

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	中 西 祐 貴
論文題目	Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine (Dclk1 は腸管の腫瘍幹細胞と正常幹細胞を区別する)		
(論文内容の要旨)			
＜背景＞近年、腫瘍には正常幹細胞と類似した性質を持つ腫瘍幹細胞（tumor stem cell ; TSC）が存在し、腫瘍子孫細胞を供給し続けるモデルが提唱されている。TSC マーカー候補はすでに複数報告されているが、そのほとんどは正常幹細胞にも発現している。癌治療に際してそれらを標的とした場合、正常組織に重大な障害をもたらすことが予想されるため、TSC 特異的マーカーの同定が重要である。Doublecortin-like kinase 1(Dclk1)は、腸管幹細胞のニッチとされる小腸クリプト底部の「+4 position（パネート細胞の直上）」に発現することから、当初幹細胞マーカーとして報告された。しかし最近、Dclk1 は分化した細胞（Tuft 細胞）のマーカーであるとも報告され、Dclk1 の幹細胞マーカーとしての役割については議論が分かれている。また、ヒト大腸癌やマウス腸腫瘍において Dclk1 陽性細胞の存在が確認されているが、腫瘍内での同細胞の役割についてはほとんど解明されていない。本研究では、正常腸管と腸腫瘍における Dclk1 陽性細胞の意義について検討を行った。			
＜方法＞Dclk1 プロモーターの下流にCreERT2-IRES-EGFP配列をノックインしたマウス（Dclk1-Creマウス）を作成した。Dclk1-CreマウスをRosa26-LacZマウス、そして代表的な腸腫瘍形成モデルApc^{Min}マウス等と交配し、Dclk1-Cre/Rosa26-LacZマウスとDclk1-Cre/Rosa26-LacZ/Apc^{Min}マウスを作成した。これらのマウスの腸管および腸腫瘍において、タモキシフェン投与によりDclk1 陽性細胞とその子孫細胞を青く染色するlineage tracing解析を行った。また、タモキシフェン誘導下でジフテリアトキシン受容体を発現するRosa26-iDTRマウスを用いて、Dclk1 陽性細胞の特異的アブレーションが正常腸管および腸腫瘍に与える影響についても検討した。			
＜結果＞Dclk1-Cre/Rosa26-LacZマウスの正常腸管では、タモキシフェン投与により青色のDclk1 陽性細胞は疎に出現するのみで、子孫細胞の供給は認めなかった。一方、Dclk1-Cre/Rosa26-LacZ/Apc^{Min}マウスの腸腫瘍では、タモキシフェン投与後に、腫瘍底部のDclk1 陽性細胞から青色の子孫細胞が管腔側へ向けて増殖し、7 日後には腫瘍全体が青色の子孫細胞によって占められた。さらに、これらの青くラベルされた腸腫瘍は、マウスを観察し得た 105 日後まで残存していた。この結果は、正常腸管・腸腫瘍双方の幹細胞マーカーであるLgr5 のCreERT2 ノックインマウスを用いた同様の実験において、正常腸管と腸腫瘍の双方がLgr5 陽性細胞の子孫細胞によって占められたことと対照的であった。Dclk1 とLgr5 の発現の意義を腸腫瘍で検討したところ、Dclk1 陽性細胞は、腸腫瘍の底部においてLgr5 を共発現する頻度が増えていることを免疫染色で確認した。			

また、このDclk1/Lgr5 共陽性細胞は、他の幹細胞マーカーであるCD44, CD133、そして抗アポトーシス関連分子Bcl2 を高発現していることをFACSで確認した。このことから、Dclk1/Lgr5 共陽性細胞が真の腫瘍幹細胞である可能性が示唆された。また、*Dclk1-Cre/Rosa26-LacZ/Apc^{Min}/Rosa26-iDTR*マウスを用いてDclk1 陽性細胞の特異的アブレーションを行ったところ、正常腸管には障害は認められなかったが、腸腫瘍は劇的に退縮することが観察された。そしてヒト大腸癌臨床検体を用いた検討でも、Dclk1 はヒト大腸癌においてもマウスと同様の発現パターンを持つことを確認した。

＜結論＞Dclk1 は、正常腸管の幹細胞マーカーではなく、腸腫瘍における腫瘍幹細胞特異的なマーカーであることが示された。Dclk1 陽性細胞を治療標的とすることにより、正常組織への障害のない理想的な「癌幹細胞治療」につながる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

癌は様な細胞から構成されるのではなく、癌組織中に少数の幹細胞が存在して癌全体に細胞を供給するという、「癌（腫瘍）幹細胞仮説」が提唱されている。本論文で申請者らは、独自に作出した Dclk1 ノックインマウスを用いて、マウス腸管及び腸腫瘍における Dclk1 の幹細胞マーカーとしての意義について検討した。本論文ではまず、細胞系譜解析によって、Dclk1 が正常腸管において幹細胞ではなく、分化した細胞のマーカーであることを明らかにした。このことは、従来から議論が分かれていた、腸管上皮における Dclk1 陽性細胞の幹細胞性について明確な結論を示したものである。

次に、同じく細胞系譜解析を用いて、Dclk1 が腸腫瘍において腫瘍幹細胞のマーカーであることを示した。このことは、マウス腸腫瘍組織に階層性が存在することを示すと同時に、Dclk1 が腸管の腫瘍幹細胞と正常幹細胞を区別する特異的な因子であることを明らかにしたものである。さらに申請者らは、Dclk1 陽性腫瘍幹細胞のアブレーションにより、正常組織に影響をあたえず腫瘍の退縮が得られることを示した。この結果は、腫瘍幹細胞を標的とする癌治療の有用性を示唆するものであり、臨床的な意義が高い。

以上の研究は、腫瘍幹細胞の本態解明、そして将来的な新規癌治療法の開発に寄与するところが大きい。

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25年2月21日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。