

氏 名	杜 娟
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 6 1 9 7 号
学位授与の日付	2 0 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	自然科学研究科 生命医用工学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	Analysis of the effects by signaling inhibitors in the conversion of iPS cells into cancer stem cells (非変異原性物質の影響下においてマウス iPS 細胞が示すがん幹細胞化の解析)
論文審査委員	教授 妹尾 昌治 教授 徳光 浩 教授 大槻 高史
学位論文内容の要旨	
<p>This study described the analysis of the effects by signaling inhibitors in the conversion of iPS cells into cancer stem cells. This thesis is divided into three chapters: chapter 1, chapter 2 and chapter 3. Chapter 1, 2 and 3 is further subdivided into five sections: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion and Conclusion.</p> <p>In chapter 1 , as a general introduction, the presentation about the concept of cancer stem cells, the function of cancer stem cells, the niche of cancer stem cells, the metastasis and the clinical of cancers are described.</p> <p>In chapter 2, the model of CSC was evaluated from iPSCs with the effect of cancer cells derived conditioned medium. Making use of the procedure of developing CSCs, we tried to assess the effect of various non-mutagenic chemical compounds that are inhibiting various signaling pathways on the conversion of iPSCs to CSCs. As the result, we found that some inhibitors such as GSK-3β and MEK were enhancing the development of CSCs. The exposure of these inhibitors in the presence of conditioned medium exhibited some significant changes in phenotypes that are the maintenance of stemness, sphere forming ability and the malignant tumorigenesis in vivo. The gene expression profiling by microarray analysis implied that the inhibitors affected the pathways related with cancer development and poor prognosis. We report in this study that the inhibitors have tuning effect on the development of CSCs under the condition provided by the conditioned medium from cancer derived cells.</p> <p>In chapter 3, we treated miPSCs with each compound for 1 week in the presence of the CM of Lewis lung carcinoma cells, while 1-week was too short for the CM to convert miPSCs into CSCs. As the result, PDO325901, CHIR99021 and Dasatinib were found to confer miPSCs with CSC phenotype in 1 week. The survived cells exhibited stemness markers, spheroid formation and tumorigenesis in Balb/c nude mice. Collectively, we concluded that the three signal inhibitors accelerated the conversion of miPSCs into CSCs. Simultaneously, pik3ca, pik3cb, pik3r5 and pik3r1 genes were found extensively enhanced assessed and the expression of upregulated indicating class IA PI3K as the responsible signaling pathway. Consistently, AKT phosphorylation was found upregulated in the obtained CSCs. Inhibition of Erk1/2, tyrosine kinase and/or GSK-3β were implied to be involved in the enhancement of PI3K-AKT signaling pathway in undifferentiated cells resulting in the sustained stemness, which resulted in the conversion of miPSCs into CSCs in the tumor microenvironment.</p>	

論文審査結果の要旨

変異原性物質により誘導される細胞のがん化については一般的な評価系が存在するが、非変異原性物質による発がん性については、顕著な毒性が見出されない限り有効な評価系が存在せずその安全性に対して疑問が残るものが多い。本論文では、ルイス肺がん細胞の培養上清存在下でマウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を 1 ヶ月かけてがん幹細胞化させる系を利用し、がん幹細胞化を促進する物質を約 1 週間に短縮して評価できる系を構築し、非変異原性化合物の影響評価を評価行なってその実効性を解析している。まず、非変異原性物質として多様な細胞内シグナル伝達経路阻害剤約 100 種類を選択しこれらに対して、がん幹細胞化を評価した。その結果、がん幹細胞化を促進した物質の内訳は、MEK (Erk1/2) 阻害剤 PDO325901, GSK-3 β 阻害剤 CHIR99021, チロシンキナーゼ阻害剤 Dasatinib の 3 種類のみであった。1 週間後に阻害剤の暴露を止めても細胞は増殖し続け、*in vitro* で幹細胞マーカーの発現を維持しつつ、スフィア形成能を示すと同時に *in vivo* で悪性の腫瘍形成し、がん幹細胞としての条件を満たしていた。すでにマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析から、ルイス肺がん細胞の培養上清は発がんや予後不良に関与すると考えられている PI3 キナーゼが関与する細胞内シグナル経路に影響していると考えられていたため、阻害剤に暴露した細胞では PI3 キナーゼから AKT へシグナル伝達系が増強されていることを確認でき、PI3 キナーゼのユニットを精査して *pik3ca*, *pik3cb*, *pik3r5*, *pik3r1* の発現が亢進してクラス IA 型 PI3 キナーゼが活性化していることを明らかにした。これらの結果から、非変異原性である 3 種類の細胞内シグナル伝達経路阻害剤は未分化性の細胞において PI3K-AKT シグナル伝達経路を増強してがん幹細胞を誘導する危険性があることを示唆することができた。以上より、本論文で構築された iPS 細胞を利用するがん幹細胞誘導評価系は、非変異原性化合物の安全性評価を短時間で可能であることを示し、その可能性を十分に高めたと認められる。また、細胞内シグナル伝達経路の特定によって、がん幹細胞生成のメカニズムの一端を解明できる可能性も期待できると認め、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。