



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_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 加藤 万里絵

主査 教授 加藤 達哉
審査担当者 副査 教授 橋本 茂
副査 教授 近藤 亨

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)

申請者はハイドロゲルにより中皮腫幹細胞と相同性の高い細胞が誘導されることを検証し、その細胞に発現する SLC13A5 遺伝子の機能について論じた。4 種の中皮腫細胞株で DN ゲル上でのスフェロイド形成と幹細胞マーカーの発現増加を確認し、MESO-4 細胞で腫瘍形成能の優位性と中皮間葉移行の亢進を、211H 細胞で腫瘍形成能の亢進を示した。3 種のハイドロゲルで誘導された中皮腫幹細胞様細胞に共通するクエン酸輸送分子 SLC13A5 を過剰発現すると、SOX2 の発現増加、ERK、YAP のリン酸化亢進と代謝解析での酸化的リン酸化の亢進、シスプラチン抵抗性増強が示され、中皮腫幹細胞の生存維持に貢献することが示唆された。

審査にあたり、副査の橋本教授から 211H 細胞は皮下で腫瘍形成を観察したのか質問があり、申請者はパイロット実験を行ったが優位性は見られなかったと回答した。qPCR で OCT3/4 の発現増加が有意ではないが、なぜ後半の検討に 211H 細胞を用いたのか質問があり、申請者は、MESO-4 細胞に次いで発現が増加した H2452 細胞は腫瘍を形成せず、その次の 211H 細胞を選択したと回答した。ゲル上で長期培養すると幹細胞マーカーの発現が低下するのは細胞密度や細胞死の影響ではないかと質問があり、申請者は、full confluency は遺伝子発現を低下させるが細胞死は起こさず、一方 full confluency を避けた場合も、ゲルから離すと遺伝子発現は維持されなかったとデータを示して回答した。SLC13A5 の蛋白発現量が mRNA 発現量と相関しないのはなぜか質問があり、申請者は、mRNA から蛋白に翻訳されるいずれかの段階に制限が入ると推察するが、SLC13A5 の翻訳機構は未解明であると回答した。クエン酸濃度変化に対する MESO-4 細胞の生存率が、0 μ M でも低いのはなぜか質問があり、申請者は回収時の侵襲が影響した可能性があるかと回答した。過剰発現に用いた HEK293T 細胞に元々 SLC13A5 の発現はないか質問があり、申請者は、Human Protein Atlas によると腎由来細胞に発現はないと回答した。過剰発現やノックダウンは

transient で行っているが、permanent での検討は計画しているか質問があり、申請者は指導教員と相談の上検討したいと回答した。次に副査の近藤教授から、qPCR の幹細胞マーカーの比率を免疫染色等で確認したか質問があり、申請者は、蛋白は評価していないが、scRNA-seq データベースの解析結果から、元々の中皮腫細胞における発現は殆どないと推察されると回答した。癌細胞では SOX2 は一定量発現していると思われ、それが数倍増加することにどの程度意味があるのかを discussion すべきとの助言があった。遺伝子発現が2週間で低下するのに長期の動物実験で差が出たのはなぜか質問があり、申請者は、皮下よりも腹壁で有意差が出たことから、中皮の生理的環境が幹細胞性維持に貢献した可能性があるかと回答した。形成した腫瘍で免疫染色をしたか質問があり、申請者は SLC13A5 染色を行ったが、有意差は見られなかったと回答した。臨床検体も染色したか質問があり、申請者は剖検症例で試みたが、死後変化や経年劣化もあり評価に足る染色像が得られなかったと回答した。また、patient-drive cell line や PDX モデルを使って SLC13A5 蛋白の機能を調べてはとの助言があり、申請者は長期培養に伴う hit の可能性を考慮し細胞株は新しく買い直したが、生の臨床検体については呼吸器外科と連携した長期的検討が必要であると回答した。最後に主査の加藤教授から、DN ゲル上で培養中細胞形態は変化したか質問があり、申請者はスフェロイドの形態は維持されていたと回答した。SLC13A5 の染色態度と細胞周期の関連について、タイムラプスで経時的に評価してはとの助言があった。211H 細胞の transfection 効率が数値より少なく見えると質問があり、申請者は顕微鏡下で弱陽性も含めて評価したと回答した。呼吸器外科から最新の胸膜生検組織を提供することは可能であると助言があった。腹壁移植が生理的環境なのか質問があり、申請者は、壁側腹膜と筋層の間に注入することで中皮の間質内に入り、中皮に接しないまでも生理的環境にあったと考えていると回答した。

この論文はハイドロゲルを用いた手法が中皮腫幹細胞の性状解析に有用であることを示し、なおかつ中皮腫という細胞系から SLC13A5 を新たに同定した点で高く評価され、今後中皮腫の治療標的の探索がさらに発展す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単位取得なども併せ、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。