

氏名（本籍）	孫 略		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	7442	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	In vitro stemness characterization of radioresistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76 (髄芽腫細胞株 ONS-76 からの放射線抵抗性クローンの樹立とその癌幹細胞形質の評価)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	櫻井 英幸
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	熊田 博明
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	鶴嶋 英夫
副査	筑波大学助教	博士（理学）	山下 年晴

論文の内容の要旨

(目的)

近年、正常組織と同様に癌組織においても、癌幹細胞を頂点とした階層的な細胞社会が存在することが明らかになっている。癌幹細胞は正常な組織幹細胞と同様に自己複製能、多分化能、組織形成能(腫瘍形成能)を有するだけでなく、多くは休止期に集まり、微小環境(ニッチ)に守られていることも明らかとなってきた。また、癌幹細胞は放射線に対して抵抗性を示すことが報告されている。そのメカニズムとしては、細胞内の抗酸化活性が高いこと、DNA 損傷の修復能が高いことなどが報告されている。しかし、放射線治療後に生き残るような放射線抵抗性細胞がどのような癌幹細胞様形質を有するかは未だ不明である。そこで、本研究では放射線治療とその後の再発のプロセスを *in vitro* で再現し、放射線照射後に生き残った放射線抵抗性細胞をクローニングし、その癌幹細胞様性質(stemness)の解析を試みた。

(対象と方法)

本研究にはヒト髄芽腫細胞株 ONS-76 を用いた。この細胞株は特定の培養条件下でニューロン、またはグリア様の細胞に分化することが可能であり、髄芽腫幹細胞のマーカである CD133 を安定的に発現する。*in vitro* で放射線治療後のプロセスを再現し、放射線抵抗性クローンの樹立するためにレプリカマイクロウェル法を用いた。まず、細胞にガンマ線 5Gy を照射後、10cm ディッシュに撒き直して 2 週間培養しコロニーを形成させた。クローニングシリンダーを使ってコロニーを剥がして、均等に 3 つの 96

well plate に播種した。24 時間後に 1 枚の plate に再度 5Gy を照射し、5 日後にこの 5Gy 照射した plate ともう 1 枚の未照射の plate をメチレンブルーで染色した。染色後にも、両方の plate で濃く染まっていた well の細胞を 3 つ目の未染色の plate から選び出し、これらの細胞を放射線抵抗性クローンとした。癌幹細胞様性質の評価には以下の方法を用いた。①脳腫瘍幹細胞マーカーである CD133 の発現をフローサイトメトリー法で解析した。②無血清培地中でのスフィア形成能を、限界希釈法を用いて解析した。③複数の癌幹細胞の指標の 1 つである side population 細胞の存在頻度を解析した。

(結果)

レプリカマイクロウェル法を用いてガンマ線 5Gy 照射後にも生き残り、かつ強い増殖能を有する 20 個の放射線抵抗性クローンを選び出した。この 20 個の放射線抵抗性クローンの CD133 陽性率を解析したところ、0.06%から 43.91%と幅広く様々な陽性率のクローンが存在していた。親株の ONS-76 (3.77%) より有意に CD133 陽性率が高く、陽性率が 10%を超えていたクローンは 3 つ (ONS-F8、ONS-B11、ONS-F11) あり、CD133 陽性率はそれぞれ 25.30%、43.91%、14.19%であった。次に sphere の形成能を評価したところ、1 well に最低 1 つのスフィアを作るのに必要な細胞数は ONS-76 で 23.2 個、ONS-F8 で 10.8 個、ONS-B11 で 10.3 個、ONS-F11 で 13.2 個であった。このことから、これら 3 つのクローンでは sphere 形成能が高いことが示された。また、side population についても解析したところ、その存在頻度は ONS-76 で 0.14%、ONS-F8 で 0.26%、ONS-B11 で 0.33%、ONS-F11 で 0.24%であり、これら 3 つのクローンは side population 細胞の存在頻度も親株 ONS-76 より高い結果となった。最後に、樹立した 3 つのクローンでは経時的に CD133 陽性率が変化することが認められたので、経時的に CD133 の陽性率を測定した。その結果、これら 3 つのクローンでは播種後 48 時間から 72 時間にかけて CD133 の陽性率が急激に増加することが明らかとなった。

(考察)

本研究では放射線照射後に生き残った放射線抵抗性クローンを 20 株樹立した。そのうち、高い CD133 陽性率をもつクローンは 3 株 (ONS-F8、ONS-B11、ONS-F11) あった。これらクローンを 10 回以上継代しても CD133 陽性率は低下しなかった。これらクローンの CD133 陽性細胞は強い自己複製能を持つことが示唆された。また、この 3 株では side population ratio、sphere 形成能も高く、高い癌幹細胞様性質を有すると考えられた。また、この 3 株では播種後 48 時間までは CD133 陽性率が低いが 48 時間から 72 時間にかけて急激に CD133 陽性率が増加していた。この 3 株では CD133 陽性細胞が培養 48 時間までは分裂を停止しているか非対称分裂を行っていて、48 時間から 72 時間にかけて急速に自己複製を行っている可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では放射線照射後の 20 株の放射線抵抗性クローンを樹立し、その中に高い CD133 陽性率を示すクローンを見いだした。放射線照射後に生き残り、かつ強い癌幹細胞様性質を持つ細胞が放射線治療後の再発の原因となっている可能性が示唆され、そのメカニズムの解明により飛躍的にがん治療を進展させることにつながる研究と思われる。

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。