



Title	Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer
Author(s)	林, 和彦
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51904
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	林 和彦
論文題名 Title	Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer (子宮頸癌における癌幹細胞の可視化の研究)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 2008年のGLOBOCAN studyによると、毎年世界で52万9800人が子宮頸癌に罹患し、27万5100人が子宮頸癌によって死亡したと報告されている。子宮頸癌の治療方法としては手術と化学療法、放射線治療による集学的治療がおこなわれるが、しかし日本における5年生存率は60%程度と満足いく結果は得られていない。 1970年代、癌幹細胞仮説という理論が提唱され、癌のヒエラルキーの頂点に立つ癌幹細胞が自己複製能と多分化能、造腫瘍能によって定義され、一部の癌腫で存在することが示された。この癌幹細胞が放射線耐性と抗癌剤耐性という特徴を持つことがその後報告され、癌幹細胞が実臨床上の治療抵抗性や再発の原因になると考えられるようになった。そこで癌幹細胞を見きわめるシステムを開発するため、本研究は子宮頸癌の細胞株を用いて、癌幹細胞の可視化を行うことと設定した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 癌幹細胞の可視化を図るため、まずZsGreenという蛍光蛋白をコードした遺伝子をオルニチン脱炭酸酵素（ODC）遺伝子上流に遺伝子導入したウイルスを作製した。そのウイルスを癌細胞に感染させ、癌細胞の遺伝子組み換えを行った。ODCと一緒にZsGreen蛋白が転写翻訳されるが、26S蛋白分解酵素によって認識され速やかに分解される。しかし癌幹細胞においては26S蛋白分解酵素の活性が低いために、蛍光蛋白が細胞内に蓄積し細胞が蛍光化する。一方、非癌幹細胞においては26S蛋白分解酵素の活性が高いために、蛍光蛋白は速やかに分解され、細胞は蛍光化しない。 このような遺伝子導入を、子宮頸癌細胞株HeLaとCaSkiに行った。そしてフローサイトメトリー（FACS）にて蛍光度合いを確認し、各細胞株で蛍光化度合の上位群（光る細胞群）と下位群（光らない細胞群）を分類した。以後FACSにて光る細胞群と光らない細胞群をソートした後に各種アッセイを行って、光る細胞群の癌幹細胞性を示していく。 事前に設計した可視化メカニズムの通りに、26S蛋白分解酵素の活性が光る細胞群で低活性であるか、を測定した。26S蛋白分解酵素には主にキモトリプシン、トリプシン、カスパーゼの三種類が存在し、予想通りHeLaとCaSki両方で光る細胞群の方が光らない細胞群よりも3種の蛋白分解酵素活性が低いことが示された。 癌幹細胞の自己複製能が高いことを確認するため、無血清非接着培地中で培養しスフェアの形成数を測定した。その結果、光る細胞群の方が光らない細胞群よりも有意にスフェア形成能が高いことを示した。 癌幹細胞の分化能をみるため、光る細胞をフローサイトメトリーでソートし、7～30日間培養した。そして7日ごとにFACSで光る細胞の割合を測定した。その結果、光る細胞の割合が経時的に減少し、逆にそれ以外の割合が増えていくことが、HeLaでもCaSkiでも確認された。これより光る細胞からそれ以外の細胞（分化細胞）が発生することが確認できた。 放射線耐性についてsurvival assayを用いて調べた。その結果、HeLaにおいては光る細胞群の方が、光らない細胞群よりも高線量域において放射線耐性をもつことが示された。CaSkiにおいても光る細胞群の方が有意に光らない細胞群に比べて放射線耐性を示すことが示された。 癌幹細胞の抗癌剤耐性、特に臨床的に用いられるシスプラチンとパクリタキセルに関して、MTTアッセイを用いて調べた。CaSkiについてのみ、光る細胞群の方が光らない細胞群よりも有意に抗がん剤耐性を示すことが証明できた。 癌幹細胞の造腫瘍能をみるために、マウスを用いたHeLa癌細胞の移植実験を行った。各癌細胞を1000個、10000個、100000個ずつ各々6匹のマウスに移植し、99日後サクリファイスした。1万個や10万個の癌細胞を移植した場合、光る細胞群と光らない細胞群で差はみられなかったが、1000個の癌細胞を移植した場合、光る細胞群の方が光らない細胞群に比べて腫瘍形成割合が高いことが確認できた。この結果より光る細胞群は造腫瘍能が高いことが示された。 〔総括(Conclusion)〕 子宮頸癌の細胞株2種をもちいて、癌幹細胞様細胞の可視化に成功した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 林和彦		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 小川 和彦
	副 査	大阪大学教授 小 泉 雅彦
	副 査	大阪大学教授 富山 忠幸

論文審査の結果の要旨

癌幹細胞は自己複製能と多分化能、造腫瘍能によって定義され、一部の癌腫で存在することが既に示されている。この癌幹細胞が放射線耐性と抗癌剤耐性という特徴を持臨床上的治療抵抗性や再発につながると考えられている。そこで癌幹細胞を見きわめるシステムを開発するため、本研究は子宮頸癌の細胞株を用いて癌幹細胞の可視化を行うことを目的としている。

まずZsreenという蛍光蛋白をコードした遺伝子をオルニチン脱炭酸酵素(ODC)遺伝子上流に遺伝子を子宮頸癌細胞株2種に導入し、光る細胞群と光らない細胞群をフローサイトメトリーでソートし定義した。そしてスフェア形成アッセイ、細胞の経時的変化を測定するアッセイ、放射線感受性アッセイ、抗癌剤感受性アッセイ、マウスを用いた造腫瘍能アッセイにて、光る細胞群が光らない細胞群に比べて癌幹細胞性をもつことを示した。

これらの結果により申請者らは本システムを用いて子宮頸癌幹細胞の可視化に初めて成功した。この研究成果を応用することで、in vitroとin vivo両方で、可視化した癌幹細胞のリアルタイムでの変化が観察可能となり、今後癌幹細胞の治療抵抗性に関する研究が発展すると考えられる。

以上の研究を元に博士の学位授与に値すると認める。