

氏名	ALAM Md Jahangir		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博乙第	4499	号
学位授与の日付	平成31年 3月25日		
学位授与の要件	博士の論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)		
学位論文の題目	Effects of Exogenous Cripto-1 on Cancer Stem Cells Converted from Mouse iPSCs (マウス iPS 細胞から作成したがん幹細胞に対する Cripto-1 添加の影響に関する研究)		
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>Chapter I: General Introduction</p> <p>In the chapter of general introduction, a brief introductory discussion on cripto-1, its structure and signaling pathways were described. Role of Cripto-1 in embryonic development and Cancers were followed by a description on cancer stem cells, differentiation and EMT.</p> <p>Chapter 2: Production and Purification of Soluble Form of Human Recombinant Cripto-1</p> <p>This states the <i>in vitro</i> site directed mutagenesis of Cripto-1 to remove the GPI site which followed by DNA sequencing and further transformation of resultant Cripto-1 into competent <i>E. coli</i>, in order to produce and purify recombinant human Cripto-1 (rhsfCR-1) in a soluble form after proper refolding and dialysis.</p> <p>Chapter 3: Exogenous Cripto-1 Suppresses Self-renewal of Cancer Stem Cell Model <i>In Vitro</i></p> <p>It describes the effects of rhsfCR-1 on miPS-LLCcm cells. First of all, cell proliferation assays were conducted by MTT assay and cell counting. Further analysis on apoptosis and cell cycle were also evaluated. Simultaneously, we did the spheres formation ability of miPS-LLCcm cells in the presence or absence of rhsfCR-1. Western blot was performed to observe the Smad2, Akt and Erk1/2 phosphorylation. After that, <i>in vitro</i> tube formation assay was allowed to investigate the differentiation of miPS-LLCcm cells into vascular endothelial cells. Moreover, along with other signaling molecules related to Cripto-1, expression of stemness markers were assayed by rt-qPCR, which followed by migration and invasion assay.</p>			

論文審査結果の要旨

本研究では、組換え型可溶性ヒトクリプト-1 (sfrhCR-1) ががん幹細胞の増殖と自己複製を抑制することを見出している。本来、クリプト-1は GPI アンカーで細胞膜に繫留されており、Nodal の共受容体として働き、Nodal の生理活性が ALK4/7 とアクチビン II 型受容体の複合受容体を介して Smad シグナル伝達系へと伝えて幹細胞の自己複製を維持するために必須であると考えられている。したがって、個体の発生やがんの生成と成長に重要な役割を担っている。

この系に対し、GPI アンカーが修飾される 161 番目のセリン残基以降のカルボキシ末端を欠失させた sfrhCR-1 を大腸菌で遺伝子組換えタンパク質として調製し、がん幹細胞モデルとしてすでに樹立している miPS-LLCcm 細胞の培地へ添加することで、その影響を解析した。miPS-LLCcm 細胞をディッシュに接着させて培養した場合には、sfrhCR-1 はその増殖を阻害し、IC₅₀ は約 2 µg/mL であった。

次に、がん幹細胞の特徴であるスフィア形成能 (自己複製能) における影響を非接着培養系で調べると 0 から 5µg/mL の範囲で、スフィア形成が濃度依存的に阻害された。この時の、IC₅₀ は約 0.7 µg/mL であった。さらに、sfrhCR-1 は細胞内における細胞内シグナル伝達因子 smad2 のリン酸化を阻害する傾向を示すとともに、miPS-LLCcm 細胞の血管内皮細胞への分化を抑制していることも管腔形成能の低下や CD31 の発現低下により示された。創傷治癒評価や浸潤能評価でも抑制の傾向が観察されている。

一方で、クリプト-1 は Glypican-1 にも結合して c-Src/MAPK/AKT のシグナル伝達経路を活性化することや Wnt/Frizzled/beta-catenin 経路も活性化することが知られている。miPS-LLCcm 細胞では Glypican-1 の発現が減少していることで、細胞増殖への影響は無視でき、Wnt の発現上昇は cMyc の発現に繋がりこれが Twist1 の発現を抑制していると考えれば、細胞の運動性低下や上皮間葉転位の低下も説明できると考えられた。

以上から、sfrhCR-1 は、本来のクリプト-1 が促進するがん幹細胞の増殖と自己複製を抑制し、がん幹細胞の生存を困難にしていることが示された。この成果は、がん幹細胞標的とするがん治療への指針を与える上で大きな意義を持つと判断される。これにより新規で有効ながん治療法の開発を加速化することが期待できる成果と認め、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。