

# 「博士論文」 合否査定資料

申請者 同志社女子大学大学院 薬学研究科医療薬学専攻  
職・氏名 柏井 香輪

---

学位の名称 博士（薬学）

---

論文名 アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞の階層的再構成における  
癌幹細胞マーカーALDH1A3 と Sox-2 の発現誘導

---

審査委員 主 査 漆谷 徹郎

---

副 査 川崎 清史

---




副 査 高橋 玲

---

審査結果 合




# 博士学位論文審査結果報告書

2017年2月8日

学位申請者	柏井香輪		
審査委員	主査 漆谷徹郎		
	副査 川崎清史		
	副査 高橋玲		
<p>本学大学院薬学研究科博士課程在学中の柏井香輪から、「アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞の階層的再構成における癌幹細胞マーカーALDH1A3とSox-2の発現誘導」という論文を添えて、博士(薬学)の学位申請があった。これを受けて公正に審査委員が決められ、主査漆谷徹郎、副査川崎清史・高橋玲の三名が審査委員として審査に当たった。</p> <p>各委員は1月13日に開かれた公開の論文発表・口頭試問会において、論文内容の確認並びに学力検査を兼ねて試問を申請者に対して行った。約60分間の発表・口頭試問であったが、各委員から忌憚のない鋭い質問や意見が全体及び細部にわたって述べられた。質疑応答において、申請者は厳しい質問内容に対しても的確に応答し、論文内容がよく理解でき好感の持てるものであった。この発表・試問を通して、申請者の学力・人物ともに極めて優れていることを確認した。また本論文に関する報文として、英文誌(査読付き)に筆頭著者として一報公表されており、「査読付き英文論文(筆頭著者)が最低一報は受理されていること」という審査要件を満たしている。</p> <p>申請論文に関しては、治療抵抗性を示す癌に対する新たな治療方法の開発が望まれている現在において、今後の展開が期待される研究のひとつである。癌研究分野での新しい知見が十分に示されており、内容的に高く評価できるものである。</p> <p>よって審査委員は全員一致で、申請者柏井香輪の申請論文に対して、博士(薬学)の学位を授与するに値するものであることを決定した。</p>			




# 博士学位論文審査結果要旨

2017年2月8日

学位申請者	柏井香輪		
審査委員	主査 漆谷徹郎		
	副査 川崎清史		
	副査 高橋玲		
<p>論文題名</p> <p>アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞の階層的再構成における癌幹細胞マーカー ALDH1A3 と Sox-2 の発現誘導</p>			
<p>(要旨)</p> <p>柏井香輪から提出された学位申請論文の構成は以下の通りである。</p> <p>1 要旨、 2 序文、 3 研究方法、 4 結果、 5 考察、 6 結論、 7 参考文献、 8 謝辞</p> <p>治療抵抗性を示す癌細胞集団における癌幹細胞の存在とその集団の階層的再構成過程を明らかにすることを目的とした論文である。ヒト乳癌培養細胞株 HCC1937 を用いて、doxycycline(以下 dox) で p53 依存性アポトーシスを誘導可能な in vitro の実験系を作成し、アポトーシス抵抗性を示す細胞について、免疫細胞化学染色、免疫蛍光染色および Fluorescence-activated cell sorting によって、乳癌幹細胞関連遺伝子である ALDH1A3 と、Sox-2、管腔前駆細胞関連マーカーである GATA3、および細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現パターンを経時的に解析している。</p> <p>乳癌幹細胞マーカーである ALDH1A3 を発現する ALDH1A3+細胞の数が、dox 投与後の生存細胞集団で増加していることを確認している。また、ALDH1A3/Ki-67 の共発現を示す細胞が検出され、ALDH1A3 は癌幹細胞のみならず前駆細胞にも発現することを明らかにしている。管腔前駆細胞マーカーである GATA3 を発現する GATA3+細胞の割合は ALDH1A3+細胞よりも遅れて増加し、dox 投与 5 日目にピークを示されている。免疫蛍光染色により ALDH1A3 と GATA3 を共発現する細胞が確認されたことにより、ALDH1A3 が管腔前駆細胞にも発現することを明らかにしている。もう一つの癌幹細胞マーカーである Sox-2 の発現は ALDH1A3 発現と正の相関を示し、癌幹細胞のみならず前駆細胞と管腔前駆細胞にもみられたが、さらに ALDH1A3 と Sox-2 の相違点も示されている。本研究では、癌幹細胞マーカー ALDH1A3 と Sox-2、分化マーカー GATA3 および、増殖マーカー Ki-67 の発現パターンを比較解析することによって、アポトーシス抵抗性乳癌細胞と癌幹細胞との関係および癌ヒエラルキー再構成におけるこれらの遺伝子の役割を明らかにしている。</p> <p>以上のように本論文は、癌治療の分野での新たな標的である癌幹細胞とその階層構築の特徴を明らかにした点で高く評価されるものである。よって、本論文は博士(薬学)学位を授与するに値する論文であると認める。</p>			

