

氏名（本籍）	宮崎 貴寛		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	9957	号
学位授与年月	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Development of a novel stroma-rich tumor-bearing mouse model using adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) and understanding the characteristics of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in pancreatic cancer (脂肪由来間葉系幹細胞を用いた新規癌間質モデルマウスの開発と膵癌の癌関連線維芽細胞の特性の理解)		
主査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之
副査	筑波大学教授	博士（医学）	榎 正幸
副査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（医学）	中村 幸夫
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	小島 崇宏

論文の内容の要旨

宮崎貴寛氏の博士学位論文は、脂肪由来間葉系幹細胞を用いて膵癌細胞と癌関連線維芽細胞の相互特性を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

【目的】 著者は、膵腺癌（PDAC）は間質が豊富であることが大きな特徴であり、悪い予後や化学療法抵抗性の原因になっているが、細胞株由来異種移植マウス（CDX）、患者組織由来異種移植マウス（PDX）といった従来のマウスモデルは間質が乏しく、癌組織の構成細胞の不一致（癌細胞はヒト細胞由来、間質はマウス細胞由来）という点から癌関連線維芽細胞(CAF)の解析、特に癌細胞との相互作用の解析には不向きである事に言及している。そこで著者は、ヒト膵癌の CAF を解析するためのマウスモデルを作製し解析した。CAF の起源としては、膵星細胞、骨髄由来 MSC、脂肪由来 MSC (AD-MSC)、上皮間質転換した癌細胞など複数報告されているが、本研究で著者は、入手が比較的容易で多分化能をもつ AD-MSC を CAF の前駆細胞として用いた。また、CAF の起源は複数報告されているが、臨床膵癌の CAF が 1 つの起源から構成されるか、複数の起源から構成されるかは明らかではなかったため、AD-MSC が複数の CAF サブタイプに分化し、臨床の CAF heterogeneity を再現するかを検証した。

【方法】 著者は、ヒト不死化 AD-MSC 細胞株 ASC52telo (ATCC SCRC-4000) とヒト膵臓癌細胞株 Capan-1 (ATCC HTB-79) を用いて研究を行った。著者は、AD-MSCs は緑色蛍光タンパク質 (GFP) で、Capan-1 は赤色蛍光タンパク質 (RFP) で標識し使用した。また、膵癌 (PDAC) 患者から CAF を分離し、利用した。

(i) *in vitro* 共培養実験

著者は、AD-MSC と Capan-1 を直接共培養および間接トランズウェル共培養という 2 つの異なる条件で培養した。7 日間の共培養後、形態学的解析、定量的リアルタイム PCR (qPCR)、RNA シーケン

シング (RNA-seq) を行った。

(ii) マウスモデルと *in vivo* 実験

著者は、AD-MSCs と Capan-1 を免疫不全マウスの皮下に共同移植することにより、臨床膵癌の間質の特性をもつモデルマウスを作製した (以下、Stroma-rich cell line-derived xenograft, Sr-CDX とする)。著者は初めに、臨床膵癌で観察される特徴である desmoplasia、化学療法抵抗性、CAF の不均一性 (CAF heterogeneity)、を再現できているかという点に着目し、Capan-1 だけを移植する従来のマウスモデル (CDX) と比較し、この Sr-CDX モデルの妥当性を評価した。第二に、代表的な CAF サブタイプである、myoblastic CAP (myCAF)、inflammatory CAF (iCAF) および antigen-presenting CAF (apCAF) の存在を、免疫組織化学および RNA シークエンス (RNA-seq) によって検証した。次に、単細胞 RNA-seq (scRNA-seq) により AD-MSC 由来の Sr-CDX CAF を単細胞レベルで検証した。

【結果】 (i) *in vitro* 共培養実験

著者は AD-MSC と Capan-1 をペトリディッシュで直接共培養したところ、得られた形態は、癌細胞が形成する腺管構造の周囲に豊富な間質細胞が取り囲むという、典型的な臨床膵癌の組織像と類似していることを確認した。直接共培養と間接共培養のタイムラプス記録により、AD-MSC は異なる培養条件下で異なる形態変化を示すことを明らかにした。著者は、qPCR による遺伝子発現解析では、間接トランズウェル共培養では iCAF マーカー遺伝子 (*CXCL1*, *IL6*, *LIF*) で発現量増加を認めたが、myCAF マーカー遺伝子 (*ACTA2*, *CTGF*, *TPM1*) の発現増加は認めなかったことを示した。一方、直接共培養では myCAF マーカー遺伝子と iCAF マーカー遺伝子の両方の発現量増加を認めたとし、これらは RNA-seq 解析でも同様の結果であったことを示した。

(ii) マウスモデルと *in vivo* 実験

著者は、AD-MSC と Capan-1 を共同移植する Sr-CDX は、Capan-1 だけを移植する従来のマウスモデル (CDX) よりも高い腫瘍増殖と化学療法抵抗性が誘導され、ヒト PDAC の組織学的特徴である desmoplasia が再現されることを確認した。GFP 抗体を用いた免疫組織染色により、この desmoplasia はマウス由来の細胞ではなく、移植した AD-MSC から構成されることを確認した。また、Sr-CDX 腫瘍の AD-MSC 由来の GFP 陽性 CAF (Sr-CDX CAF) の RNA-seq 解析により、遺伝子発現パターンは myCAF、iCAF、apCAF マーカーの発現や、共通 CAF マーカー (*COL1A1*) といった既知の CAF 関連遺伝子プロファイルを示した。著者は、移植前の AD-MSC と Sr-CDX CAF の scRNA-seq 解析により、もともと myCAF 様の特徴を示す AD-MSC が、myCAF、iCAF、apCAF、共通 CAF マーカーを含む複数の CAF サブタイプに分化していることを明らかにした。また myCAF、iCAF 両方の特徴を示す CAF の存在も確認し、もともと myCAF 様の特徴を示す AD-MSC が、myCAF、iCAF、apCAF、共通 CAF マーカーを含む 7 つの CAF サブタイプに分化していることを明らかにした。また myCAF、iCAF 両方の特徴を示す CAF サブタイプも含まれることを確認した。また著者は、新たなサブタイプが存在する可能性を見出し、このサブタイプは免疫組織染色により臨床膵癌にも存在することを確認した。

【結論】以上のように、著者は本研究で CAF 研究のためのモデルマウス (Sr-CDX) を開発し、その CAF の解析により、AD-MSC が myCAF、iCAF、apCAF といった既知の CAF サブタイプに分化することを明らかにした。また、新たなサブタイプが存在する可能性を見いだした。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、本研究においてモデルマウス (Sr-CDX) を開発し、これを利用して AD-MSC が myCAF、iCAF、apCAF といった既知の CAF サブタイプに分化することを初めて明らかにした。CAF 分化の多様性を明らかにした極めて興味深い結果である。今後の間質細胞標的治療の開発に寄与する研究であると評価される。また、作製された新しい Sr-CDX モデルは、CAF 多様性に関するより詳細な解析、PDAC の発生と進行、および間質細胞標的治療の開発に貢献すると考えられる。

(最終試験の結果)

令和 3 年 1 月 6 日、専門委員会において、論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。