

氏名	閻 婷		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	工 学		
学位授与番号	博甲第5049号		
学位授与の日付	平成26年 9月30日		
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	Study on the role of niche for cancer stem cells (がん幹細胞に対するニッチの機能に関する研究)		
論文審査委員	教授 妹尾 昌治	教授 大槻 高史	准教授 佐藤あやの

学位論文内容の要旨

A number of studies have demonstrated that an aberrant microenvironment with locally derived growth-promoting signals rather than growth-inhibiting signals may contribute to the genesis of cancer stem cells (CSCs). CSCs are defined as cells within a tumor that possess the capacity to self-renew and to give rise to the heterogeneous lineages of cancer cells that comprise the tumor. Despite many studies, the biological nature of CSC-niche remains largely unclear, especially in the context of the origin of CSCs.

Recently, we have reported the successful conversion of mouse induced pluripotent stem cells (miPSCs) into CSCs (miPS-LLCcm) following exposure to the conditioned medium (CM) of the mouse Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells serving as a cancerous niche. The endothelial differentiation ability of this cancer stem cell line was confirmed by in vitro tube formation assay. And we found the tube formation ability was decreased along with the repetitive elimination of differentiated cells, indicating the endothelial differentiation ability of CSCs decreased without differentiated cells. We concluded the differentiated cells could secrete factor(s) to form a niche for the regulation of CSCs behaviors.

The CM of LLC can convert miPSCs to active CSCs, suggesting the LLC CM could serve as cancerous niche to induce normal stem cells to malignant counterpart. We isolated the extracellular vesicles (EVs), which include exosomes and microvesicles, from the CM of LLC cell line, and then the differentiating miPSCs were exposed to TEVs for 4 weeks. The resultant TEV treated cells (miPS-LLCev) expressed Nanog, Oct3/4 and CD133 proteins comparable to miPSCs. The frequency of sphere formation of the miPS-LLCev cells in suspension culture indicated that the self-renewal capacity of the miPS-LLCev cells was significant. When the miPS-LLCev cells were subcutaneously transplanted into Balb/c nude mice, malignant liposarcomas with extensive angiogenesis developed. miPS-LLCevPT and miPS-LLCevDT, the cells established from primary site and disseminated liposarcomas, respectively, showed their capacities to self-renew and differentiate into adipocytes and endothelial cells. Moreover, we confirmed the secondary liposarcoma development when these cells were transplanted. Taken together, these results indicate that miPS-LLCev cells possess CSC properties. Thus, our current study provides the first evidence that tEVs have the potential to induce CSC properties in normal tissue stem cells/progenitors.

The role of stem cell niche in regulation of stem cell behaviors has been shown in several studies. Collect all the data above, we showed the cancer stem cells could differentiate to endothelial cell, and the differentiated cells could contribute to a niche, in turn regulate the differentiation ability of the CSCs. For normal stem cells, the aberrant niche could transform normal stem cells to cancer-initiating cells. In this cancerous niche, exosomes/microvesicles could be a significant factor, which transfer active molecules to recipient normal cells, lead to the malignant transformation of normal stem cells.

論文審査結果の要旨

正常組織も含め細胞の階層の頂点に位置する幹細胞は、周囲の環境（ニッチ）によりその運命（分化あるいは自己複製）が定められ、組織を維持している。がん幹細胞の存在が証明されて以来、腫瘍を細胞の階層性を持った一つの「組織」として捉え、腫瘍の発生、維持、成長機構が再考されている。その組織内において、分泌小胞（エクソソーム）による細胞間情報伝達機構が注目されている。エクソソームはRNA、タンパク質等、分泌細胞の情報を周囲の細胞へと運搬し、その性質を制御するが、がん細胞に由来するエクソソーム（がんエクソソーム）が正常幹細胞や、分化途上にある細胞へ与える影響については、明らかにされていなかった。本論文では、がんエクソソームを用いてマウス人工多能性幹細胞（miPS細胞）よりがん幹細胞を誘導しその細胞の解析を行っている。

ルイス肺がん細胞（LLC細胞）より調整したエクソソームは、自発的に分化を開始したiPS細胞に対し、未分化性を再獲得させた。このようにして得られた細胞（miPS-LLCev）は、免疫不全マウスにおいて脂肪肉腫様の悪性腫瘍を形成し、*in vitro*での種々の解析より、自己複製能、多分化能を有する事を確認し、本細胞を「脂肪肉腫幹細胞」として位置づけている。人工的に脂肪肉腫幹細胞を樹立した前例は無く、世界初の成果であり、miPS-LLCev細胞は本疾患を詳細に解析する上で極めて有効なモデル細胞である。また、このことは、組織における幹細胞等の未分化細胞が、ニッチの成分としての疾患エクソソームによりがん幹細胞化する可能性を示すものであり、がんの発生機構のひとつとして傍証を与えるものである。

本論文では加えて、がん幹細胞の血管内皮細胞への分化が可塑的であり、がん幹細胞自身が形成するニッチは環境により変化しうるものであることを示している。さらに、がん幹細胞miPS-LLCcm細胞にDsRed遺伝子を導入し、その分化をモニタリングする細胞の作製にも成功している。

本論文で作製された細胞やがんに対する洞察は、がん研究、がん幹細胞研究に推進力を与えるものであることを認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。