

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	下川 真理子
主 論 文 題 名				
Visualization and targeting of LGR5 <sup>+</sup> human colon cancer stem cells (LGR5陽性ヒト大腸がん幹細胞の可視化とその標的治療)				
(内容の要旨)				
<p>がん幹細胞は自己複製能と分化能を併せ持つがん細胞であり、がんの再発や転移に関わると考えられている。がん幹細胞の同定・機能解析は、フローサイトメトリーによって単離した特定のがん細胞集団を免疫不全マウスへ移植し、腫瘍形成能を検証してきた。しかし大腸がんなどの固形がんの場合、組織単離の過程で多くの腫瘍細胞が死滅するため、がん幹細胞機能を正確に評価することができなかった。最近、組織構造を保持したまま特定の細胞を遺伝学的に標識し、その子孫細胞を追跡する細胞系譜解析がマウスを用いた上皮系の幹細胞機能解析として開発されたが、そのヒト細胞への応用はなされていなかった。本研究ではclustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)- CRISPR associated protein 9 (Cas9) (CRISPR-Cas9) システムを用いたゲノム編集技術による遺伝子相同組換えを用い、大腸がん患者由来がんオルガノイドのLGR5<sup>+</sup>がん幹細胞の可視化および細胞系譜解析に成功し、さらにLGR5<sup>+</sup>がん幹細胞の選択的な除去によるがん幹細胞標的治療の効果検証を行った。</p> <p>LGR5<sup>+</sup>およびKRT20<sup>+</sup>分化細胞を可視化するため、ゲノム編集技術を用いて大腸がんオルガノイドのLGR5遺伝子座および分化マーカーであるKRT20遺伝子座へGFPレポーターのノックインを行った。遺伝子発現マイクロアレイ解析、および異種移植を実施し、LGR5およびKRT20-GFPノックインオルガノイドのレポーターが細胞内遺伝子発現を反映すること、生体内において元のがんの幹細胞ヒエラルキーを保持した組織再構築することを確認した。</p> <p>さらに、LGR5<sup>+</sup>がん細胞ががん幹細胞であるかを調べるため、LGR5遺伝子座およびKRT20遺伝子座へCreER遺伝子のノックインおよび異種移植を行い、腫瘍構築後、Cre依存性レインボーレポーターシステムにより腫瘍内における細胞系譜解析を実施した。LGR5-CreERレポーターオルガノイドでは、標識されたLGR5<sup>+</sup>細胞の子孫細胞が時間の経過とともに増殖しLGR5<sup>+</sup>およびKRT20<sup>+</sup>細胞の両方を構築したことから、LGR5<sup>+</sup>がん細胞が自己複製能と分化能を有し、がん幹細胞として機能することを確認した。一方、KRT20-CreERレポーターオルガノイドでは分化細胞に特徴的な性質を示し、標識されたKRT20<sup>+</sup>細胞の子孫細胞は細胞集団を形成することはほとんどなく、時間の経過とともに消失した。</p> <p>がん幹細胞を標的にした治療効果を検証するため、LGR5遺伝子座位にDimerizerで活性化する自殺遺伝子inducible Caspase9 (iCaspase9) をノックインしたオルガノイドを作製し、異種移植を行った。腫瘍構築後Dimerizerを投与しLGR5<sup>+</sup>がん幹細胞を選択的に殺傷すると、一時的な腫瘍縮小とその後の再増殖を認めLGR5<sup>+</sup>がん幹細胞の標的治療効果は限定的であることが示された。同時に行った分化細胞の細胞系譜解析では、LGR5<sup>+</sup>がん幹細胞の殺傷後にKRT20<sup>+</sup>分化がん細胞がLGR5<sup>+</sup>細胞へ脱分化したことから、KRT20<sup>+</sup>分化がん細胞の脱分化が腫瘍再増殖へ寄与したことを示した。分化がん細胞を殺傷する既存治療薬を同時に投与したところ顕著な腫瘍縮小が観察されたことから、既存治療との併用治療効果が高いことを示した。</p> <p>これらのデータは、生体内においてヒト大腸がん幹細胞機能と可塑性を実証した初めての解析である。その治療への影響も明らかにした結果は、今後のがん幹細胞標的治療に大きな洞察を与えるものである。</p>				