

氏名	田地 佳那			
学位の種類	博士 (医学)			
学位記番号	博甲第	7897	号	
学位授与年月	平成 28 年 4 月 30 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Luminal type 乳癌における FOXA1 の癌幹細胞性に関する生物学的意義の検討			
主査	筑波大学教授	医学博士	大河内 信弘	
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	加野 准子	
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	丸島 愛樹	
副査	筑波大学助教	博士 (薬学)	船越 祐司	

論文の内容の要旨

(目的) 乳癌の 70%は estrogen receptor(ER)陽性乳癌とされ、intrinsic subtype における luminal type 乳癌に相当する。内分泌療法反応性であり予後良好とされるが、一方で術後 10 年以降の晩期再発が問題となっている。本研究では癌幹細胞マーカー及び mammosphere により抽出された癌幹細胞集団の解析を行い、その特性を見出すとともに、FOXA1 をはじめとした ER 関連因子との関係を明らかにし、Luminal type 乳癌の晩期再発につながる機序を解明することを目的とした。

(対象と方法) 研究には、ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞株である MCF7 及び HCC1500, さらに筑波大学再生医学・幹細胞生物学研究室の先行研究で樹立された乳癌再発患者胸水由来細胞 BC#1 を用いた。樹立された BC#1 の characterize には、細胞免疫化学染色によるホルモン受容体、HER2、サイトケラチン(CK)8 及び 5/6、並びに qPCR における ER 発現を用いて評価した。それぞれの細胞系における幹細胞性を、Aldefluor を用いた ALDH 活性及び CD44⁺/CD24⁻の発現、並びに mammosphere assay を用いて評価した。ALDH 活性を指標に flow cytometer で分取した ALDH-high 群と ALDH-low 群、または接着培養群と mammosphere 培養群で多能性遺伝子及び ER 関連遺伝子につき qPCR を用いて発現を比較した。FOXA1 のタンパク発現評価については細胞免疫化学染色及び western blot を用いて解析した。Tamoxifen(TAM)の幹細胞性に対する影響を調べるため、MCF7 cell 及び BC#1 を用いて TAM 添加 mammosphere 培養を行った。添加 TAM 濃度は growth inhibition curve を作成し 5 μM とした。これにより生成された mammosphere に対しても RNA 抽出を行い、qPCR により TAM 添加/非添加に

おける多能性遺伝子及び ER、FOXA1 の発現を比較した。FOXA1 の幹細胞性への影響を評価するため、shFOXA1 MCF7 cell 及び shControl MCF7 cell を樹立した。Knock down 効果は FOXA1 protein 発現の低下及び FOXA1 下流遺伝子である ER、AGR2 遺伝子の抑制により確認した。これらの細胞を用いて、mammosphere assay 及び colony-formation assay を用いて自己複製能を評価した。

(結果) BC#1 の初発乳癌組織におけるホルモン受容体等の発現は、ER 陽性、PgR 陽性、HER2 陰性乳癌であったが、樹立細胞は ER 陰性、PgR 陽性、HER2 陰性と初発組織と発現状況が異なる結果であった。一方 CK8 は強陽性、CK5/6 もわずかながら陽性であり、乳癌細胞に一致する結果であった。ER 発現を qPCR で解析した結果、MCF7 及び HCC1500 と比較し明らかに低発現であるものの、ER 陰性乳癌株である MDA-MB-231 と比較すると有意に高発現であった。MCF7, HCC1500, BC#1 の 3 細胞系における癌幹細胞性の検討では、癌幹細胞マーカー発現及び mammosphere assay においていずれも BC#1 が最も癌幹細胞性が高い結果であった。また、MCF7 の接着培養細胞及び mammosphere 培養細胞における ALDH 活性の比較により、mammosphere 培養が癌幹細胞を濃縮していることを確認した。ALDH 活性を指標に flow cytometer で分取した ALDH-high 群と ALDH-low 群における多能性遺伝子及び ER 関連遺伝子発現の比較では、明らかな統計学的有意差は認めなかったが、ALDH-high 群で FOXA1 の発現が高い傾向にあった。接着培養群と mammosphere 培養群における比較では、統計学的有意差をもって mammosphere 培養群において多能性遺伝子及び FOXA1 遺伝子、FOXA1 protein が高発現していた。TAM 添加 mammosphere assay では、TAM 添加群において非添加群と比較し明らかに mammosphere 形成数が低下したが、残存し形成された mammosphere に対する遺伝子発現解析では、TAM 添加群において多能性遺伝子及び FOXA1 遺伝子の高発現が認められた。FOXA1 knockdown MCF7 cell を用いた解析では、mammosphere 形成数において 2 群間に差を認めなかったが、colony-formation assay では knockdown cell において明らかな colony 形成低下を認めた。

(考察) BC#1 と初発乳癌組織におけるホルモン受容体発現の乖離は、転移再発の過程での発現強度の変化または培養環境における ER 発現の不安定性が影響しているものと考えた。3 細胞系における癌幹細胞マーカーと mammosphere assay の比較からは、mammosphere 培養における癌幹細胞濃縮が癌幹細胞マーカーに反映されており、両指標は癌幹細胞の存在に関し相関すると考えられた。FOXA1 は ER 発現または活性を調節する転写因子とされているが、増殖因子としても抑制因子としても知られており、その役割は未確定である。本研究では、TAM 添加 mammosphere においても FOXA1 上昇が認められ、FOXA1 が癌幹細胞集団に高発現した結果、薬物耐性を示した可能性が考えられた。また FOXA1 knockdown による検討では、mammosphere assay においては 2 群間に差を認めなかったものの、colony-formation assay では明らかな差を認め、mammosphere 特異的な FOXA1 の過剰発現機序の存在及び colony-formation assay に反映される FOXA1 依存性の増殖能維持が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評) 本研究では接着培養と mammosphere 培養における遺伝子発現の比較において、FOXA1 の遺伝子及びタンパク発現増加した結果から、FOXA1 が Luminal type 乳癌幹細胞のホルモン耐性及び増殖能に強く関与していることを明らかにした点が高く評価される。mammosphere 培養系における FOXA1 過剰発現の機序及びその細胞生物学的意義に関して更なる検討を行うことで、luminal type 乳

審査様式 2 - 1

癌における乳癌幹細胞及び晩期再発の制御につながる研究と考える。以上の内容はすでに雑誌 **Cancer Science** に掲載されることが決定しており、今後の我が国の乳癌の治療に大きく寄与する貴重な研究といえる。

平成 28 年 2 月 10 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論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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