

## 論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of mechanisms for stem-like properties induced  
by growth factors in breast cancer

(乳癌における増殖因子刺激によるがん幹細胞性維持機構の解析)

氏 名 富永 香菜

我が国において乳癌は女性で最も罹患数が高い癌であり、食生活の変化や高齢化に伴って今後も患者数や死亡者数の増加が懸念されている。近年トラスツズマブなどの分子標的治療薬の登場もあり、固形癌の中で乳癌は比較的予後が良いとされている。しかし、いずれの治療を行った後でも5年以上もの潜伏期間を経て転移や再発が起こることもあり、乳癌の根治のためには未だ解決すべき問題が多く残っている。

これまで癌は細胞増殖やアポトーシスに関与する正常な遺伝子に変異が起こることで、正常の生体形成・維持の秩序を逸脱し、恒久的に増殖する単一細胞集団であると考えられてきた。しかし、近年、正常幹細胞と同様に自己複製し、非対称性分裂により分化・増殖する「がん幹細胞」とよばれる少数の細胞集団の存在が明らかになり、腫瘍はがん幹細胞と分化したがん細胞を含むヘテロな細胞集団で構成されていること明らかになってきた。乳癌においてもがん幹細胞の存在が示唆されており、再発や転移など予後不良の原因であると考えられている。がん幹細胞は組織幹細胞と同様に微小環境(ニッチ)との相互作用により幹細胞性が維持されていると考えられており、娘細胞と比較してゆっくりと分裂するため、細胞分裂が盛んな細胞を標的として開発されてきた従来型の抗癌剤に対して耐性を示す。そのため、がん幹細胞が再発や転移など予後不良の原因であると考えられている。乳癌の抗癌剤耐性、転移、再発を防止するためには、その原因となり得るがん幹細胞を根絶することが非常に重要であり、がん幹細胞の分子機構の解明し、治療応用することは喫緊の課題といえる。

我々のグループでは、ErbB3のリガンドである Heregulin (HRG) が下流の Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、Akt、NF- $\kappa$ B を活性化し、スフェア (Sphere) とよばれる直径 100 $\mu$ m 程度の球状浮遊細胞塊の形成能を促進することを明らかにしている。そこで、乳癌細胞株に HRG を添加し、PI3K 阻害剤である LY294002 ならびに NF- $\kappa$ B 阻害剤である DHMEQ の有無の条件下において時系列で RNA を回収し、DNA マイクロアレイにてデータを取得した。その結果、ErbB3/PI3K シグナルの鍵分子候補を現在までに 189 個同定することができた。これらの鍵分子候補に関して増殖因子刺激や siRNA によるノックダウンを行い、がん幹細胞の自己複製能を評価する系であるスフェア培養法で解析した結果、スフェア形成能に関与

する分子として Semaphorin3B (Sema3B)と Molecule interacting with CasL 3 (MICAL3)を見出した。

Sema3Bと MICAL3はいずれも Semaphorin シグナルに関連した分子である。Semaphorin シグナルは運動軸索誘導やシナプスボタン分配、神経発生に起こる軸索剪定など、神経システムの構築に働くことが知られている。しかし、がん幹細胞での機能についてはわかっていない。まず申請者は Semaphorin シグナルが乳がん幹細胞の自己複製能に関与するか検討した。HRG および多種の増殖因子を含む Sphere culture medium (SCM)の誘導により分泌された Sema3B を siRNA によりノックダウンしたところ、スフェア形成が有意に抑制された。また、Sema3B と同様のレセプターに結合し、乳癌細胞および血管内皮細胞を含むニッチ細胞から分泌されてくることが知られている Sema3A を乳がん細胞株に添加したところ、スフェア形成が亢進した。以上の結果から、Sema3A および Sema3B はヒト乳癌細胞のスフェア形成能に関与することが明らかになった。

次に MICAL3 の乳がん幹細胞における機能を評価した。MICAL は Semaphorin のレセプターの1つである Plexin とシグナルの下流因子である Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)に結合しており、N-terminal flavoprotein monooxygenase ドメイン、calponin homology (CH)ドメイン、LIM ドメイン、coiled-coil ドメインが付加したマルチドメインタンパク質である。*Drosophila* を用いた実験により、アクチン脱重合や酸化還元反応による細胞機能の調節(レドックス制御)を行っていることがわかっている。しかし脊椎動物細胞を用いた研究は乏しく、Semaphorin/plexin シグナルと MICAL の協調作用やがんなどの疾患との関連性もわかっていない。まず、ヒト乳がん細胞株や乳がん臨床検体を用いて、MICAL3 を siRNA にてノックダウン後スフェア形成能を評価した。その結果、コントロールと比較して MICAL3 をノックダウンした細胞では有意にスフェア形成能が抑制されることが分かった。さらに、MICAL3 の short hairpin RNA (shRNA)をヒト乳がん細胞株および乳がん臨床検体に導入後、細胞数を段階希釈して免疫不全マウスへ移植し、腫瘍形成能を評価したところ、MICAL3 をノックダウンした群で顕著に腫瘍形成が抑制されることがわかった。

