



Title	Cancer Stem Cells Persist Despite Cellular Damage, Emergence of the Refractory Cell Population
Author(s)	長江, 歩
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96310
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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	長江 歩
論文題名 Title	Cancer Stem Cells Persist Despite Cellular Damage, Emergence of the Refractory Cell Population (治療抵抗性細胞集団を出現させることで癌幹細胞は細胞障害に関わらず生存する)
論文内容の要旨	
<p>〔目的〕</p> <p>化学療法は様々な癌に対して効果的だが、完全に腫瘍細胞を排除することは難しく、治療抵抗性を示す細胞の出現が問題とされている。この治療抵抗性は、腫瘍内の多様性、腫瘍内不均一性が関与し、癌幹細胞(CSCs)が関連していると報告されている。一般的な殺細胞性の抗がん剤は腫瘍内の非CSCsを標的としておりCSCsを排除することができないことから、その効果は限定的であると考えられ、仮に非CSCsを完全に除去する治療法であったとしても、CSCsが残存することで腫瘍を再増殖させうる。CSCsは細胞傷害性薬剤から身を守る特異的な性質を持つことに加え、治療抵抗性のメカニズムの一つとして、CSCsは治療に抵抗性を示し再発につながるより悪性度の高い集団を新たに形成するのに関与するのではないかと考えた。化学療法後に一過性に出現し、腫瘍の再発を引き起こすCSCsについて検討した。</p> <p>〔方法〕</p> <p>大腸癌細胞株(DLD-1、HCT116、HT29、RK0、SW480)と大腸癌手術検体より樹立したヒトオルガノイド(iCC603, iCC724, iCC821)に対して、抗癌剤(5-FU)感受性を検討し、FACSを用いて5-FU投与後のCSCマーカーの変化を評価した。ここで、5-FU投与後にオルガノイドのみに新規出現した細胞集団に対して、悪性度や治療抵抗性に関与するか、どのような細胞であるのか検討した。まず、経時的な表面マーカーの変化や増殖能、抗癌剤感受性の変化、異種移植モデルを用いた増殖能について検討した。この細胞集団の詳細な解析を行うため、DsRedをトランスフェクションしたオルガノイドを作成し、新規出現した細胞集団は抗癌剤投与前のどの細胞由来かについて検討した。加えて、Single cell RNA-seq解析を行った。変動する遺伝子についてqRT-PCRでも評価を行った。その中で特徴的な遺伝子について、増殖能評価を行うとともに、in vivoでの検討も行った。</p> <p>〔結果〕</p> <p>5-FU感受性を細胞株、オルガノイドで検討した。生存濃度で細胞変化を確認すると、オルガノイドにおいてのみ、5-FU濃度が上がるにつれてCD44陰性(-ve)の集団の出現割合が増加した。他のCSCマーカーでは変化が乏しかった。CD44-ve集団は5-FU単回投与後に一過性に割合が増えるが、時間経過とともに減り、元の集団に近似する集団を再形成した。さらなる5-FU投与でも同様の結果であった。このCD44-ve集団は単独で5-FUなしで培養すると、CD44陽性(+ve)が徐々に出現し、5-FU投与までの集団を再構成する結果となった。5-FU投与前CD44-veでは増殖を認めなかった。5-FU投与後のCD44-ve細胞増殖能評価においては、CD44-ve細胞はCD44+ve細胞よりも高いことが明らかとなった。薬剤感受性においても、親細胞と比較して低下した。異種移植モデルにおいて親細胞と比較してCD44-ve細胞は腫瘍サイズが有意に増大した。DsRed導入実験の結果からは、CD44-ve細胞は5-FU投与前のCD44+ve細胞に由来することも示された。Single cell RNA-seq解析では、抗癌剤投与後のCD44-ve集団においてPOU5F1遺伝子が高発現していることが示され、trajectory解析、RNA velocity解析の結果から、5-FUにより上記遺伝子の発現が誘導されることが示された。qRT-PCRではCD44-ve細胞においてPOU5F1に加えてSOX2、NANOGの発現が高く、幹細胞性の高い集団であることが示唆された。POU5F1-EGFP-Casp9ベクターをトランスフェクションした細胞を作成し、POU5F1が発現した細胞にdimerizerを投与すると細胞死するシステムを構築したが、5-FU投与後の細胞集団に対して、dimerizer投与によりdimerizer未投与と比較して細胞増殖が有意に抑制されることがin vivoおよびin vitroにおいて示された。</p> <p>〔総括〕</p> <p>抗癌剤投与後に一過性に出現するCD44-ve細胞は化学療法抵抗性に関係しており、その原因遺伝子の一つにPOU5F1が関与していることが示された。POU5F1を抑制することで、治療薬剤投与後の再発・再燃の予防につながることを示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 長江 歩	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 土岐 祐一郎
	副 査 大阪大学教授 森井 真一
	副 査 大阪大学特任教授 和田 尚
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>化学療法は様々な癌に対して効果的だが、完全に腫瘍細胞を排除することは難しく、治療抵抗性を示す細胞の出現が問題とされている。治療抵抗性は、腫瘍内の多様性、腫瘍内不均一性が関与していると報告されている。本論文では、化学療法後に一過性に出現する特殊な細胞集団の存在と、その特性について明らかにした。ヒトオルガノイドにおいて5-FU濃度が上がるにつれてCD44陰性 (-ve) の集団の出現割合が増加した。この集団は時間経過とともに減少し、元の集団に近似する集団を再形成した。CD44-ve集団の単独培養で元の細胞集団に類似した集団を再構成し、増殖能も高かった。Single cell RNA-seq解析では、5-FU投与後のCD44-ve集団においてPOU5F1遺伝子が高発現し、5-FU投与によりPOU5F1遺伝子の発現が誘導されることが示された。POU5F1を抑制することで、腫瘍増殖を制御できる可能性があると考えられた。上記論文を学位に値するものと認める。</p>	