

## 論文の内容の要旨

前立腺幹細胞のマトリゲル内における腺管再構築の検討

指導教官 北村唯一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 東真樹

### 【緒言】

幹細胞とは自己複製能および多分化能を持つ細胞である。これまでに造血幹細胞・神経幹細胞・生殖幹細胞等の存在が明らかになっておりその研究が進んでいる。男性副生殖器である前立腺にも幹細胞の存在が示唆されており各方面で研究の対象となっている。前立腺癌は近年急増している疾患であり、本邦においてもその対策が急務となっている。前立腺癌の治療の第一選択としては外科的去勢もしくは薬剤 (LHRH analogue) を用いた去勢と抗アンドロゲン剤を用いた **combined androgen blockade (CAB)**が行われるが、ある一定の年月の後に CAB 無効となるアンドロン抵抗性を獲得する。癌ではない正常の前立腺も男性ホルモン依存的に増殖および退縮を繰り返すため幹細胞の存在が推測されている。前立腺の幹細胞研究は再生医学の観点からの有用性は小さいが、近年は幹細胞と癌細胞の関連性も唱えられており、前立腺幹細胞の研究は前立腺癌の治療に対する新しい知見を与えるだろう。上記のように、前立腺癌はアン

ドロゲン抵抗性の **population** を含む。すなわちアンドロゲン遮断下では **dormant** な癌細胞のみ残り、なんらかのきっかけを経て **active** な増殖に入る細胞が存在すると考えられる。この性質は幹細胞の性質そのものであり、前立腺幹細胞の研究を通じて前立腺癌についての新しい事実が明らかになるだろう。

前立腺幹細胞の解析系としては従来的には前立腺上皮細胞とマウス胎児の UGM を混合し免疫抑制マウスの腎皮膜下に移植する (**subrenal grafting method**) という方法が取られる。しかし、**subrenal grafting method** は手技的に困難であり、幹細胞の定量としては **graft** の重量を計測するのみで手技的な困難さゆえの“ばらつき”が出てくる可能性が高い。また、この手法では増殖能の高い細胞の存在が明らかにされるだけで、単一の幹細胞が腺管を再構築するということの証明にはならない。そこで我々は手技的に簡便で再現性の高い前立腺幹細胞の解析系として **Matrigel Transplantation method** を考案し、さらに同一移植片内での再構築能の比較を可能にすることで手技的な **error** を回避することを可能にした。さらに、野生型マウスと  $\beta$ -actin プロモーター下に緑色蛍光色素である EGFP を発するマウス ( $\beta$ -actin EGFP マウス) の前立腺細胞を混合移植し、全ての腺管が野生型マウス由来もしくは  $\beta$ -actin EGFP マウス由来であることを示すことで、前立腺には組織再構築能のある幹細胞が存在することを明らかにした。

## 【結果】

1. 単一の前立腺幹細胞は **Matrigel Transplantation** で前立腺腺管を再構築する

6 週齢のマウスの前立腺を実体顕微鏡下で取り出し、コラゲナーゼによる化学的処理および注射針を用いた機械的処理にて前立腺細胞を可及的に粉碎した

後に 44 $\mu$ m のフィルターを用いて single cell のみ選択した。足場と成長因子としての Matrigel と 4 $^{\circ}$ C で混和した後にヌードマウスに皮下注射を行った。移植後 5 日目では細胞集塊が確認されるのみであったが移植後 14 日目には腺管構造が確認された。28 日目には腺管内部に PAS 陽性の粘液が確認され、再構築された腺管構造は粘液を産生していることが確認された。移植片の免疫染色では E-Cadherin と  $\beta$ -catenin は細胞の basolateral に局在した。Tight junction のマーカーである ZO-1 は尖部の tight junction に局在した。Cytokeratin5 は扁平な basal cell に、Cytokeratin8/18 は円柱状の luminal cell に局在した。前立腺のマーカーである androgen receptor は basal cell および luminal cell に局在した。これらのマーカーの発現は前立腺のマーカーの発現と一致し、Matrigel transplantation により前立腺の単一の細胞から完全な腺管が再構築されることが確認できた。また、再構築された腺管の周囲を SMA 陽性の stroma 細胞が取り囲んでおり上皮との相互作用の存在が推察された。

