



Title	ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出および機能解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	加藤, 万里絵
Description	配架番号 : 2890
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16398号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95387
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KATO_Marie_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 加藤 万里絵

学 位 論 文 題 名

ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出および機能解析
(Development of mesothelioma stem cells using hydrogel and functional analysis)

【背景と目的】中皮腫は悪性度の高い腫瘍で、予後改善のためには新規治療法の開発が望まれる。がんの再発や薬剤抵抗性に関与するがん幹細胞(CSCs)は、がん組織内に僅かしか存在せず、これまでCSCsを標的とした治療法の開発は困難であった。最近、我々はハイドロゲルを用いてCSCsを迅速に誘導する技術を開発した。そこで本研究は、当該技術を用いて中皮腫幹細胞(MSC)を誘導し、その性状を解析して、新たな治療法確立のための端緒とすることを目的した。

【材料と方法】5種類のヒト中皮腫細胞株(MESO4、211H、H2452、H2052、H28)をDNゲル上で2日間培養し、幹細胞マーカー(*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*)の発現をreal-time PCRで解析した。次に、培養期間を変化させ幹細胞マーカーの発現変動を解析した。さらにゲル上で21日間培養した細胞をPSディッシュに播き直し、幹細胞性の可塑性について検討した。*In vivo* 腫瘍形成能については、DNゲル上培養MESO4細胞をヌードマウスに皮下移植して検討した(n=2)。MSCで発現亢進する遺伝子を同定するため、DNゲル上で3日間培養したMESO4細胞を用いてマイクロアレイ解析およびエンリッチメント解析を実施し、膜蛋白コード遺伝子*SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2*を抽出した。各実験において、ポリスチレン(PS)ディッシュ、あるいは超低接着(ULA)ディッシュで培養した細胞をコントロールとして使用した。

次に、培養器材としてPCDMEゲルとPNaSSゲルを追加し、MESO4細胞の形態観察と上記3遺伝子の発現解析を行った。3遺伝子と幹細胞性との関連は、一般的幹細胞マーカーと既知のMSC関連遺伝子(*CD9*、*CD24*、*CD26*、*CD44*、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*)の発現を比較して評価した。抽出した3遺伝子のうち、*SLC13A5*のタンパク発現について、ウェスタンブロッティング(WB)、免疫細胞化学染色、免疫蛍光染色を実施した。生体内腫瘍形成能の評価のために、tdTOMATO-luc2を発現させたMESO4細胞および211H細胞をPNaSSゲル上で培養後、ヌードマウスの腹壁に移植して腫瘍形成能を評価した(n=4)。*SLC13A5*の機能評価のため、HEK293T、211H細胞に*SLC13A5*を一過性に過剰発現させ、WB、代謝解析、CCK-8アッセイを実施した。更に、211H細胞の*SLC13A5*をノックダウンし、幹細胞性やエネルギー産生の変動を解析した。

臨床検体における*SLC13A5*発現の意義を検討するため、TCGAデータベース87症例とBuenoらのコホート研究211症例で生存解析を行った。更に、scRNA-seqデータセットでクラスター分類を行い、マーカー遺伝子の発現を評価した。最後に、中皮腫患者FFPE検体における*SLC13A5*の遺伝子発現を解析した。

【結果】DNゲル上で培養した中皮腫細胞株4種において、幹細胞マーカー(*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*)の遺伝子発現量が亢進した。この亢進は培養後3日目と21日目を頂点とする2峰性を示した。DNゲル上で21日間培養したMESO4細胞をPSディッシュ上に播き直すと、幹細胞マーカーの発現は有意に減少した。*In vivo* 皮下移植モデルでの腫瘍形成能は、PSディッシュ培養に比べて、DNゲル培養細胞に優位性を認めた。マイクロアレイ解析では、コントロールと比較し、DNゲル上で*SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2*の発現が有意に増加した。エンリッチメント解析では糖原性アミノ酸の代謝亢

進を認めた。

MESO4細胞はPCDME、PNaSSゲル上に接着し、DNゲル上ではスフェロイドを形成した。*SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2* 遺伝子は、3種のゲル上で有意に上昇し、*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*、*CD44*、*ALDH1A3* の発現パターンと強い相関を示した。WBでは、3種のゲル上で *SLC13A5* 蛋白発現量が増加し、免疫蛍光染色および免疫細胞化学でも各ゲル上で染色強度が増強した。*In vivo* 腹壁移植モデルでは、MESO4細胞のPSディッシュ2個体とPNaSSゲル3個体、および211H細胞のPNaSSゲル2個体で発光増強を認めた。*SLC13A5* 過剰発現 HEK293T細胞では *SOX2* 発現、及び *ERK1/2* と *YAP* のリン酸化が亢進し、代謝解析では酸化的リン酸化が亢進した。CCK-8アッセイでは *SLC13A5* 過剰発現 211H細胞の生存率が上昇し、シスプラチンに対して耐性が亢進した。

生存解析では、3遺伝子と全生存期間との間に相関はなかったが、scRNA-seqデータベースによるクラスタリングでは、*SLC13A5* を発現する亜集団を少数認めた。臨床検体から抽出したRNAは、経年劣化で断片化しており、real-time PCRによる評価は困難であった。臨床検体の免疫組織化学では、1例のみ腫瘍の細胞膜に *SLC13A5* 部分陽性像を認めたが、大半の症例は陽性判定が困難であった。

【考察】本研究により、ハイドロゲルを用いたCSCs誘導技術はヒト中皮腫細胞株にも適応可能であることが示された。ゲル上細胞での幹細胞マーカー発現について、real-time PCRによる解析では可塑性があったが、高い*in vivo* 腫瘍形成能を認めたため、生体環境では幹細胞性が維持されていると示唆される。

今回同定された *SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2* は、各ゲル上で発現量が増加し、幹細胞マーカーの発現と強い相関を示したことから、MSCとの関連が示唆された。このうち *SLC13A5* は蛋白発現が増加したが、遺伝子発現の増加量に比べて1/10以下に収斂しており、厳密な翻訳制御下にあると推察される。*SLC13A5* 過剰発現 HEK293T細胞の代謝が酸化的リン酸化にシフトしたことから、ゲル上で誘導されたMSC様細胞は通常の中皮腫細胞に比べて細胞生存にクエン酸代謝を利用している可能性が示唆された。また、*SLC13A5* の過剰発現により、*ERK-SOX2* 経路や *ERK1/2-YAP* 経路が活性化され、これがゲル上で誘導したMSC様細胞の幹細胞性の維持に貢献していると示唆される。

SLC13A5 の発現と生存曲線の間に相関がなかったのは、scRNA-seqデータベースによるクラスタリングから、*SLC13A5* 発現細胞が非常に少ないことが示されたためと考えられる。一方 scRNA-seq データベースでは *SLC13A5* 発現細胞と *SOX2* や *Oct4* 発現細胞が同じクラスターに属することから、ゲル上で誘導したMSC様細胞と同様の性質を有する中皮腫幹細胞が臨床検体中にも少数存在することが確認された。

【結論】中皮腫細胞株をハイドロゲル上で培養すると、中皮腫幹細胞様細胞が誘導され、この細胞に特異的に発現する *SLC13A5* が同定された。*SLC13A5* 蛋白は *ERK* を活性化することで幹細胞性に関与し、更に、酸化的リン酸化を刺激してエネルギー代謝に寄与し、薬剤感受性も低下させた。以上の結果より、*SLC13A5* は中皮腫幹細胞においてもその生存維持に寄与していることが示唆された。