京都大学	博士（　医　学　）	氏　名	本間　周作
論文題目	F-Box/WD Repeat Domain-Containing 7 Induces Chemotherapy Resistance in Colorectal Cancer Stem Cells （FBXW7 は大腸癌幹細胞における抗癌剤抵抗性に寄与する）		

（論文内容の要旨）

【背景】大腸癌の転移、再発、抗癌剤抵抗性に関与する少数の癌細胞集団として癌幹細胞の存在が提唱されてきた。抗癌剤治療により一定の縮小効果を得ても根治に至る例は極めて少ないことや、術後補助化学療法後の再発例等は抗癌剤抵抗性癌細胞の存在を示唆するものである。抗癌剤抵抗性の機構として、癌幹細胞が有する細胞分裂の静止維持能力等が報告されているが、詳細はいまだ不明である。ユビキチンリガーゼの一種である FBXW7 は、c-Myc や cyclin E 等の細胞周期活性化蛋白を分解するため、一般に癌抑制遺伝子と捉えられている。種々の癌において FBXW7 の発現低下が予後不良因子になると報告されているが、近年、細胞周期が静止している慢性骨髄性白血病の幹細胞において FBXW7 の発現が上昇していることが報告された。更に、FBXW7 の発現を低下させることで化学療法感受性が高くなることが示された。大腸癌の根治を目指す上で、抗癌剤抵抗性の機序を解明することは重要であると考える。

【目的】細胞周期調節因子 FBXW7 に着目し、大腸癌における抗癌剤抵抗性と FBXW7 発現との関連性を、臨床および分子生物学の両側面から検証した。

【方法】

① 大腸癌術前化学療法／化学放射線療法（術前治療）症例 55 例の治療前検体(生検標本)にて FBXW7 免疫染色を行い、FBXW7 高発現群と低発現群とに分類し、病理学的治療効果(Grade 0,1；効果不良、Grade 2, 3；効果良好)を比較した。

② 大腸癌術前治療症例において、治療前検体(生検標本)と治療後検体(手術標本)の FBXW7 免疫染色を行い、発現状態を比較した。また各々の標本で細胞増殖マーカーKi67 の免疫染色を行い、FBXW7 の発現状態と比較した。

③ 過去の報告より細胞表面蛋白 $EpCAM^{high}/CD44^{high}$群に大腸癌幹細胞が凝集されることを利用し、ヒト大腸癌由来 Xenograft を flowcytometry で解析した後、$EpCAM^{high}/CD44^{high}$群および $EpCAM^{high}/CD44^{low}$群に分取し、qPCR にて各集団の FBXW7 発現量を比較した。

④ FBXW7 を knockdown させたヒト大腸癌細胞株を樹立して、*in vitro* にて細胞周期、細胞増殖および抗癌剤感受性試験を行った。更に、これらの細胞株を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、*in vivo* にて腫瘍増殖および抗癌剤による治療効果を検証した。

【結果】

① FBXW7 高発現群では効果不良 18 例、効果良好 3 例、低発現群では効果不良 18 例、効果良好 16 例と、有意に高発現群で病理学的治療効果が乏しかった（$p=0.019$）。

② 手術標本では生検標本と比較して FBXW7 陽性細胞の割合が有意に増加していた($p<0.001$)。また術前治療前後で Ki67 陽性細胞は減少しており、FBXW7 の染色性とは逆相関関係になる傾向にあった。

③ 解析した 4 種類の Xenograft 全てにおいて、$EpCAM^{high}/CD44^{high}$群での FBXW7 mRNA の発現量が $EpCAM^{high}/CD44^{low}$群と比較して有意に高かった。

④ FBXW7 の knockdown により大腸癌細胞株の細胞周期が活性化して細胞増殖が活発となる反面、抗癌剤感受性が有意に上昇した。またマウス皮下腫瘍モデルでは FBXW7 knockdown 細胞株において腫瘍増大が速くなる一方、CPT-11 投与時の腫瘍増大抑制効果が高かった。

【考察】細胞周期に起因して FBXW7 低発現大腸癌細胞は抗癌剤感受性が高くなり、FBXW7 高発現大腸癌細胞は抗癌剤感受性が低くなると考えられた。大腸癌幹細胞の中には FBXW7 を高発現する集団が存在し、それらは細胞周期を静止させることで抗癌剤抵抗性を獲得していることが示唆された。抗癌剤抵抗性を有する大腸癌幹細胞に対して、FBXW7 を標的にした治療が有効である可能性が示唆された。また、抗癌剤治療前の生検標本における FBXW7 蛋白の発現状態が、抗癌剤治療の効果予測因子になり得ると考えられた。

【結語】化学療法抵抗性を示す FBXW7 高発現大腸癌幹細胞は、大腸癌根治のための新たな治療標的になり得ると考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

癌幹細胞は癌組織における階層性の頂点に位置し、抗癌剤や放射線に抵抗性をもつことで癌の転移、再発に大きく関与していると考えられている。一方、ユビキチンリガーゼである F-Box/WD repeat domain-containing 7 (FBXW7)は c-Myc や cyclin E などを分解することで細胞周期を静止させる作用があるとされている。本申請者は FBXW7 による細胞周期の静止と大腸癌幹細胞における抗癌剤抵抗性との関連を、臨床および分子生物学両側面から検証した。

大腸癌術前化学療法症例に対する免疫染色では、化学療法前生検組織での FBXW7 発現が高い症例ほど化学療法後の病理学的治療効果が乏しかった。また、化学療法後手術組織では残存する癌細胞の殆どが FBXW7 を高発現していた。ヒト大腸癌由来ゼノグラフトのフローサイトメトリー解析では、大腸癌幹細胞が凝集するとされる細胞集団において FBXW7 の発現が高かった。そして、ヒト大腸癌細胞株を用いた実験では FBXW7 をノックダウンすることで細胞周期が活性化し細胞増殖が活発となることを示した。更に、FBXW7 をノックダウンした大腸癌細胞株は抗癌剤感受性が上昇することを示した。

これらの研究結果から本申請者は、大腸癌幹細胞集団には FBXW7 を高発現している細胞があり，細胞周期を静止させることで抗癌剤抵抗性を獲得している可能性があると考察した。更に、抗癌剤抵抗性を示す FBXW7 高発現大腸癌幹細胞は、大腸癌根治のための新たな治療標的になり得ると展望した。

以上の研究は、大腸癌における化学療法抵抗性の解明に貢献し、大腸癌根治のための新たな治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（　医学　）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和元年 12 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降