



TITLE:

Visualization of stem cell activity in  
pancreatic cancer expansion by direct  
lineage tracing with live imaging(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Maruno, Takahisa

---

CITATION:

Maruno, Takahisa. Visualization of stem cell activity in pancreatic cancer expansion by direct lineage tracing with live imaging. 京都大学, 2021, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2021-07-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13427>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	丸野 貴久
論文題目	Visualization of stem cell activity in pancreatic cancer expansion by direct lineage tracing with live imaging (細胞系譜解析とライブイメージングによる膵癌幹細胞動態の可視化)		
(論文内容の要旨)			
<p>膵癌は予後不良であり、新規治療法が期待される。癌幹細胞は自己複製能と子孫供給能を持つ癌細胞とされ、膵癌においてもその存在を示す報告があるが、これらは免疫不全マウスを用いた移植モデルなど人工的な系での解析に基づくものであった。</p> <p>近年、膵癌や膵前癌病変である PanIN (Pancreatic intraductal neoplasia) の幹細胞マーカーとして Dclk1 (Doublecortin like Kinase 1) が報告され、Dclk1 陽性細胞が特定の条件下で膵癌や PanIN を形成することが示された。しかしながら、形成された腫瘍内において、どのように PanIN、浸潤性膵癌、転移巣が維持されるのかは依然明らかではなく、生体内における膵癌幹細胞の動態はこれまで不明であった。</p> <p>そこで、生体マウス内での膵癌幹細胞の動態を明らかにするため、従来困難であった形成された腫瘍内での膵癌幹細胞の細胞系譜解析を、Flippase-FRT と Cre-LoxP の二つの遺伝子組換えシステムと生体ライブイメージングを組み合わせで行った。</p> <p>Dclk1<sup>CreERT2-IRES-EGFP/+</sup>; Rosa26<sup>mTg/+</sup>; Pdx1-Flp; Kras<sup>FSF-G12D/+</sup> (DRKF) マウスを用いて PanIN における Dclk1 陽性細胞の細胞系譜解析を行った。12 週齢の DRKF マウスにおいて、タモキシフェン投与前と投与後 4 週での PanIN 中の EGFP 陽性細胞数を解析した結果、タモキシフェン投与前は 5.43±0.84 % に過ぎなかった EGFP 陽性 PanIN 細胞数が投与後 4 週間で 35.4±2.03 % に増加していた。さらに、Dclk1<sup>CreERT2-IRES-EGFP/+</sup>; Rosa26<sup>mTg/+</sup>; Pdx1-Flp; Kras<sup>FSF-G12D/+</sup>; Trp53<sup>frt/frt</sup> (DRKPF) マウスを用いて、膵癌における Dclk1 陽性細胞の細胞系譜解析を行った。8 週齢の DRKPF マウスにおいて、タモキシフェン投与前と投与後 2 週での膵癌中の EGFP 陽性領域を解析した結果、タモキシフェン投与前は 0.040±0.005 % に過ぎなかった EGFP 陽性膵癌領域が、投与後 2 週間で 54.6±5.12 % に増加していた。これらの結果から、マウス膵癌において Dclk1 陽性細胞が子孫腫瘍細胞を供給する膵腫瘍幹細胞であることが初めて生体内で示された。</p> <p>次に、免疫不全マウスの脾臓に DRKPF マウスの膵癌細胞を注入し、8 週間後にタモキシフェンを投与することで肝転移巣における Dclk1 陽性細胞の細胞系譜解析を行った。タモキシフェン投与前は 0.014±0.002 % に過ぎなかった EGFP 陽性肝転移領域が、投与後 2 週間で 32.1±6.93 % に増加していた。したがって、Dclk1 陽性膵癌細胞は肝転移巣においても子孫膵癌細胞を供給することが示された。</p> <p>さらに、生体内マウスにおける膵癌幹細胞の動態をより厳密に解析するために、ライブイメージングと細胞系譜解析を組み合わせることで、同一個体の同一病変での経時的観察を行った。その結果、同一個体の同一病変においても、Dclk1 陽性細胞の系譜解析により EGFP 陽性細胞が増加しており、Dclk1 陽性の PanIN 細胞・膵癌細胞が子孫を供給する腫瘍幹細胞として働くことが経時的に観察された。</p> <p>以上より、膵癌幹細胞の動態をマウス生体内で初めて可視化し、膵前癌病変から浸潤性膵癌・肝転移に至るまで、Dclk1 陽性の腫瘍細胞が子孫腫瘍細胞を供給する膵腫瘍幹細胞であることが示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、膵癌幹細胞とされる Dclk1 (Doublecortin-like Kinase 1) 陽性細胞の動態を明らかにするために、二つの遺伝子組換えシステムの組み合わせによるマウス発癌モデル作成・細胞系譜解析を軸とした解析を行なった。

Flippase-FRT システムでヒト膵癌と同じ発癌シグナルを発現させるマウス前癌病変 PanIN・膵癌および膵癌肝転移モデルを作成し、Dclk1 陽性細胞の細胞系譜をタモキシフェン誘導性 Cre-LoxP システムで解析した。その結果、いずれのモデルにおいても、極少数存在した Dclk1 陽性細胞から多数の子孫細胞が供給される事が分かった。また、同一個体同一病変のライブイメージング法を樹立し、生体マウス内で Dclk1 陽性細胞から持続的に子孫細胞が供給される過程をリアルタイムで観察した。

さらに、Dclk1 陽性細胞は Dclk1 陰性細胞に比して高い in vitro オルガノイド形成能、免疫不全マウスへの移植腫瘍形成能を示し、マイクロアレイ解析から、ヒト膵癌 Dclk1 高発現細胞と共通した腫瘍幹細胞としての特質を持つことが分かった。

以上の研究は Dclk1 陽性細胞のマウス生体内での動態を初めて可視化し、膵癌幹細胞としての特質を示したものである。ヒト膵癌 Dclk1 高発現細胞との類似性も示しており、膵前癌病変から膵癌、肝転移に至る膵癌病態生理の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和3年5月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。