

| | | | |
|---------|--|--------|-------|
| 氏名 | 山田 健二 | | |
| 学位の種類 | 博士 (医学) | | |
| 学位記番号 | 博甲第 7838 号 | | |
| 学位授与年月 | 平成 28 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 and characterization of the TTF-1/p63 double-positive cells from terminal respiratory unit of the human lung. (ヒト肺終末呼吸ユニットにおける TTF-1/p63 共陽性細胞 の同定とその特徴) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 長田 道夫 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士(医学) | 小田 竜也 |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士(医学) | 松井 裕史 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士(工学) | 奥脇 暢 |

論文の内容の要旨

(目的)

肺癌は、わが国をはじめとする先進諸国の死亡原因として大変重要な疾患である。肺癌の多くは喫煙との強い因果関係があることが知られているが、近年、終末呼吸ユニット(**terminal respiratory unit; TRU**)に発生する **TTF-1**(**thyroid transcription factor-1**)陽性の肺腺癌は、喫煙歴のないアジア人女性に多く、その中で **EGFR** 変異陽性例の割合が高いなどの特徴を有することが明らかになった。**TRU-type** 肺腺癌と呼ばれるこの一群は未だ病因が不明であり、禁煙による予防効果が期待できないことから、その本態解明と予防法や治療の確立は急務である。この点、本腫瘍がどのような細胞からどのような分子メカニズムで発がんし、その後浸潤癌へと進展するののかについては未解明な部分が多い。そこで今回 **TRU-type** 肺腺癌の起源細胞と想定される **TTF-1** 陽性のヒト正常組織幹細胞の体外培養法の開発を通じて、**TRU-type** 肺腺癌の本態解明を目指すことを目的として研究を進めた。

(対象と方法)

まずヒト正常末梢肺組織から細胞の分離・培養を試みた。培養法は 2012 年に **Georgetown** 大学のグループから報告された培養法を応用し、**Feeder(F)**、**F medium(F)**、**ROCK** 阻害剤である **Y-27632(Y)** の頭文字を取って本培養法を **FFY** 法とした。さらに、**TTF-1** 陽性細胞を優位に増殖させることを目

的として、Wnt3A と R-spondin1 の conditioned medium(WR)の添加を試みた(FFY-WR 法)。次に FFY 法、FFY-WR 法、従来の肺胞上皮専用無血清培地を用いた培養法で増殖する上皮細胞の growth curve の作成を行い、培養経過中の細胞における TTF-1/p63 蛋白発現について、ウエスタンブロットと免疫染色にて検討した。また、WR が telomerase 活性に与える影響については TRAP assay で検討した。さらに遺伝子非導入細胞および hTERT 導入による不死化細胞を single cell cloning し、TTF-1/p63 発現の検討、サブクローン解析、増殖の EGF 依存性のなどについて検討を行った。

(結果)

FFY-WR 法により、これまで長期培養が困難であったヒト TRU 由来(TTF-1 陽性)細胞の培養に成功した。想定外のことに、主として増殖する細胞は TTF-1/p63 共陽性[TTF-1/p63 DP(double positive)] という特徴的な形質を示していた。これらの細胞を single cell cloning した結果、増殖速度が緩徐である TTF-1(+)/p63(-)の TTF-1 single positive (TTF-1 SP)クローンも存在しており、subcloning の結果、TTF-1 SP クローンは TTF-1/p63 DP クローンから生ずることが明らかになった。また TTF-1 SP クローンは増殖を EGF に完全に依存していた。ヒト成体肺において TTF-1/p63 DP 細胞は TRU の入口部である終末細気管支・肺胞管移行部に局限して存在し、Club 細胞と密接に接して存在していることが明らかになった。また、in vitro において TTF-1/p63 DP 細胞は WR 添加により telomerase 活性が維持され、通常の複製限界を大きく超え 100 population doublings 以上まで培養・維持可能であった。

(考察)

Georgetown 大学のグループは feeder 細胞から分泌される液性因子が telomerase 活性を亢進させることで様々な組織の上皮細胞が複製限界を超えて無限培養できると報告しているが、その液性因子は明らかでない。本研究では WR 添加により telomerase 活性が亢進し、長期培養が可能となったことから、その液性因子は R-spondin を含む Wnt agonist の可能性がある。

TRU-type の肺腺癌は TTF-1 SP 細胞に由来すると考えられてきたが、新たに同定した TTF-1/p63 DP 細胞がその起源細胞と考えることで、これまで説明が難しかった、TTF-1/p63 共陽性が特徴である ALK 陽性肺癌の起源細胞、TRU-type の肺腺癌の罹患感受性遺伝子としての TP63、上皮内腺癌から浸潤癌に進展する際に高発現する p63 標的遺伝子などに細胞分化の観点からの新たな説明が可能となると考えられる。さらに TTF-1 SP 細胞は増殖を EGF に完全に依存していたことから、TTF-1/p63 DP 細胞に生じた EGFR 変異は TTF-1 SP 細胞の自律性増殖をもたらすと考えられ、これを II 型肺胞上皮の自律性増殖と言い換えれば、TRU-type 肺腺癌の初期像の特徴そのものである。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、肺腺癌の起源とその腫瘍化を明らかにするために、新規培養法(FFY-WR 法)を開発した結果、2 種類の TTF-1 陽性細胞の培養系を初めて確立した。TF-1/p63 共陽性細胞は特徴的な細胞種であり、TRU-type 肺腺癌の起源細胞候補として肺腺癌の細胞生物学に貢献する画期的な成果として評価できる。

平成 28 年 1 月 6 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。