

## [課程一2]

### 審査の結果の要旨

氏名 富永 香菜

本研究は乳がん幹細胞を評価する系の一つであるスフェア形成能に寄与する分子として見出した Molecule interacting with CasL 3 (MICAL3)について、乳癌臨床検体細胞や Patient-derived xenograft (PDX) モデルを用いて解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 乳がん幹細胞のスフェア形成能を亢進する Heregulin (HRG)/PI3K/NF- $\kappa$ B シグナルについて、時系列 DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った結果、Semaphorin 3 (Sema3) シグナルに関連する Sema3B と MICAL3 を見出した。
2. ヒト乳癌細胞株を用いたスフェアアッセイにより、HRG および多種の増殖因子を含むスフェア培養用培地により発現誘導された Sema3B が乳がん幹細胞のスフェア形成に寄与することが示された。また、同じ Sema3 シグナルを活性化させる Sema3A についてリガンドによる刺激を行ったところ、乳がん幹細胞のスフェア形成能を亢進することが示された。つまり、Sema3A と Sema3B は乳がん幹細胞のスフェア形成に寄与していることが示された。
3. ヒト乳癌細胞株や乳癌臨床検体細胞を用いて、MICAL3 を siRNA にてノックダウン後スフェア形成能を評価した結果、有意にスフェア形成能が抑制されることが示された。さらに、MICAL3 の shRNA を作成し、乳癌臨床検体由来細胞に導入後、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 を発現抑制することにより腫瘍形成率が低下することが示された。
4. MICAL3 の cDNA 発現ベクター（野生型、レドックス反応に関与する monooxygenase ドメインの変異型、小胞体輸送に関与する coiled-coil ドメインの欠損型）をヒト乳がん細胞株に導入しスフェアアッセイを行ったところ、野生型および欠損型を導入した細胞ではスフェア形成能が亢進したのに対し、monooxygenase ドメインの変異型を導入した細胞ではスフェア形成能が有意に減少した。つまり、MICAL3 の monooxygenase ドメインがスフェア形成に寄与していることが示された。
5. In situ PLA によるタンパク間相互作用の可視化により、Semaphorin シグナルの下流に存在する CRMP2 と MICAL3 は、Sema3A 刺激により相互作用を引き起こすことが示された。さらに、Western blot (reducing)により、MICAL3 は Sema3A 刺激下において CRMP2 の二量体形成を介在する分子であることが示された。
6. Sema3 の受容体のひとつである Neuropilin-1 (NP1) の発現について乳癌臨床検体細胞を用いて FACS 解析したところ、乳がん幹細胞を多く含むとされる CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> 分画にて高発現していることが示された。また、NP1 陽性細胞と陰性細胞を分けて回収し、各々

のスフェア形成能を評価したところ、NP1 陽性細胞でのみスフェアが形成されることが示された。つまり、NP1 はがん幹細胞性の高い細胞で発現していることが認められた。

7. NP1 陽性細胞の細胞分裂様式を検討する目的で、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。低密度で播種した NP1 陽性細胞の細胞分裂時に抗 Numb 抗体で免疫染色した結果、NP1 と Numb は両局在しており、Sema3A 刺激下において NP1/Numb 陽性細胞は対称性分裂を起こすことが示された。また、MICAL3 siRNA を用いて MICAL3 を発現抑制した細胞では細胞分裂の時に NP1/Numb 陰性細胞の分裂が多く認められた。つまり、MICAL3 は乳がん幹細胞の対称性分裂を引き起こすことが示された。

以上、本論文は乳癌細胞において、Sema3 刺激下で NP1/MICAL3/CRMP2/Numb シグナルが活性化すること、また、このシグナルの活性化による乳がん幹細胞の対称性分裂を伴った腫瘍形成の機序を明らかにした。本研究は、これまで未解明の部分が多かった乳がん幹細胞の細胞分裂様式の一端を明らかにしたと考えられる。この発見は、乳がん幹細胞をターゲットとした抗癌剤の開発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。