

| | | | |
|---------|--|--------|-------|
| 氏名（本籍） | 山田 武史 | | |
| 学位の種類 | 博士（医学） | | |
| 学位記番号 | 博甲第 | 7458 | 号 |
| 学位授与年月 | 平成 27 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 | Identification of A Hepatocellular Carcinoma Cell Line With Cancer Stem Cell (CSC) Hierarchy And Effect of Sorafenib On CD13-positive CSCs (癌幹細胞 CSC ヒエラルキーを有する肝細胞癌細胞株の同定と CD13 陽性 CSC に対するソラフェニブの効果に関する検討) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 博士（医学） | 原 尚人 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士（医学） | 南 優子 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士（医学） | 宮崎 淳 |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士（医学） | 石川 栄一 |

論文の内容の要旨

（目的）

癌幹細胞（Cancer Stem Cell : CSC）による明確な階層性が保持された肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma : HCC）細胞株を同定し、階層性におけるソラフェニブの標的細胞集団を明らかとして、HCC の新たな治療戦略を模索することを目的とした。

（対象と方法）

HCC の細胞株として、HuH-7、Li-7、PLC/PRF/5、HLE および HLF を使用した。継代培養中に細胞株の CSC が progenitor へと分化し CSC の割合が減少していくという仮説を立て（Population switch）、2 か月間の培養前後での様々な表面マーカー（CD13、EpCAM、CD133、CD44、CD90、CD24 および CD166）や形態、腫瘍形成能の変化を評価した。*in vitro* における各細胞集団の階層性を評価するため、Bulk の再構成能や増殖能、ALDH 活性、Spheroid 形成能、および Stemness 遺伝子発現を比較した。さらに細胞集団の 5-FU・ソラフェニブに対する感受性を評価した。

（結果）

Li-7 細胞では 1 か月の培養で CD13(+)CD166(-)細胞が速やかに消失し、代わって CD13(-)CD166(+)細胞が徐々に増加し 2 か月で Bulk のほとんどを占めることが示された。また、継代培養とともに形態変化を認め、ヌードマウス皮下移植における腫瘍形成能の低下を認めた。

in vitro において、CD13(+)CD166(-)細胞は増殖が遅く、Bulk の Li-7 細胞を唯一再構築した。一方、

CD13(-)CD166(+)細胞は顕著に増殖速度が速いものの、他の細胞集団を再構築しなかった。CD13(+)/CD166(-)細胞はALDH活性とSpheroid形成能を有し、5FUに対して抵抗性であった。*KRT19*やStemness関連遺伝子はCD166(-)細胞においてより高く発現していた。ソラフェニブは*in vitro*でCD13(+)/CSCを含むCD166(-)細胞に対して、選択的に殺細胞効果を示した。CD166(-)細胞では、*FGF3*と*FGF4*の遺伝子発現が高かった。5FUに引き続くソラフェニブの逐次治療は、BulkのLi-7に対して単剤や逆の投与順よりも高い増殖抑制効果を示した。

(考察)

Li-7細胞株が培養経過でCSCからnon-CSCへと変化していくことを見出した。これをもとに、Li-7細胞に明確な階層性が存在し、CD13(+)/CD166(-)細胞が増殖の遅いCSC、CD13(-)/CD166(+)細胞が増殖の速いprogenitorとして存在することを明らかとした。そして、この*in vitro*のモデルにおいて、ソラフェニブがCSCを、5FUがprogenitorをそれぞれ標的としていることを明らかとした。

培養癌細胞株は、樹立後数十年間、その特性が維持されると考えられてきたが、少なくともある種の細胞株においては特性が変化する可能性が示された。Li-7細胞はマウス移植腫瘍片として樹立および継代されており、何十年も前に*in vitro*で樹立された他の細胞株と比較して、より不均一な細胞株である可能性が考えられる。また、この現象は、同一細胞株のCSCマーカーの発現割合が報告により異なる原因の一つである可能性が考えられる。

既報の通りCD13陽性細胞は、Li-7細胞株においても増殖の遅いCSCとして存在することが、様々な機能的アッセイ系を用いて示された。一方、この細胞株では表面マーカーでCSCとprogenitorを容易に識別可能であり、薬剤の標的を明らかとすることに有用な*in vitro*のモデルである。

既報ではソラフェニブがCSCを標的とするという報告と抵抗性であるとする報告がある。ただし、それぞれのモデルにおけるCSCの特性は異なっている。一方、臨床的にソラフェニブ奏効例では*FGF3*と*FGF4*の増幅がみられるが、CD166(-)細胞では、ソラフェニブ標的遺伝子の他*FGF3*と*FGF4*の発現レベルが高く、本研究結果は臨床データを裏打ちするデータとなった。

また、5-FUを先行したソラフェニブの逐次治療がより高い増殖抑制効果を示すことを明らかにしたが、このことは現在様々な臨床試験において検証されている。Li-7細胞はさらなる研究を進める価値あるモデルであると考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は肝細胞癌での癌幹細胞の階層性に注目している。階層性が保持された肝細胞癌細胞株の同定に成功し、分子標的薬であるソラフェニブの標的細胞集団を明らかにしている。治療困難の肝細胞癌に対して、新たな治療戦略の指針となりへ、新たなバイオマーカーの開発など、すぐに臨床応用できることも評価できる。

平成26年12月19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の説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行なった。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。