

審査の結果の要旨

氏名 宮下 知之

本論文は 2 章から構成されている。第 1 章では単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明について、第 2 章ではがん幹細胞の浸潤像の解明について述べられている。

第 1 章では、**Time-lapse imaging** を用い、扁平上皮癌のがん幹細胞が単細胞レベルにおいてどのように増殖し腫瘍塊を形成するのか詳細な解析が行われている。がん幹細胞は再発や転移の原因細胞であると考えられており、治療の際に残存、もしくは全身に播種されたがん幹細胞が増殖することで再発巣や転移巣が形成されると考えられている。本章では *in vitro* の系を用い、単細胞レベルにおける腫瘍塊の形成過程を検討することで、再発巣や転移巣の形成過程を明らかにしようと試みている。その際に、細胞周期を可視化するために **Fucci** を導入するとともに、研究室で独自に同定したがん幹細胞マーカーである **Podoplanin** を用い、新規方法論として細胞運命系譜図を作製し、個々の細胞の分裂までにかかる時間、細胞死をきたす頻度について解析が行われている。解析にあたり、非がん幹細胞との比較を行うことで、がん幹細胞の高い腫瘍塊の形成能にはその増殖周期は関与せず、細胞死をきたしにくいことが重要であることを明らかにした。がん幹細胞は休眠状態にあるとされる報告がある一方、扁平上皮癌では未分化な細胞は増殖が活発であること、分化した細胞はやがて細胞死をきたすことから、がん幹細胞と分化度の関連を考察している。さらに、**Podoplanin** の機能解析を行っている。**Sh-RNA** による **Podoplanin** のノックダウンにより腫瘍塊の形成と、単細胞レベルにおける細胞死が誘導されたことから、がん幹細胞の高い腫瘍形成能には、がん幹細胞に発現する **Podoplanin** が重要な機能を果たしていることが示唆された。さらに、**Podoplanin** の下流シグナルの **ROCK** シグナルを検討したところ、がん幹細胞でより強い **ROCK** シグナルが確認された。**ROCK** 阻害剤を添加することで腫瘍塊の形成の抑制と細胞死の促進が確認された。以上より、がん幹細胞は自身に発現する **Podoplanin** を介して **ROCK** シグナルをより活性化することにより細胞死を回避し、単細胞レベルにおいて高い腫瘍塊の形成能を示すことを明らかにしている。このことから、再発や転移の際に少数の状態に残存したがん幹細胞は、**Podoplanin** を介して **ROCK** シグナルを増強することで腫瘍塊を形成していることを考察している。

第 2 章では、がんの進展課程における間質への浸潤について **Time-lapse imaging** を用いた研究が行われている。間質細胞の有無による浸潤様式の差異と、浸潤におけるがん幹細胞の担う役割を検討している。まず、間質細胞（線維芽細胞）の有無によるがん細胞の浸潤様式を評価している。線維芽細胞存在下において、線維芽細胞により再構成さ

れた ECM に沿ってがん細胞が浸潤すること、さらにはがん細胞の浸潤が促進されており、小型の胞巣を形成しながら浸潤していることを明らかにした。また、線維芽細胞存在下において、浸潤部でより多くの増殖期の細胞を認めたことから、がんはその浸潤過程で増殖を伴うことを明らかにした。実際にはがん患者検体を用いた検討においても線維芽細胞が豊富に含まれる領域において浸潤がん細胞の Geminin 陽性割合が高いことにより、本検討で明らかとなった現象は実際のがんの病態を反映していると考えられる。また、がん患者組織において浸潤部に budding と呼ばれる少数の細胞からなる胞巣が確認されるが、がん細胞が線維芽細胞により再構成された ECM に沿って浸潤することで形成される可能性を示唆している。さらに、線維芽細胞存在下と非存在下におけるがん幹細胞の浸潤について検討している。線維芽細胞非存在下において、がん幹細胞と非がん幹細胞の浸潤に差を認めなかった一方、線維芽細胞存在下においてがん幹細胞は非がん幹細胞と比較して高い浸潤能を示した。しかし、浸潤様式、増殖期の細胞割合に差を認めなかった。第 1 章同様、sh-RNA を用い Podoplanin のノックダウンを行ったところ、線維芽細胞存在下におけるがん細胞の浸潤が抑制された。これらの結果から、線維芽細胞存在下においてがん幹細胞は Podoplanin を介して ECM 内の運動能を活性化していることを示唆している。また、線維芽細胞存在下でのみ浸潤が促進されたことから、がん幹細胞と線維芽細胞の間に、がん幹細胞の浸潤を促進する相互作用が存在している事を示唆している。

以上の結果をまとめて、総合考察ではがん幹細胞は Podoplanin を介して下流のシグナルを活性化し、単細胞レベルにおける生存や浸潤能の亢進を示すことで転移巣の形成に関与していることを考察している。本研究では、断片的に観察されていた事象をリアルタイムで追跡することにより、生体内で実際に起きている事象の一端を解明したと評価される。

なお、本論文は、論文提出者主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1963 字