechanisms of glioblastoma cancer stem cells)

本研究では、膠芽腫の治療抵抗性に関与するがん幹細胞の性質を解析する目的で、がん幹細胞の効率的な誘導法の開発ならびに分子標的治療後の薬剤耐性およびがん幹細胞性獲得機序に関して検討した。第1章では、高分子ハイドロゲルである DN ゲルを用いたがん幹細胞の迅速な誘導法の開発および幹細胞性を規定する分子メカニズムについて解析した。その結果、膠芽腫細胞においては DN ゲルからの持続的な刺激を受け、約 24 時間でがん幹細胞の誘導に成功し、がん幹細胞性を規定する分子として **Osteopontin** を同定した。また、膠芽腫患者由来初代培養細胞を用いた検討では、DN ゲル上では特異的な受容体型チロシンキナーゼの発現が認められた。また第2章では、受容体型チロシンキナーゼである **EGFR**、**c-Met**、**PDGFR** に対する阻害剤を長期間投与して樹立したチロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞における、がん幹細胞性および薬剤耐性の共通メカニズムを解析した。その結果、耐性細胞では幹細胞性遺伝子 **Sox2** の発現上昇ならびに **Wnt** シグナル経路に属する分泌蛋白質である **SFRP1** の著明な遺伝子発現の低下を認め、その発現はエピジェネティックな変化により制御されることが明らかとなった。

本研究に関わる学位審査では主査の神谷教授および副査の志賀准教授、渡邊教授、吉岡教授が審査員として参加し、実施された。審査にあたり、副査の志賀准教授より DN ゲルを用いて患者由来癌組織から幹細胞特異的な標的分子を同定するまでの期間について質問があった。申請者は、DN ゲル上での膠芽腫細胞株における幹細胞性遺伝子群の継時的な発現結果より、3 日間程度で分子の特定が可能であると回答した。続いて、DN ゲルの臨床応用に向けた開発進行度について質問があり、申請者は、現在は腫瘍病理学教室での検討に留まっており、今後臨床各科との連携研究が必要であると述べた。次に副査の渡邊教授より、今回 DN ゲル上で特異的に誘導された受容体型チロシンキナーゼは他の患者由来初代培養細胞においても同様に誘導され、本来の膠芽腫幹細胞における特異的分子かどうかについて異なった視点から検討する必要性があるのではないかと質問があった。申請

者は、DN ゲル特異的に誘導された可能性も考えられるため、従来のがん幹細胞濃縮法においても同様に誘導されるかどうか検討する必要があると回答した。続いて、Osteopontin の誘導に関与する分泌蛋白質 SHH の発現誘導メカニズムに関して質問があった。申請者は、過去の文献で報告されている低酸素環境下が SHH の発現誘導に寄与する可能性を示した。次に分子標的治療耐性膠芽腫細胞株において共通して発現低下する SFRP1 が治療標的分子となり得るかどうかについて質問があった。申請者は、耐性を獲得した膠芽腫において SFRP1 の発現を回復させ、再度分子標的治療薬を投与する補充療法の形式での治療の実施が望まれると回答した。また、膠芽腫の標準治療について質問があり、申請者は腫瘍の外科的切除が予後を規定する最も重要な治療で、切除出来ずに残存した腫瘍に対し化学療法、放射線療法が併用されると回答した。次に副査の吉岡教授より、DN ゲル上での腫瘍細胞培養に着目した経緯に関して質問があった。申請者は、過去に報告された様々なバイオマテリアル上での幹細胞の維持培養の成功例およびゲル上での軟骨細胞再生における先行研究での幹細胞性に関連する遺伝子パスウェイの亢進結果より着想に至ったと回答した。また、DN ゲル上でのスフィア形成のメカニズムに関する質問があった。申請者は、カルシウムイオンチャネルをはじめとしたメカノセンサーががんの悪性化や幹細胞性に関与する過去の報告から、DN ゲル上におけるがん幹細胞性の誘導ではメカノセンサーの関与が考えられると回答した。続いて、幹細胞性誘導に繋がる初期刺激受容体に関する質問があり、申請者は細胞接着分子であるインテグリンが DN ゲルからの刺激を受容する初期因子であると考えられ、今後検討する旨を述べた。次に、Wnt リガンドに対する SFRP1 の親和性および阻害薬の有無に関して質問があり、申請者は過去の文献を参照し、Wnt リガンドと SFRP1 は強い親和性があること、ならびに低分子化合物の存在を回答した。続いて主査の神谷教授より、スフィア中心部付近での Sox2 発現メカニズムについて質問があった。申請者は、本研究では未検討であるが、スフィア中心部での低酸素環境が SHH の誘導を促進し、Sox2 の発現誘導に繋がるのではないかと述べた。また、DN ゲル上での腫瘍細胞の培養準備に関する質問があり、申請者は DN ゲルをオートクレーブ滅菌後、培養メディアに一晚浸漬した後に細胞培養に使用すると回答した。次に、マウスへの脳内移植実験における条件検討について質問があり、申請者は細胞数の事前検討の実施、同時移植した粉砕 DN ゲルのサイズについては移植時に使用する注射針を通過可能な 100 μm 以下としたことを回答した。続いて、二次元培養環境下での細胞培養におけるスフィア形成に関する既報の有無について質問があり、申請者は過去の報告では三次元培養での系列が多数であり、二次元培養での報告は少ないと回答した。最後に追加質問事項として、副査の渡邊教授より、DN ゲル上での幹細胞性誘導における細胞間接着分子や上皮間葉転換の関連性の有無について質問があり、申請者は本研究では詳細に検討出来ていないが、スフィア形成の継時的観察動画よりスフィア内での細胞間接着が強固になる様子を提示し、細胞間接着分子に関して詳細な検討を実施する旨を述べた。また、副査の志賀准教授より、ゲルの荷電状態における幹細胞性誘導能力の差異に関する質問があり、申請者は DN ゲルとは荷電状態の異なるゲルにおいても幹細胞性誘導能力を有するものがあることを述べ、それぞれのゲルにおける幹細胞性誘導メカニズムが存在するのではないかと回答した。

この論文は、DN ゲルを用いた膠芽腫幹細胞の迅速な誘導法の開発や癌幹細胞性誘導メカニズムおよびチロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞における共通の耐性獲得メカニズムを解析することで、膠芽腫におけるがん幹細胞特異的な分子標的治療の開発を目指している。今後は、臨床検体を用いた検討を重ねることで、膠芽腫に対する新規治療法の開発へと繋がることが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。