## 2.再構築された腺管は単一の幹細胞由来である

$\beta$ -actin EGFP マウスの前立腺細胞と野生型マウス由来の前立腺細胞を混合し移植を行うと全ての腺管が野生型マウス由来もしくは $\beta$ -actin EGFP マウス由来の腺管であり mosaic の腺管は観察されなかった。EGFP 陽性の腺管の割合は移植時の EGFP 陽性の細胞の割合とほぼ一致した。以上より Matrigel Transplantation においては、単一の前立腺幹細胞が増殖および分化により完全な腺管を再構築すると考えられた。

## 3.Matrigel Transplantation は幹細胞の定量に使用できる

幹細胞の解析系としては幹細胞の定量が不可欠であり Matrigel

Transplantation method が幹細胞の定量に応用可能であることを確認するために、Matrigel Transplantation method を用いて近位前立腺細胞と遠位前立腺細胞の再構築能の比較を行った。近位前立腺には遠位前立腺と比べて幹細胞がより多く存在するという報告があり、野生型マウス由来および $\beta$ -actin EGFP マウス由来の細胞の混合移植を用いてそのことを確認した。 $\beta$ -actin EGFP マウスの近位前立腺もしくは遠位前立腺細胞  $4 \times 10^5$  個と野生型マウスの前立腺細胞  $1 \times 10^6$  個を混和 (EGFP の比率は 29%) し Matrigel Transplantation を行った。近位前立腺での EGFP 陽性の腺管の chimerism は  $44.4 \pm 7.9\%$ 、遠位前立腺での EGFP 陽性の腺管の chimerism は  $21.7 \pm 10.6\%$  であり、近位前立腺には前立腺幹細胞が多く存在していることが確認された ( $p < 0.01$ )。この結果から Matrigel transplantation における混合移植は前立腺の幹細胞の定量に使えることが確認された。

#### 4. Mx1-Cre トランスジェニックマウスを用いた前立腺の遺伝子改変

Mx1-Cre トランスジェニックマウスはインターフェロンに応答して Cre が発現するマウスであり、造血幹細胞および肝細胞で Cre が高発現することが知られている。他臓器でも発現は見られるが、前立腺と Mx1-Cre に関する報告はない。Mx1-Cre および CAG-loxP-CAT-loxP-EGFP のアレルを持つマウスの前立腺上皮細胞が合成 2 重鎖 RNA の Polyinosinic-poly-cytidylic acid (pI-pC) による Cre の誘導によって EGFP 陽性となるため、Mx1-Cre トランスジェニックマウスは pI-pC による誘導で前立腺上皮に Cre が発現することがわかった。今後は癌抑制遺伝子 PTEN 組織特異的ノックアウトマウスおよび retinoblastoma 組織特異的ノックアウトマウスと Mx1-Cre トランスジェニッ

クマウスを交配し、pI-pC による Cre の誘導を行った後に Matrigel transplantation を行うことで PTEN もしくは retinoblastoma 遺伝子を欠損する細胞が正常な腺管を再構築するか否か、正常な腺管が再構築されないとするならばなぜされないかを解析したいと考えている。

#### 【まとめ】

前立腺幹細胞の解析系としての Matrigel transplantation method を考案し前立腺が単一の幹細胞から腺管を再構築することを証明した。この手法は幹細胞の定量にも応用可能である。また Mx1-Cre を用いた遺伝子改変を組み合わせることで前立腺幹細胞の遺伝子改変を行うことができる。この手法は前立腺幹細胞研究、ひいては前立腺癌研究に有用であると考えられる。