



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロゲル誘導肝癌幹細胞に対する新規治療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	谷, 道夫
Description	配架番号 : 2614
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14495号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81834
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Michio_Tani_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 谷 道 夫

	主査	准教授	七戸	俊明
審査担当者	副査	准教授	加藤	徳雄
	副査	教授	園下	将大

学 位 論 文 題 名

ハイドロゲル誘導肝癌幹細胞に対する新規治療法の開発
(Development of Novel Therapies for Hydrogel-Induced Liver Cancer Stem Cells)

申請者は肝癌細胞株の培養基材としてハイドロゲルである Double-Network gel (DN ゲル) を使用して幹細胞誘導を行い、その解析により治療標的候補分子である CMKLR1 を同定し、同分子の阻害剤の α -NETA を用いた治療実験を行った。まず、DN ゲル上で培養した細胞が遺伝子・蛋白発現レベルで幹細胞性を獲得していることを示し、マイクロアレイ解析により DN ゲル培養によって発現亢進を認める遺伝子群から治療標的候補分子 CMKLR1 を抽出した。次いで、肝細胞癌患者の臨床検体を用いて CMKLR1 の高発現が予後不良因子であることを示した。続いて、同分子の阻害剤の α -NETA が肝癌細胞株に対して細胞障害性を有すること、DN ゲル培養による幹細胞性誘導に対する阻害効果を有することを示した。さらに、免疫不全マウスを用いた *in vivo* 実験において、 α -NETA 投与腹腔内投与が皮下腫瘍の浸潤能を抑制し、腫瘍細胞の皮下接種前の α -NETA 投与により造腫瘍性を低減することを示した。

審査にあたり副査の加藤准教授より、臨床検体における免疫染色に対して、強度の判定基準の客観性と、染色強度を 2 群に分類した根拠について質問があり、申請者は、主観的な判断が完全に否定できるものではないが、胆管上皮を内因性の対照として設定し、病理専門医である指導医とともに判定したと回答し、臨床的意義を勘案して染色強度を 2 群に分類したと回答した。また、*in vitro* では幹細胞マーカーと CMKLR1 との発現の相関が認められた一方で、臨床検体の評価では分化度と CMKLR1 発現が乖離している点について質問があり、申請者は、今回の評価法は組織内の染色性の最強点を判定基準としており、腫瘍組織の幹細胞性を必ずしも捉えていない可能性がある」と回答した。また、 α -NETA の治療薬として使用方法の可能性に関する質問があり、申請者は幹細胞性の阻害効果の観点から他剤との併用療法を想定していると回答し、それに対し、加藤准教授は術後補助化学療法の可能性を言及した。次に副査の園下教授より、癌幹細胞誘導の証明には *in vivo* での腫瘍形成能など総合的な検証が必要であるとの指摘があり、申請者は、本研究は遺伝子および蛋白レベルでの実証にとどまっており、より強い検証のため、*in vivo* での追加実験を検討すると回答した。また、 α -NETA を用いた治療実験では薬剤の組織特異性や体内動態を考慮した投与量の検討が必要であると指摘があり、申請者は、本研究では先行研究を参考にしたが、今後 α -NETA の阻害効果と体内動態に関する実験を検討したいと回答した。さらに、マイクロアレイの解析において、DN ゲルに特異的に発現亢進があった遺伝子ではなく古典的な幹細胞誘導で使用される ultra-low dish においても発現亢進している遺伝子にも注目すべきではないかとの指摘があり、申請者は、ultra-low dish と比較して DN ゲルでより優位に幹細胞性が誘導されたため、DN ゲル独自の遺伝子発現の変化があることを想定し、特異的に亢進がみられた遺伝子群に注目したと回答した。また、使用した抗体の信頼性に関する指摘があり、CMKLR1 の高発現株および低発現株を作成した上で染色性の検証を検討する旨を回答した。さらに、多重検定における不備

の指摘があり、適切に修正する旨を回答した。最後に主査の七戸准教授より、肝細胞癌株を用いた DN ゲルによる癌幹細胞誘導に関する本研究の新規性についての質問があり、申請者は、肝癌細胞株の使用には新規性があると回答した。また、 α -NETA の特性、正常細胞への影響などに関する質問があり、申請者は、文献的に毒性に関する報告は乏しく、本研究においてもマウスの死亡例はなく、投与量と関連した体重変化も認められなかったと回答した。次に、 α -NETA 阻害剤を用いた実験が、分子生物学的な検証を目的としているのか、治療応用を目的としているかが明瞭ではないとの指摘に対し、申請者は、双方を目的としているものの、いずれの結果も限定的であり、今後の検討が必要であると回答した。最後に、DN ゲルおよび Polystyrene dish (PS dish) 上で培養した細胞における遺伝子発現解析において、DN ゲル群では 7 日間培養の結果が示されているものの、PS dish では 7 日間培養群のデータが示されていないと指摘があり、これに対して、申請者は PS dish 上で 7 日間培養した群は細胞増殖が過剰となり単相培養が維持できない状態であり、比較対象として不適切と判断したためデータを提示しなかったと回答し、学位論文中にその旨の記載を追加すると回答した。

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。