

審査の結果の要旨

氏名 東真樹

本研究はマトリゲルを用いた前立腺の再構築系を確立することにより前立腺に組織恒常性を維持する幹/前駆細胞が存在することを示し、さらに遺伝子改変を行った幹/前駆細胞の腺管再構築を通じて各種癌抑制遺伝子が前立腺の癌化における機能解析を試みたものであり下記の結果を得ている。

1. 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砕した後に 44 μ 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 β -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。これらの結果から単一の前立腺細胞は Matrigel Transplantation で前立腺腺管を再構築することが明らかになった。
2. β -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 β -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/前駆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. 幹/前駆細胞の解析系としては幹/前駆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 β -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。 β -actin EGFP マウスの近位前立腺もしくは遠位前立腺細胞 4×10^5 個と野生型マウスの前立腺細胞 1×10^6 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/前駆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/前駆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 が発現することが明らかになった。

以上、本論文はマウス前立腺幹/前駆細胞の再構築系としての Matrigel transplantation を確立し前立腺には組織再構築能のある幹/前駆細胞が存在することを明らかにした。本研究は単一の前立腺細胞が腺管再構築を行う能力があるということを世界に先駆けて明らかにし、前立腺幹細胞研究および癌幹細胞研究に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。