HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study of Morphological Difference in Hydrogel Induced Cancer Stem Cell in Synovial Sarcoma Model Cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Ferdous, Zannatul
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(ソフトマター科学)
Dissertation Number	甲第15323号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89707
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Zannatul_Ferdous_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(ソフトマター科学)　氏　名　Zannatul Ferdous

審査担当者	主査	准教授　津田　真寿美
	副査	教　授　グン　剣萍
	副査	教　授　芳賀　永
	副査	教　授　小松﨑　民樹（電子科学研究所）
	副査	教　授　田中　伸哉（医学研究院）

学 位 論 文 題 名

Study of Morphological Difference in Hydrogel Induced Cancer Stem Cell
in Synovial Sarcoma Model Cells
（滑膜肉腫モデル細胞におけるハイドロゲル誘導幹細胞の形態学的解析）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

がん組織は、極少数のがん幹細胞 (Cancer Stem Cell: CSC)、がん幹細胞様細胞、前駆細胞、および多くの分化した非がん幹細胞から構成される不均一な集団である。多くのがん治療薬は分化したがん細胞を標的とするように設計されている一方、CSC はこれらの治療薬に対して抵抗性を示し再発の原因となる。がん関連死の 90%は CSC の再発と転移による。多くの CSC マーカーが同定されているが、それらは癌種特異的であることが多く、発現は可変的であり、CSC の特性を解明する際の障壁となっている。従って、がん細胞を根治しがん患者の予後を改善するためには、CSC を標的としたより効果的な治療薬の開発とその特徴量の解析が急務となる。このような現状において、本論文では、がん細胞の形態学的特徴から効率的で信頼性の高い CSC の検出システムを確立することを目的に、幹細胞性誘導と単一細胞レベルでの幾何学的特徴との関係を解析した。

我々は先行研究において、北大先端生命科学研究院のグン剣萍博士が開発した、ポリ-2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸（PAMPS）とポリ-N,N'-ジメチルアクリルアミド (PDMAm) で構成されるダブルネットワーク（DN）ポリマーハイドロゲルは、分化したがん細胞を CSC に効率的にリプログラミング（初期化）できることを明らかにし、hydrogel-induced reprogramming phenomena (HARP)と命名した（Nat Biomed Eng, 5, 914-925,2021）。この中で、DN ゲル上で培養したがん細胞は、がん幹細胞マーカーの上昇と共に形態学的変化を示した。これは、ハイドロゲルは細胞外マトリックスを模倣して CSC に特定の 3 次元微小環境を提供する可能性を示唆する。

細胞の形態は、疾患の診断、がんのグレードの判定、疾患の進行状況、治療反応性の予測などに広く寄与する。形態学的変化は、細胞外環境の変化に応じた細胞骨格の再形成によって惹起される。これまで、癌細胞と非癌細胞の形態学的な相違、細胞形態とがんの転移特性との関連が報告されている。また、分化過程における幹細胞の形態変化や、幹細胞の形態学的特徴は分化過程での系統決定に寄与することも報告されている。

滑膜肉腫は、青年期および若年成人の四肢に好発する悪性の間葉系腫瘍であり、全軟部肉腫の 5～10%を占める。多くの症例で染色体転座 t(X:18; p11:q11)が認められ、融合遺伝子 SSX-SS18 が生じる。その産物である癌タンパク質 SSX-SS18 は、SWI/SNF または BRG1/BRM 関連因子（BAF）複合体の構成分子である SS18 と置換することにより、クロマ

チンリモデリングに関与し、エピジェネティックな変化を引き起こす。

本研究では、単一細胞レベルから抽出された特徴を使用して、HARP 現象に関する非 CSC から CSC へのリプログラミング中に起こる形態変化の必須要素に焦点を当てた。まず、マウス筋芽細胞 C2C12 とその SS18-SSX1 導入滑膜肉腫モデル細胞（C2C12-SS18-SSX1）を、DN ゲルの構成成分である PAMPS ゲル上で培養し、幹細胞性誘導と形態学的変化を解析した。qRT-PCR 解析により、PAMPS ゲルによりがん幹細胞マーカー*Sox2*、*Nanog*、*Oct3/4* の有意な発現増加が確認された。幹細胞性の誘導率は、野生型細胞より滑膜肉腫モデル細胞の方が高かった。注目すべきは、PAMPS ゲル上培養細胞の形態は不均一であり、主に 3 種類の形態（flat spreading、elongated spindle、small round cells）に分けられ、Sox2 の発現は small round cells で最も高かった。幹細胞性の誘導と細胞形態との関連を調べるために、6,400 以上の細胞を Sox2 の蛍光強度でセグメントし、12 種類の幾何学的特徴を単一細胞レベルで抽出した。単一細胞から計算された幾何学的特徴と教師なし次元削減を使用して、Sox2 高発現細胞は small round を示すのに対し、flat spreading 細胞は Sox2 の発現が著しく低いことが明らかとなった。均一多様体近似と射影 (UMAP) を使用した幾何学的特徴の非線形マッピングは、ハイドロゲル上での形態学的変化と幹細胞性誘導との間に明確な相関関係があることを示した。

これを要するに、これらの幾何学的特徴は CSC の形態学的プロファイリングに有用であり、CSC を分類および区別することで、がんの特性の理解、がんの再発予測、および創薬開発に大いに貢献できるものである。

よって著者は、北海道大学博士（ソフトマター科学）の学位を授与される資格あるものと認める。