

氏 名	しま 嶋 やす 靖 こ 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3065 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-ras ^{val12} . (活性型 H-ras ^{val12} 遺伝子による間葉系幹細胞の in vitro 形質転換)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 中 辻 憲 夫

論 文 内 容 の 要 旨

悪性腫瘍の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることが提唱されており、肉腫の場合は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) がその候補である。多段階発癌の立場より、肉腫関連癌遺伝子のスクリーニングのための前肉腫細胞として、不死化 MSC を樹立し、その癌化を試みた。

使用した MSC は BioWhittaker 社より販売されている細胞を用いた。MSC の不死化はレトロウィルスベクターを用いて、まずヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) を導入、更にポリコム遺伝子ファミリーの一つであり、細胞周期調節因子である p16 遺伝子に対する阻害作用を持つ Bmi1 遺伝子を導入することで行った。導入細胞はテロメア活性を有し、p16 遺伝子の発現は認めなかった。継代を重ねても老化には至らず、不死化 MSC の樹立に成功した。この不死化 MSC は接触阻害を示し、造腫瘍性は認めなかった。更に不死化 MSC をクローニングすることにより脂肪、骨、軟骨への分化能を有するクローンを単離、ihMSC (immortalized human MSC) と命名し、このクローンに活性型 H-ras^{val12} を導入することで癌化を試みた。

活性型 H-ras^{val12} 導入 ihMSC (ihMSC-ras) は、血清及び足場非依存性増殖能、浸潤移動能、更に in vivo での造腫瘍能など、癌細胞としての形質を獲得した。ihMSC-ras は細胞質内に多数の空胞を形成しており、透過電子顕微鏡解析によりこれらは多数の残渣を蓄えた自食空胞 (autophagosome) であることが判明した。Autophagosome の膜構成成分である LC3-II の発現の亢進もウェスタンブロット法により確認され、H-ras^{val12} 導入により ihMSC に自食作用 (autophagy) が誘導されたと考えられた。ihMSC-ras では mitogen-activated protein kinases (MAPK) の中で、extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 のリン酸化が亢進しており、その上流に位置する MAPK/ERK kinase (MEK) 1/2 の阻害剤により、autophagosome の形成が阻害されたことから、ras/ERK シグナルが autophagy の誘導に関与していると考えられた。

分化能に対する影響としては、まず脂肪分化能に関しては、PPAR- γ 2 とその下流にある ap2 の発現が分化誘導前より発現しており、分化誘導により多数の脂肪滴を形成した。骨分化に関しては、OSF2/RUNX2 や osteocalcin など最終分化関連遺伝子の発現誘導が認められず、石灰化結節形成能も消失し、骨分化能は阻害されていた。軟骨分化に関しては、細胞外基質の形成を認め、さらに軟骨関連遺伝子の発現が誘導され軟骨分化能は維持されていた。Autophagy と同様に、ERK1/2 阻害剤により PPAR- γ 2 と ap2 遺伝子の発現が抑制され、脂肪分化促進には ras/ERK シグナルが関与していると考えられたが、OSF2/RUNX2 や osteocalcin の発現、及び石灰化結節形成能は回復せず、骨分化能の消失は ERK シグナル以外の経路によるものと考えられた。

ras 導入により骨分化能が消失したことは、骨肉腫において ras 遺伝子の変異が極めて稀であることと合致する結果であり、今回樹立した ihMSC は、肉腫関連癌遺伝子の検索材料として、有用なものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

悪性腫瘍の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることが提唱されており、肉腫の場合は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) がその候補である。多段階発癌の立場より、肉腫関連癌遺伝子のスクリーニングのために不死化 MSC を樹立し、その癌化を試みた。

MSC の不死化はヒトテロメラーゼ逆転写酵素と細胞周期調節因子である p16 遺伝子に対する阻害作用を持つ Bmi1 遺伝子を導入することで行い、更に活性型 H-*ras*^{val12} を導入することで癌化を試みた。

活性型 H-*ras*^{val12} 導入 MSC (ihMSC-ras) は、血清及び足場非依存性増殖能、浸潤移動能、in vivo 造腫瘍能を示し癌細胞としての形質を獲得した。更に自食空胞が多数形成された。ihMSC-ras では mitogen-activated protein kinases (MAPK) の中で、extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 が活性化しており、自食空胞の誘導に ras/ERK シグナルの関与が考えられた。

分化能に関しては、軟骨、脂肪分化能はそれぞれ維持、促進されたが、骨分化能は阻害された。脂肪分化の促進は ras/ERK シグナルの関与が、骨分化能の消失は ERK シグナル以外の経路によるものと考えられた。

ras 導入による骨分化能の消失は、骨肉腫において ras 遺伝子の変異が極めて稀である事と合致し、今回樹立した ihMSC は、肉腫関連癌遺伝子の検索材料として、有用なものであると考えられる。以上の研究は、癌化過程の解明に貢献し、癌治療薬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19年1月26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。