次にスフェア形成能に関与する MICAL3 のドメインを探索するために、野生型とレドックス反応に関与する monooxygenase ドメインの変異型、及び小胞体輸送に関与する coiled-coil ドメインの欠損型、それぞれの cDNA 発現ベクターをヒト乳がん細胞株に導入した。それらの細胞株を用いてスフェアアッセイを行ったところ、変異型を導入した細胞のみスフェア形成能が有意に減少した。一方、小胞体輸送に関わる coiled-coil ドメインはスフェア形成能に直接関与していないことが明らかとなった。以上の結果から、MICAL3 は乳がん幹細胞のスフェア形成能に重要であり、特に FAD 結合モチーフがスフェア形成に関与していることを見出した。

神経細胞において、MICAL3 は Semaphorin3A 刺激により CRMP2 と相互作用を起こすことが知られている。そこで、神経細胞における研究を参考に検討したところ、MICAL3 は monooxygenase 活性を介在することにより Semaphorin シグナルの下流因子である CRMP2 の二量体形成に関与することを見出した。また、ヒト乳癌細胞株で CRMP2 の siRNA を用いたス

フェアアッセイにより、CRMP2 が乳がん幹細胞のスフェア形成に関与していることがわかった。したがって、Semaphorin3A 刺激下において MICAL3 は CRMP2 と相互作用し、CRMP2 の二量体形成を促進することで乳がん幹細胞の自己複製能に関与していることが示唆された。

次に Semaphorin の受容体である Neuropilin-1 (NP1) に着目した。臨床検体から分散した細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、NP1 は乳がん幹細胞が濃縮されている CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> 分画にて高発現していることがわかった。さらに NP1 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ分取し、スフェア形成能を評価したところ、NP1 陽性細胞のみスフェアが形成され、NP1 中和抗体によりスフェア形成が顕著に抑制されることがわかった。これらヒト臨床検体を用いた実験より、NP1 は乳がん幹細胞で高発現しており、自己複製能に関与する重要な受容体であることが示唆された。

最後に、神経細胞にて Semaphorin シグナルの下流で CRMP2 が Numb に結合し、Numb を介したエンドサイトーシスに関与しているとの報告に注目した。Numb は神経幹細胞ならびに前駆細胞の非対称性分裂において分裂細胞の片方に局在することが知られている。そこで、NP1 陽性細胞が乳がん幹細胞の指標となり得ることを利用し、幹細胞の非対称性分裂を評価する系である cell paired assay を行った。フローサイトメトリーにて分取してきた NP1 陽性細胞（臨床検体細胞）をスライド上に低密度にて播種し、SCM および Sema3A 刺激後、1 回細胞分裂した後に抗 Numb 抗体にて免疫染色を行った。その結果、NP1 陽性細胞は Numb と両局在しており、SCM および Sema3A 刺激下の細胞分裂時において、NP1/Numb 陽性細胞は対称性分裂を起こすことを見出した。siRNA にて MICAL3 をノックダウンした細胞において、同様の実験を行ったところ、MICAL3 をノックダウンした細胞ではコントロールと比較して NP1<sup>+</sup>/Numb<sup>+</sup>細胞と NP1<sup>-</sup>/Numb<sup>-</sup>細胞の非対称性分裂を起こす細胞が有意に増加することがわかった。以上の結果から、MICAL3 は SCM および Sema3A 刺激下における NP1/Numb 陽性細胞の乳がん幹細胞の対称性分裂を誘導していることがわかった。つまり、MICAL3 は乳がん幹細胞の自己複製を伴った細胞増殖の鍵となる分子であることが明らかとなった。本研究により、MICAL3 を介した乳がん幹細胞特異的なシグナルが明らかとなったことで、乳がん幹細胞をターゲットとした治療薬、つまり、副作用の少ない抗癌剤の開発につながるのではないかと考えている。