

氏名（本籍）	上前 洋二（香川県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7085 号		
学位授与年月	平成26年 4月30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	Autocrine CXCL12 regulates the proliferation of glioma stem cells (CXCL12 のオートクリンはグリオーマ幹細胞の増殖を制御する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	長田 道夫
副査	筑波大学講師	博士（医学）	小原 直
副査	筑波大学講師	博士（医学）	河合 弘二
副査	筑波大学講師	博士（医学）	佐藤 藤夫

論文の内容の要旨

(目的)

神経膠腫（グリオーマ）は、予後不良の脳腫瘍の代表的疾患である。近年のがん研究の注目すべき点として、がん幹細胞がある。グリオーマにおいても、がん幹細胞が VEGF や CXCR4 などの血管新生関連分子を分化型のグリオーマ細胞より強く発現することで、腫瘍組織中に非常に発達した腫瘍血管を構築し、腫瘍増殖を高めていることが報告されている。更に、その腫瘍血管の一部はグリオーマ幹細胞から分化した細胞から構成されていることが報告されている。本研究は、がん幹細胞に特異的発現が見られ、生命予後とも相関するケモカイン受容体 CXCR4 とそのリガンドである CXCL12 (SDF-1) に着目し、がん幹細胞の自己増殖能と組織学的特徴である血管新生への関与を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

1. 血管新生を介した間接的な腫瘍増殖の解析

TS 細胞 (INK4a/ARF⁺ノックアウトマウス由来の神経幹細胞に H-Ras^{v12} 遺伝子を導入したグリオーマ幹細胞株) を神経幹細胞用培地 (NSM) から血管内皮細胞用培地 (ECM) に変え、形態変化を解析した。また CXCR4 のアンタゴニストでシグナル阻害し、チューブフォーメーションアッセイを行った。更に ELISA 法で VEGF 量を測定した。

2. グリオーマ幹細胞の直接的な腫瘍増殖の解析

マウス CXCL12 siRNA を用い TS 細胞の CXCL12 の発現を抑制し、その効果を RT-PCR 法により

確認した。また、増殖抑制効果を遺伝子導入 72 時間後の細胞数をカウントして解析した。

3. TS 細胞による CXCL12 の影響を *in vivo* での解析

マウス CXCL12 shRNA 導入 TS 細胞株を、C56BL/6 マウスに皮下移植後の腫瘍径の変化を測定した。また、血管新生関連分子に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析を行い定量した。

(結果)

1. TS 細胞は、ECM 培地中では血管内皮細胞様の形態を呈した。血管内皮細胞関連分子は、TS 細胞でのみ CXCR4 が発現した。ECM 事前培養では CXCL12 の発現上昇が見られた。TS 細胞の血管内皮細胞様変化は、CXCL12/CXCR4 シグナルを阻害しても変化しなかった。
2. CXCL12 siRNA 遺伝子導入により TS 細胞は増殖抑制された。CXCL12 shRNA 遺伝子導入した TS 細胞でも、同様の増殖抑制効果が見られた。
3. CXCL12 shRNA による TS 細胞の増殖抑制効果は *in vivo* でも認めた。CD31、vWF の発現には違いはなかったが、腫瘍組織中にはマクロファージのマーカー F4/80 の発現が高頻度に見られた。

(考察)

今回の研究では、グリオーマ幹細胞自身が発現する CXCL12 の働きを、自身の細胞増殖を活性化する直接的影響と血管新生を介した間接的な影響に分けて解析した。まず直接的な影響としては、CXCL12 の発現阻害により *in vitro*、*in vivo* に関わらずグリオーマ幹細胞の増殖抑制効果が見られたことから、グリオーマ幹細胞は自身の CXCL12 を介した細胞増殖を行っていると考えられる。間接的影響としては、*in vitro* で CXCL12/CXCR4 のシグナルを阻害しても、グリオーマ幹細胞の血管内皮様の分化や VEGF の発現に影響が見られなかったことから、その関与は少ないと考える。以前の報告では、グリオーマ幹細胞の CXCR4 を shRNA で阻害することにより、CXCL12/CXCR4 下流の VEGF 発現が抑制されることで、増殖抑制効果があるとされていたが、今回の研究では、これを支持するものではなかった。また、*in vivo* でのグリオーマ幹細胞の CXCL12 阻害効果を解析結果から、血管新生には関与しないと考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究により、グリオーマ幹細胞自身が発現する CXCL12 が、直接的に腫瘍細胞増殖を促進している一方、間接的な血管新生への影響はほとんどないことが明らかとなった。この成果は、グリオーマ幹細胞の細胞生物学的なアプローチを通して、グリオーマへの新しい治療開発に繋がることを示した意義のある論文である。

平成 26 年 2 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと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。