

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	石黒 竜也
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1783 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Establishment and Characterization of an In Vitro Model of Ovarian Cancer Stem-like Cells with an Enhanced Proliferative Capacity. (卵巣がん幹細胞の in vitro モデルの確立ならびに特性解明)
論文審査委員	主査 教授 藤井 雅寛 副査 教授 味岡 洋一 副査 教授 榎本 隆之

### 博士論文の要旨

難治性婦人科悪性腫瘍のひとつである卵巣がんは、化学療法の進歩により若干の生存率の改善がみられるもの、未だに高い致死率を示しており、新たな治療戦略の開発が望まれている。近年、がんの転移や治療抵抗性に、がん幹細胞が寄与する「がん幹細胞説」が固形がんにおいても提唱されてきている。難治がんのがん幹細胞を標的とした新規治療の開発に向け、がん幹細胞の in vitro 培養系の確立は重要な戦略であり、多くの他がん腫においてがん幹細胞性質をもつスフェロイド細胞の培養系が確立している。卵巣がんの多くは初回化療が奏功するものの、その後再発を呈する臨床的な振る舞いは、卵巣がん組織中のがん幹細胞の存在を強く示唆する。またこれまでに卵巣がんにおけるがん幹細胞の報告はあるものの、卵巣がん幹細胞の安定培養ならびにその詳細な解明には至っていない。

申請者らは卵巣がん幹細胞の in vitro 安定培養系を確立し、同がん幹細胞の特性を解明する事を目的として、ヒト卵巣漿液性腺がん患者由来の腹水および腫瘍組織からがん細胞を抽出し、血清非添加浮遊培養系で卵巣がん幹細胞の安定培養を試みた。なお本研究は倫理審査委員会承認の元、患者同意を得て行った。これまでに申請者らは、正常幹細胞や胚性幹細胞の増殖に寄与する Rho キナーゼ (ROCK) 抑制が大腸がん幹細胞スフェロイド細胞の培養に有効である事を報告してきた。本論文において、申請者らは卵巣漿液性腺がん幹細胞スフェロイド細胞の安定培養においても、大腸がんと同様に ROCK インヒビターが重要な役割を果たす事を見出した。ROCK インヒビターの存在下において、卵巣漿液性腺がんスフェロイド細胞はがん幹細胞の特性である、がん幹細胞マーカーの発現や分化能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能を示した。興味深い事に、大腸がんにおいて ROCK インヒビターはがん幹細胞マーカーの CD44 バリエントの発現に寄与するものの、卵巣がんスフェロイド細胞において ROCK インヒビターは異なるがん幹細胞マーカーのアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の発現に寄与し、ALDH 高発現は卵巣がんスフェロイド形成能と相関していた。一方、別の卵巣がん幹細胞マーカーとして知られる CD133 はスフェロイド形成能との相関を示さなかった。卵巣がんスフェロイド細胞のマイクロアレイ解析により、ALDH ファミリーの 19 アイソフォームのうち ALDH 活性の主たるアイソフォームである ALDH1A1 など複数の ALDH アイソフォームの発現上昇を認

めた。卵巣がんスフェロイド細胞における ALDH1A1 の発現は ALDH 活性, ならびにスフェロイド細胞の由来である臨床検体腫瘍組織の ALDH1A1 発現と相関していた。また卵巣漿液性腺がん臨床検体における ALDH1A1 の高発現は臨床進行期や予後と相関していた。さらに ALDH 阻害剤ならびに shRNA 法を用いた卵巣がんスフェロイド細胞における ALDH の抑制はスフェロイド細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導するとともに、幹細胞マーカーのひとつである SOX2 の発現を抑制した。他方、他の幹細胞マーカーである Oct-3/4 および Nanog の発現変化は認めなかった。また shRNA 法を用いた幹細胞マーカー SOX2 の発現抑制も、ALDH 抑制と同様に卵巣がんスフェロイド細胞の増殖の抑制ならびにアポトーシスの誘導を呈した。さらに興味深い事に、SOX2 の過剰発現は Oct-3/4 および Nanog の発現を変化させないものの、ALDH の発現を抑制し、卵巣がんスフェロイド細胞の増殖を抑制した。また SOX2 は ALDH1A1 発現を転写レベルで制御していた。以上の結果より、申請者らが ROCK インヒビターの存在下において確立した卵巣漿液性腺がん由来のがん幹細胞スフェロイド細胞の安定培養系において、幹細胞マーカーの ALDH と SOX2 はともに卵巣がん幹細胞の生存・増殖に寄与するものの、同因子間にはフィードバック機構が存在し、この相互的な制御関係が卵巣がん幹細胞の生存および増殖に重要である事が示された。今後、他の ALDH アイソフォームの卵巣がん幹細胞における役割について解明を目指す。

#### 審査結果の要旨

卵巣がんは、未だに高い致死率を示している。申請者らは、ヒト卵巣漿液性腺がんより、がん幹細胞の分離を試みた。

ヒト卵巣漿液性腺がん患者由来の腹水および腫瘍組織からがん細胞を抽出し、血清非添加浮遊培養を行ない、スフェロイド細胞を分離した。スフェロイド細胞の分離効率 Rho キナーゼ (ROCK) インヒビターにより向上した。この卵巣漿液性腺がん由来スフェロイド細胞は、がん幹細胞マーカーを発現し、分化能を持ち、免疫不全マウスにおいて腫瘍を形成した。ROCK インヒビターは、がん幹細胞マーカーであるアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の発現を向上させ、ALDH 高発現はスフェロイド形成能と相関した。ALDH ファミリーの 19 アイソフォームのうち、卵巣漿液性腺がん臨床検体における ALDH1A1 の高発現は臨床進行期および予後と相関した。ALDH 阻害剤ならびに shRNA 法を用いた ALDH の抑制はスフェロイド細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導し、幹細胞マーカーである SOX2 の発現を抑制した。shRNA 法を用いた SOX2 の発現抑制も卵巣がんスフェロイド細胞の増殖を抑制し、かつアポトーシスを誘導した。

ヒト卵巣漿液性腺がんより、がん幹細胞を分離し、その異常増殖における役割および ALDH1A1 の高発現が卵巣漿液性腺がんの予後と相関することを明らかにした点に、本論文の学位論文としての価値を認めた。