

氏名	佐藤 由花子		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 9193 号		
学位授与年月	平成 31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	A robust culture method for maintaining tumorigenic cancer stem cells in the hepatocellular carcinoma cell line Li-7 (肝細胞癌細胞株 Li-7 における高腫瘍形成性がん幹細胞の維持培養方法)		
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)	石川 栄一
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	錦井 秀和
副査	筑波大学助教	博士 (理学)	斎藤 祥子

論文の内容の要旨

佐藤由花子氏の博士学位論文は、肝細胞癌細胞株 Li-7 における高腫瘍形成性がん幹細胞の維持培養方法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、肝細胞癌細胞株 Li-7 において、通常の継代培養を長期間行うと CD13+CD166-がん幹細胞の割合が減少し腫瘍形成能が低下することに注目し、高腫瘍形成能獲得メカニズムの解明とがん幹細胞を標的とした新規治療の研究につなげることを視野に、Li-7 の CD13+CD166-がん幹細胞を長期間維持培養することを目的として以下の実験を行っている。

(方法) 著者は、通常条件の培養では RPMI1640 + 10%FBS 培地を用い、CD13+CD166-がん幹細胞を維持させる目的では市販の ES/iPS 細胞培養用培地である mTeSR1 培地を用いている。著者は、フローサイトメトリー解析、アルデフローアッセイ、スフェア形成アッセイ、セルソーティングで回収した細胞の長期培養実験、細胞のマウス皮下移植実験、遺伝子発現解析を行い、mTeSR1 培地で培養された Li-7 の特性解析を行っている。

(結果) 著者は、市販の ES/iPS 細胞培養用培地で培養された Li-7 が CD13+CD166-細胞を高率に含むことをフローサイトメトリー解析で明らかにしている。著者は、使用した ES/iPS 細胞培養培地のうち、mTeSR1 培地が Li-7 の安定培養に適していることを明らかにし、長期継代培養しても CD13+CD166-細胞が高率に維持されることを明らかにしている。さらに著者は、mTeSR1 培地で培養された Li-7 が通常培養された Li-7 に比べて高いマウス皮下腫瘍形成能を持つことを明らかにしている。次に著者は、この mTeSR1 培地で培養された Li-7 の CD13+CD166-細胞が、肝細胞癌がん幹細胞の表面マーカーである EpCAM、CD133 や ES/iPS 細胞の表面マーカーである SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 を高発現していることを明らかにしている。次に著者は、CD13+CD166-細胞ががん幹細胞の特徴である高い ALDH 活性と高いスフェア形成能を持つことを明らかにしている。さらに著者は、mTeSR1 培地で培養された CD13+CD166-細胞を再

び通常培養に戻すと、非がん幹細胞である CD13-CD166+細胞に分化することを示し、CD13+CD166-細胞ががん幹細胞の特徴のひとつである分化能を持つことを明らかにしている。次に著者は、セルソーティングで回収した各分画細胞のマウス皮下移植実験によって、mTeSR1 培地で培養された Li-7 の CD13+CD166-細胞が、最も高い腫瘍形成能を持つことを明らかにしている。さらに著者は、Li-7 のマウス皮下腫瘍を摘出して回収した細胞も、*in vitro* の通常培養によって CD166+細胞への分化がみられることを明らかにしている。最後に著者は、遺伝子発現解析を行い、mTeSR1 培地で培養された Li-7 の CD13+CD166-細胞と、他の分画細胞の遺伝子発現比較を行っている。これにより著者は、高い腫瘍形成能の獲得に関与する可能性のある遺伝子として FGFR シグナルに関連する遺伝子群を含む複数の候補遺伝子を見出している。

(考察) 著者は、市販の ES/iPS 細胞培養用培地を利用した培養によって、がん細胞株 Li-7 に含まれるがん幹細胞が長期維持培養できることを、本論文で初めて明らかにしている。著者は、本論文で示した培養方法は、市販の ES/iPS 細胞培養用培地と細胞バンクに寄託されたがん細胞株を用いているため、簡便に再現可能な方法としている。著者は、遺伝子発現解析の結果から、がん幹細胞の維持と ES/iPS 細胞の維持に必要なメカニズムには共通点がある可能性を指摘しており、市販の ES/iPS 細胞培養用培地は、Li-7 以外のがん幹細胞の研究へ応用できる可能性があると考えている。著者は、高い腫瘍形成能の獲得に関与する可能性のある複数の候補遺伝子を明らかにしており、今後の研究でそれらの遺伝子の機能解析を行い、高い腫瘍形成能獲得メカニズムの解明や、がん幹細胞を標的とした新規治療の研究に発展させたいとしている。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文は、市販の ES/iPS 細胞培養用培地ががん幹細胞の維持培養に有用であることを初めて見出した点で意義のある論文である。Li-7 のがん幹細胞を長期間維持培養するという研究目的達成のために、著者はアイデアと工夫をもって研究に取り組んでいる。本研究の成果は、今後の肝細胞癌がん幹細胞の基礎研究への応用にとどまらず、がん幹細胞を標的とした新規治療の研究といった臨床研究への発展が期待される内容である。

平成 31 年 1 月 7 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。