

審査の結果の要旨

氏名 村山 貴彦

本研究はがん幹細胞に作用することで肺腺がんの発症に関与すると考えられる融合遺伝子 CD74-NRG1 と、がん幹細胞の維持において重要な役割を演じていると考えられる MCM10 の機能をそれぞれ明らかにするため、*in vitro* と *in vivo* の系を組み合わせ解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1-1. CD74-NRG1 を肺がん細胞株や乳がん細胞株に発現させて **sphere forming assay** を行なったところ、浮遊培養条件下でのスフィア形成能が亢進した。また、**western blot** にて **Nanog** 等の幹細胞マーカーの発現量が増加していることも示され、この融合遺伝子を発現させることでがん幹細胞様の形質が増強されることが明らかとなった。
- 1-2. CD74-NRG1 がどのようなシグナルを誘導してがん幹細胞によるスフィア形成を促しているかを突きとめるため、**western blot** と阻害剤や抗体添加条件での **sphere forming assay** を用いて解析した。その結果、CD74-NRG1 は **HER2-HER3** 受容体への結合を介して **PI3K/Akt/NFκB** 経路を活性化することが示された。さらに。その下流ではがん幹細胞に直接作用すると考えられる **IGF2** の発現が誘導されることも示された。また、CD74-NRG1 によって活性化される上記のシグナル伝達経路の活性を阻害剤によって抑制した際にスフィアの形成効率を減弱させることができたことより、これらの阻害剤が治療にも活用できる可能性が示された。
- 1-3. 免疫不全マウスへ CD74-NRG1 発現細胞を **limiting dilution** で移植したところ、ベクターコントロール導入細胞よりも腫瘍形成効率が有意に高いことが示された。ここから、この融合遺伝子のがん幹細胞様の形質を増強する効果は *in vitro* のみでなく *in vivo* においてもみられるものであることが明らかとなった。
- 1-4. CD74-NRG1 を正常の肺上皮由来の細胞株に発現させた場合でもスフィアの形成が促進されたことから、この融合遺伝子がドライバー変異として働きうることを示唆された。

- 2-1. がん幹細胞が濃縮されていると考えられる細胞集団と、分化が進んでいると考えられるがん細胞集団の遺伝子発現プロファイルを **RNA-seq** にて比較したところ、**MCM10** ががん幹細胞様の集団において強く発現亢進を受けていることが明らかとなった。
- 2-2. がん細胞における **MCM10** の役割を調べるために、**siRNA** を用いてノックアウト

の実験を行なったところ、MCM10 ノックダウン細胞は増殖能の低下に加え、スフィア形成効率の減少を示した。さらに western blot によっても MCM10 をノックダウンした細胞集団では Nanog 等の幹細胞マーカーの発現量が減少していた。これらの結果より、MCM10 をノックダウンするとがん幹細胞様の集団の割合が減少しているのではないかと考えられた。

- 2-3. DNA fiber assay や western blot によってがん幹細胞様の細胞集団では DNA 複製ストレスが高頻度で生じていることが示された。また、DNA 複製ストレスの原因となる mitomycin C (MMC) の存在下における細胞の生存率等を調べることで、MCM10 を強く発現していると、がん幹細胞のように DNA 複製ストレスの生じやすい環境下での生存に有利になることが示唆された。
- 2-4. shRNA を導入して MCM10 をノックダウンした細胞を免疫不全マウスに limiting dilution で移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍形成能が有意に減弱することが示された。ここから、in vivo においても MCM10 ががん幹細胞の維持に寄与していることが示唆された。

以上、本論文はがん幹細胞の維持に寄与すると考えられる 2 つの因子に注目した解析から、それらの機能を明らかにした。さらに、本研究での成果は、未だに不明な点が多いがん幹細胞の性質をより詳しく理解し、がん幹細胞に特徴的な因子やシグナル活性を標的とした効率的な治療法を開発していくうえで重要な貢献をするものであるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。