

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	佐 々 木 直 也
論文題目	Alpha-fetoprotein-producing pancreatic cancer cells possess cancer stem cell characteristics. (膵癌における AFP 産生細胞の単離および癌幹細胞としての特性解析)		
(論文内容の要旨)			
本実験は、ヒト膵癌においてアルファフェトプロテイン(alpha-fetoprotein; AFP)を産生する細胞が、癌幹細胞の性質を有することを証明したものである。 癌幹細胞とは正常の組織幹細胞と同様に自己複製能と分化能を持ち、さらに1個の細胞から腫瘍を形成する能力を有するものと定義されている。また正常幹細胞のように細胞の寿命が長く、休眠状態をとることができ、薬剤や放射線に対して抵抗性を持つとされている。これらの性質から癌幹細胞は腫瘍組織の不均一性を生み出し、腫瘍の悪性度や治療抵抗性、さらに転移や再発にも関わっていると考えられている。 癌幹細胞は白血病といった血液腫瘍に端を発し、乳癌、脳腫瘍、膵癌などの固形癌でもその存在が報告されている。これまでの癌幹細胞の研究では、血液腫瘍の免疫表現型解析に準じて、腫瘍組織を消化酵素等を用いて個々の細胞に分離し、細胞表面抗原マーカーの組み合わせによって細胞集団を選別し機能解析を行うという方法が主に行われてきた。しかしこれらの細胞表面抗原の機能については不明なものが多い。また特に固形癌の臨床検体において、免疫表現型による癌幹細胞候補の存在割合はばらつきが非常に大きく、癌幹細胞の存在自体を疑われる根拠となっている。 本実験では癌幹細胞の未分化性に着目し、前腸内胚葉由来の臓器である膵臓の悪性腫瘍組織中には未分化な癌幹細胞が存在し、これらが胎生期の前腸内胚葉マーカーのひとつである AFP を発現しているのではないかと仮定した。AFP は胎児肝細胞が産生する血漿タンパクで、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして知られているが、胎生期において前腸とそこから発生する膵臓での発現が確認されている。 6種類のヒト膵癌細胞株を用い、これらに AFP プロモーター・エンハンサー下に蛍光タンパク EGFP (enhanced green fluorescent protein)を発現するプラスミドベクターを導入した。フローサイトメトリーを用いて緑色蛍光の有無により細胞を選別したところ、AsPC-1 と PANC-1 の2種類の細胞株に EGFP の蛍光を発する細胞分画を認め、これらが同時に AFP を発現していることを確認した。 これら2種の細胞株の単離培養により、AFP 産生細胞が自己複製能と分化能を有することが証明された。さらに高い増殖能と足場非依存性コロニー形成能があることが示された。また免疫不全マウスへの移植実験により、腫瘍産生能が確認された。臨床検体においても、免疫組織染色で膵癌組織内にごく少数の AFP 陽性細胞を有するものがあり、臨床検体においても膵癌幹細胞の存在の可能性が示唆された。 さらに AFP 産生細胞は、膵癌治療に用いられる抗癌剤である 5-FU とジェムザール			

に対して薬剤耐性を持つことが示された。2 種の細胞株の AFP 産生細胞に共通して、薬剤輸送体のひとつである ABCA12 (ATP-binding cassette; Sub-family A; Member 12) が高度に発現していることが示され、薬剤耐性機序の一つである可能性が示唆された。
結論： ヒト膵癌細胞株に存在する AFP 産生細胞は癌幹細胞の性質を有し、 5-FU 、ジェムザールに薬剤耐性を持つことが示された。また臨床検体においても AFP 産生細胞を少数認め、 AFP が膵癌幹細胞の新たなマーカーとして有用である可能性が示唆された。 薬剤耐性の機序として、薬剤輸送体 ABCA12 が関与している可能性が示され、今後の癌治療の標的分子となりうると考えられる。
（論文審査の結果の要旨） 申請者は癌幹細胞の未分化性に着目し、ヒト膵癌の新たな癌幹細胞マーカーとして alpha-fetoprotein (AFP) が有用であることを証明するためにこの実験を行った。前腸内胚葉由来である膵臓の悪性腫瘍組織中には組織幹細胞と似た性質を持つ癌幹細胞が存在し、これらが前腸内胚葉マーカーである AFP を発現していると仮定し、これらの細胞が癌幹細胞の定義である、自己複製能、分化能、腫瘍形成能を有することを確認した。 ヒト膵癌細胞株を用い、 AFP プロモーター下に蛍光タンパクを発現するプラスミドベクターを導入し、フローサイトメーターを用いて AFP を産生する細胞群を単離した。単離培養により、 AFP 産生細胞が自己複製能と分化能を有することを示し、さらに高い増殖能と足場非依存性コロニー形成能、また免疫不全マウスへの移植実験により、腫瘍形成能が確認された。臨床検体においても、膵癌組織内にごく少数の AFP 陽性細胞を認め、膵癌幹細胞の存在の可能性が示唆された。 さらに AFP 産生細胞が抗癌剤 5-FU とジェムザールに対して薬剤耐性を持つことを示した。これらに薬剤輸送体 ABCA12 が高発現していることが示され、抗癌剤耐性機序の一つである可能性が示唆された。以上の研究はヒト膵癌における癌幹細胞の解明に貢献し膵癌治療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 3 年 8 月 1 8 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