氏名（本籍）	梅田　正
学位の種類	博　士（理学）
学位記番号	博　甲　第　　10025　　号
学位授与年月日	令和　3　年　3　月　25　日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査学術院	理工情報生命学術院
学位論文題目	Studies on the Chromosomal Heterogeneity Derived from Tetraploid Tumor Cells and the Influence of the Heterogeneity on the Drug Efficacy （四倍体がん細胞を由来としたがんの染色体不均一性の獲得および不均一性の薬剤治療への影響に関する研究）

主査	筑波大学准教授	博士（理学）	桑山　秀一
副査	筑波大学教授	博士（農学）	三浦　謙治
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中野　賢太郎
副査	筑波大学准教授	理学博士	坂本　和一

論　文　の　要　旨

染色体異数性はがん細胞の特徴の一つとして知られている。がんは染色体が異数化することにより、がんの進行および不均一性の増幅を獲得すると考えられている。さらに、染色体異数性によって不均一な集団となったがんは、薬剤治療による選択圧により耐性細胞を増加させ、耐性を獲得すると考えられている。第一章において著者は、がん細胞の染色体異数性を獲得する機序を明らかにすることを目的として、染色体および中心体を二倍量もつ四倍体細胞が異数性形成の中間体となる経路の解析をがん細胞および臨床検体を用いて解析した。第二章において著者は、薬剤治療による薬剤耐性獲得の可能性を検証するため、染色体不均一性が高い、胃がんにおける分子標的薬の標的因子として重要であるHER2に着目し、胃がんの臨床検体における薬剤治療前後のHER2の遺伝子増幅およびタンパク質発現の変化を検討した。

第一章において著者は、四倍体がん細胞を中間体とした染色体異数性獲得の機序を解析した。実験材料としては、染色体不安定性が高いと知られているHeLa細胞株および染色体不安定性が低いHCT116 p53$^{-/-}$細胞株を用い、四倍体細胞集団は、細胞周期を同調したのち分裂期細胞をAurora B阻害剤で処理することで調製した。著者はまず、四倍体細胞の細胞分裂の制御機序を探るため細胞分裂に必須のキネシンであるEg5の阻害剤で細胞株を処理したところ、四倍体HeLa細胞の多くは多極性細胞分裂をしたが、Eg5が阻害された四倍体細胞では正常に近い二極性の細胞分裂が起こることを明らかにした。このことから著者は、Eg5が四倍体がん細胞の細胞分裂様式の決定に重要な因子であることを示唆した。次に著者は四倍体がん細胞において、Eg5の活性化レベルと分裂様式に違いがあるかどうかを検討した。Eg5による分裂期の紡錘体制御には、リン酸化を受け紡錘糸へ局在することが重要であることが知られているが、検討の結果、HeLaではリン酸化Eg5の紡錘糸への局在のレベルがHCT116 p53$^{-/-}$と比較して有意に高いことを明らかにした。また、四倍体細胞誘導後の細胞分裂様式はHeLaでは多極性が多いのに対してHCT116 p53$^{-/-}$は二極性が多いことも明らかにした。次に著者は、これらの違いがEg5のリン酸化レベルによるものであることを検証するために、リン酸化Eg5レベルを変化させることによる細胞分裂様式の変化を観察した。その結果、Eg5のリン酸化レベルが低い細胞にEg5を強制発現させた場合には多極性細胞分裂が増加し、逆にEg5のリン酸化レベルが高い細胞にEg5の非リン酸化型変異体を強制発現した場合には、多極性細胞分裂が抑制されることを確認した。さらに、Eg5と協調して細胞分裂を制御することが知られている他の

キネシンをノックダウンもしくは強制発現をすることでも四倍体細胞の分裂様式が変化することを明らかにした。これらの結果は、四倍体細胞の分裂様式はEg5を含む細胞分裂期のキネシンの活性や発現のバランスが重要であることを示唆している。また著者は、これらの細胞において四倍体誘導からの長期培養後の細胞集団の染色体の数を比較したところ、多極性細胞分裂が多いHeLaでは二倍体に近い染色体数をもつ不均一な細胞集団が増加していたのに対して、二極性細胞分裂が多いHCT116 p53$^{-/-}$では四倍体を維持した細胞集団を示した。これらのことから、著者はEg5の活性化レベルに応じて四倍体がん細胞は異なる細胞分裂様式（二極性もしくは多極性）を行うことで、異なる染色体異数性を獲得すると結論付けた。また著者は臨床検体において、四倍体細胞が実際に存在すると報告されている胃がんの検体を用い、Eg5が高発現する腫瘍組織では有意に染色体異数性である腫瘍が多いことも明らかにした。

第二章において著者は、染色体不均一性が高い、胃がんにおける分子標的薬の標的因子として重要であるHER2に着目し、染色体不安定性から生じるがんの不均一性の薬剤治療への影響を検討した。HER2はチロシンキナーゼ受容体であるHERファミリーの構成因子の一つであり、下流のシグナル伝達因子の活性化を通じて腫瘍の生存や増殖に寄与していることが知られている。また、HER2タンパクの発現は一部のがん種で亢進していることが知られており、HER2陽性のがんにおいてHER2は分子標的薬の標的分子として重要であることが示唆されていた。一方、trastuzumabは抗HER2ヒト化モノクローナル抗体薬であり、HER2陽性の乳がんおよび胃がんの標準治療薬として用いられており、HER2陽性の乳がんでは抗HER2薬を含む一次治療を行ったあとの二次治療においても抗HER2薬の継続治療が有効であることが示されている。HER2陽性胃がんでは、一次治療においては乳がんと同様に抗HER2薬を含む一次治療を行うが、二次治療薬として抗HER2薬を用いた治療法の有効性は認められていない。その原因の一つとして、胃がんは乳がんと比較して不均一性が高いことで、抗HER2薬への耐性獲得が促進されるのではないかと予想されていた。そこで著者は、trastuzumabおよび化学療法剤治療前後の胃がん検体を用いてHER2タンパク質発現およびHER2遺伝子増幅を検討した。その結果著者は、これらの検体において薬剤投与前のHER2発現は不均一性を示し、HER2の高発現は遺伝子増幅によるものであることを明らかにした。薬剤治療前後で比較した結果、trastuzumab投与後では3例中2例、化学療法剤投与後では3例中3例においてHER2発現および遺伝子増幅も低下もしくは消失することを確認した。これらの結果から著者は、HER2陽性がん細胞の消失した例では抗HER2薬の継続投与が有効ではないことを明らかにし、HER2発現が不均一な胃がんでは薬剤治療によってHER2陽性のがん細胞が減少することで抗HER2薬への耐性を獲得する可能性を示唆した。

審　査　の　要　旨

本論文において梅田　正氏は、四倍体がん細胞を起源とした染色体異数性獲得の機序、さらに、不均一ながん細胞の集団における薬剤治療の影響を検討し、染色体不安定性を獲得する機序の一つとして、がん細胞は四倍体の状態を経て、多極性細胞分裂を行うことで不均一な染色体数を持つ集団へ変化することを明らかにした。またその制御には、Eg5をはじめとした分裂期に必要なキネシンのバランスが重要であることを示した。このようながんは、薬剤治療の結果HER2といった抗がん剤の標的を欠失させることがあり、それにより薬剤の耐性の原因になりうることを示唆した。以上の結果はがんの発生や進行機構、治療戦略を考える上で有意義であると考えられた。

令和３年１月２５日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。