

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	大 嶋 野 歩
論文題目	Induction of Cancer Stem Cell Properties in Colon Cancer Cells by Defined Factors (特定因子による大腸癌細胞への癌幹細胞特性の誘導)		
(論文内容の要旨)			
癌組織中にごく少数存在する癌幹細胞は、癌予後不良の責任細胞と考えられ、これを標的とする新規治療法の開発が望まれている。しかし、癌幹細胞が少数であることは、癌幹細胞の特性獲得や維持に係る機構の解明を困難にしている。故に、癌幹細胞を人為的に作製する手法を確立することは、癌幹細胞の解析に有用なマテリアルを充分量供することでこの問題を解決し、癌幹細胞を標的とした診断・治療方法の開発に資することが期待できる。 iPS 細胞の発明は、特定の転写因子（<i>OCT3/4</i>:O, <i>SOX2</i>:S, <i>KLF4</i>:K, (<i>C-MYC</i>)) を体細胞へ導入し ES 細胞培養環境下で培養することで ES 細胞特性を誘導することを示した。その後、同様の因子導入は神経スフェロイド培養環境下では神経幹細胞特性を誘導できる事が報告された。これらは、この転写因子群が様々な種類の幹細胞特性を誘導できる可能性を示唆する。 そこで、本研究は「この転写因子群が癌細胞に癌幹細胞特性を誘導する」という仮説を立て、これを検証することを目的とした。方法は、大腸癌細胞株 SW480 に対し、レトロウイルスベクターを用いて O, S, K の 3 つの転写因子を単独ないし 3 因子同時 (OSK) に導入し、得られた癌細胞で既報の癌幹細胞特性について調べた。対照を親株または Mock 導入株とした。尚、現時点で癌幹細胞の特異的維持培養法は不明であるため、10%FBS-DMEM を培地に用いた。 大腸癌幹細胞関連マーカー (CD133, CD44, CD26, ALDH1, ABCG2) の mRNA/蛋白発現を調べたところ、OSK 導入株でのみ全てに発現上昇がみられた。また、OSK 導入株では <i>in vitro</i> 細胞増殖の低下、G1/0 期細胞の含有率増加がみられた。さらに、抗癌剤耐性能 (5-FU)/sphere 形成能/腫瘍形成能（異種異所移植）のいずれの能力も増大したのは OSK 導入株のみであった。以上から、OSK 導入により癌幹細胞特性と報告されている特性の誘導が可能であると考えられた。 次に、ヘキスト色素排出能について調べた。OSK 導入株でのみベラパミル 50 μM 投与条件下でも色素排出能を維持する細胞集団 (OSK-V50) が特徴的にみられた。そこで、この OSK-V50 を回収してその性質を調べたところ、対照群の細胞と比べて OSK-V50 では <i>in vitro</i> 細胞増殖の低下、形態・遊走能における高度な多様性形成能、高い腫瘍形成能（異種異所移植）という特性がみられた。さらに、得られた腫瘍を病理学的に調べた結果、Mock 導入株由来腫瘍が比較的均一な異型細胞から構成され免疫組織学的に CK20 (大腸上皮分化マーカー) 陰性・CK7 陰性・CDX2 陽性であるのに対して、OSK-V50 由来腫瘍では細胞極性や腺管様構造がみられ、また CK20 陽性・CK7 陰性・CDX2 陽性であり、ヒト大腸癌組織がもつ病理学的特性を認めた。以上より、OSK-V50 が大腸癌幹細胞特性を有する細胞集団であると考えられた。 最後に、OSK-V50 の異種異所連続移植実験を行い、得られた腫瘍組織及びその腫瘍細胞の特性を調べた。この結果、OSK-V50 が有する上述の特性は連続して再現され、OSK-V50 は <i>in vivo</i> で自己複製能を有することが示された。			

本研究により、特定の転写因子の導入により大腸癌細胞株 SW480 に対して人為的に癌幹細胞特性を誘導しうること、誘導された癌幹細胞特性を持つ細胞集団の選択的回収が可能であること、回収された人工的な癌幹細胞がヒト大腸癌の病理学的特性をもつ腫瘍を形成する能力と <i>in vivo</i> での自己複製能を有することが明らかとなった。			
（論文審査の結果の要旨） 癌幹細胞は癌組織中にごく少数存在し予後不良の責任細胞と考えられているが、癌幹細胞特性の獲得や維持に係る分子機構は未だ不明であり、癌幹細胞を標的とする治療法も未確立である。申請者は、組織中に存在する癌幹細胞が僅かであることがこの一因であると考え、癌細胞に人為的に癌幹細胞特性を誘導することで充分量のサンプルを用いる癌幹細胞の解析を可能にすることを目的とした。そこで本研究で申請者は、3 つの転写因子 OCT3/4、SOX2、KLF4 を大腸癌細胞に導入することで大腸癌幹細胞特性の誘導が可能であるかについて検討した。 これら 3 因子を大腸癌細胞に導入することにより、癌幹細胞の特性とされる表現型の誘導、すなわち、大腸癌幹細胞関連マーカーの発現上昇、in vitro 細胞増殖の低下、抗癌剤耐性能の増大、sphere 形成能の増大、色素排出能の増大、腫瘍形成能の増大が認められた。また、3 因子を導入した細胞の中で、癌幹細胞特性を獲得した細胞集団を、色素排出能増大を指標にする新たな分離法で選択的に回収する事に成功した。この方法で回収した細胞には、免疫不全マウス皮下移植によりヒト大腸癌組織の病理学的特徴を示す腫瘍組織を再構築する能力があることを確認した。また、これらの表現型は連続移植を経ても再現され、自己複製能を持つことが示された。 以上の研究は、癌幹細胞特性の獲得や維持に係る分子機構の解明に貢献し、今後の癌幹細胞を標的とした診断・治療法の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、平成 2 6 年 9 月 5 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			