

学位論文審査結果の要旨

氏名	西川真弘
審査委員	主査 東山 繁樹 副査 竹中 克斗 副査 川上 良介 副査 池田 俊太郎 副査 吉田 理

論文名 膠芽腫辺縁部の腫瘍幹細胞に高発現する分子 CD44 の同定とその機能解析

審査結果の要旨

【目的】膠芽腫は、生存期間中央値は約 15 ヶ月と極めて予後不良な原発性脳腫瘍である。近年、腫瘍幹細胞が腫瘍再発の主な原因であることが示されてきた。腫瘍幹細胞は「ニッチ」と呼ばれる特殊な微小環境に存在し、周囲組織との相互作用により腫瘍発生・浸潤・増殖などに関与するとされており、これまでに幹細胞マーカーの同定および機能解析に関して様々な研究が行われている。しかし、膠芽腫では、その大部分が腫瘍中心部組織を用いて解析したものであり、膠芽腫の再発様式のほとんどが摘出腔辺縁部からの局所再発であることを鑑みると、着目すべきは、むしろ腫瘍辺縁部であり、同部位に残存した腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法を開発する必要がある。本研究では、膠芽腫の腫瘍辺縁部に存在する腫瘍幹細胞の存在を明らかにし、その機能解析を行った。

【対象と方法】2014年1月から2016年12月までに愛媛大学脳神経外科で治療された初発膠芽腫患者36名のうち、同一プロトコルで治療を行い、かつ腫瘍中心部および辺縁部の両部位から腫瘍組織を採取できた13名を対象とした。術前の頭部MRI画像およびPET-CT画像を融合したニューロナビゲーション画像を用いて各部位より腫瘍組織を採取し、8種の幹細胞マーカー（Nestin、CD133、CD15、CD44、Bmi-1、Sox2、Oct3/4、CXCR4）及び4種の関連分子（HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、TGF- β ）の遺伝子発現をqRT-PCRにて、また、タンパク質発現を免疫組織染色に

て検討した。さらに、同定した分子に関しては、画像や予後との関連性についても検討した。さらに腫瘍辺縁部の組織の初代培養より樹立したグリオーマ幹細胞様細胞を用いて、in vitro 及び in vivo での遊走能、浸潤能、増殖能などを調べた。

【結果】腫瘍中心部と比較して腫瘍辺縁部でより多く発現する幹細胞マーカーを探索するために Periphery/Core(P/C)ratio を解析した結果、高い P/C ratio と発現量を示した CD44 に着目し、解析を進めた。免疫組織化学的検討では、CD44 の P/C ratio 高値の症例は腫瘍辺縁部に CD44 陽性腫瘍幹細胞が多く存在していた。全 13 症例の解析では、CD44 の P/C ratio が高値の症例は、画像上、腫瘍辺縁部において浸潤型を示し、早期に再発を来し予後不良であった。一方、P/C ratio が低値の症例は、腫瘍辺縁部が境界鮮明型で、VEGF の発現量が多く、高い増殖能を示したが長期生存していた。また、樹立したグリオーマ幹細胞様細胞は CD44 の発現が高く、同細胞は高い遊走能・浸潤能を有しており、siRNA にて CD44 の knockdown により、それらの活性は抑制された。

【考察】膠芽腫の腫瘍摘出腔辺縁部には、CD44 を高発現する腫瘍幹細胞が中心部より多く存在する症例があり、同細胞群が高い浸潤性や早期再発に関与していると考えられた。また、浸潤型の症例は HIF-1 α の発現が亢進し、境界鮮明型の症例では HIF-2 α の発現が亢進しており、高浸潤型の腫瘍幹細胞を取り巻く微小環境では、低浸潤型と比べ、低酸素の程度がより強く、HIF-1 α の活性化により CD44 発現が増強する環境にあることが示唆された。今後、低酸素環境下における CD44 の挙動を明らかにし、腫瘍辺縁部に残存した CD44 発現腫瘍幹細胞の浸潤と増殖における制御機構を解明することで、新たな治療戦略の確立に繋がる可能性が示唆された。

公開審査会は、令和 1 年 7 月 22 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の質問がなされ、的確に回答した。

- 1 1 個の腫瘍辺縁部からのサンプリングの個数はいくつ？ また、同一腫瘍由来の各辺縁部サンプルでの幹細胞マーカー発現のばらつきはどれ程か？
- 1 腫瘍幹細胞マーカーの発現評価は mRNA の解析のみでいいのか？タンパク質レベルでの詳細な評価が必要ではないか？ SOX2 遺伝子の発現も腫瘍辺縁部で高いようだが、なぜ幹細胞マーカーとしての有用性を評価しなかったのか？
- 1 実験に使用した CD44 の抗体は、どのバリエーションを検出するのか？
- 1 CD44 を介するシグナル伝達経路は複数あるが、どの経路が腫瘍幹細胞特性の維持に重要なのか？
- 1 低酸素環境下が CD44 の発現を誘導することから、高圧酸素処理は治療選択の一つになりうるのではないか。また、その効果を検討したことはあるか？
- 1 CD44 分子を治療標的とすることは可能か？ またその有効性は見込めるか？
- 1 CD44 分子のイメージングは、新たな診断方法として有用ではないか？

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。