# 博士学位論文内容要旨

2017年2月8日

学位申請者	柏井香輪		
審査委員	主査	漆谷徹郎	
	副査	川崎清史	
	副査	高橋玲	

## (要旨)

乳腺組織における乳管は乳管上皮細胞と筋上皮細胞の2種類の細胞から構成されており、乳癌の発生源は主に乳管上皮細胞である。乳癌細胞が乳管の基底膜を破綻させ間質に浸潤していくことで、乳癌の転移が生じる。乳癌の転移、再発の原因となる癌幹細胞は腫瘍始原細胞ともいわれ、癌細胞の少数集団を構成している。癌幹細胞は自己複製能と多分化能を合わせ持つと定義され、化学療法や放射線療法に抵抗性があるといわれている。乳癌細胞の階層的な構造は幹細胞、前駆細胞、成熟細胞から構成されている。アルデヒド脱水素酵素(Aldehyde dehydrogenase: ALDH)は19個のアイソタイプが知られており、細胞質、ミトコンドリア、核内に局在している。ALDHsはアルデヒドからカルボン酸への酸化反応の触媒作用、エステル加水分解作用、抗酸化作用を持つNAD(P)Hの補酵素などの代謝過程において必要不可欠な酵素である。ALDHsは正常幹細胞のみならず有望な腫瘍幹細胞マーカーとして広く使われている。特にALDHsアイソタイプのひとつであるALDH1A3はレチノイン酸合成にも関係があり乳癌の臨床的予後マーカーとして知られている。GATA3(GATA-binding protein 3)は乳腺管腔上皮への分化において必要不可欠なzinc-finger転写因子である。Sox-2(Sex-determining Y [SRY]-box binding protein-2)は多能性幹細胞の維持、胚発生の制御において重要な役割を持つ転写因子であり、乳癌幹細胞にも関連があることが報告されている。腫瘍抑制遺伝子TP53はストレス条件下で誘導され細胞周期停止や細胞死を起こす。ヒト乳癌のサブタイプは、遺伝子発現解析によってluminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-likeの4つのタイプに分類される。私の用いたHCC1937細胞はbasal-likeタイプの乳癌由来の培養細胞株で、エストロゲン、プロゲステロン、ヒト上皮成長因子受容体2が陰性、すなわちトリプルネガティブであり、さらにBRCA-1変異、TP53変異、治療抵抗性を示す予後が悪いと考えられている乳癌由来である。

私の研究は、ヒト乳癌細胞集団の階層的再構成の動態における癌幹細胞マーカーALDH1A3とSox-2の遺伝子発現の役割を明らかにすることを目的とし、p53誘導によるアポトーシスに抵抗性を示すHCC1937細胞を用いて両遺伝子の発現パターンの変化を解析した。

研究方法として、HCC1937細胞にdoxycyclineで発現誘導可能なwt-p53プラスミドを安定的に遺伝子導入し、分離されたクローンの一つをHCC1937/p53と名付けて使用した。HCC1937/p53細胞をdoxycycline含有培地で1~10日間培養した細胞をそれぞれdox1d~dox10dと名付けた。

免疫細胞化学染色においては、スライドガラス上で培養した細胞をdox未処理および処理後に4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1%TritonX-100で膜透過処理し、0.3%過酸化水素水/メタノール

溶液で内因性ペルオキシダーゼを不活性化し、一次抗体として抗 ALDH1A3 抗体 (Purified rabbit polyclonal, ABGENT, 1:1000)、抗 GATA3 抗体(Rabbit polyclonal, abcam, 1:100)、抗 Sox-2 抗体 (Mouse monoclonal, abcam, 1:100)を 4°C で 1 日反応させた。さらに第二次抗体反応、酵素反応の後に DAB で発色させた。ALDH1A3 は細胞質内、GATA3 と Sox-2 は核内に染色された細胞をそれぞれ陽性とした。

二重免疫細胞化学染色においては、抗 ALDH1A3 抗体を用いて、上記と同様に一次抗体反応の後、第二次抗体反応、酵素反応させ BCIP® / NBT で発色させた。次に抗原賦活化を行い、1 時間 37°C で抗 Ki-67 抗体 (Mouse monoclonal, DAKO, 1:500) を反応させ、さらに第二次抗体反応、酵素反応の後に DAB で発色させた。ALDH1A3 は細胞質内、Ki-67 は核内に染色された細胞を陽性とした。

免疫蛍光染色では、一次抗体として抗 ALDH1A3 抗体(Purified rabbit polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗 Ki-67 抗体 (Mouse monoclonal, DAKO, 1:500)、抗 GATA3 抗体(Monoclonal mouse IgG, R&Dsystem, 1:50)を 4°C で 1 日反応させた。Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG を蛍光標識二次抗体として用いた。DAPI で核染色を行った。

Fluorescence-activated cell sorting =FACS を用いた実験では、抗 p53 抗体 (Mouse monoclonal, BD Biosciences) を使用した。7-AAD 染色で死細胞を識別し除外した。BD FACS Calibur Flow cytometer で解析を行った。

以上の実験材料と方法によって得られた結果を以下に記載する。dox 投与数時間で p53 発現がピークに達し、その後、発現レベルが持続することが確認された。dox1d から dox10d までの解析でアポトーシスを免れた生細胞数は dox1d から dox5d にかけて減少し、dox8d から再び増加した。細胞数が dox1d で減少したにもかかわらず、免疫細胞化学染色による ALDH1A3<sup>+</sup>細胞数は一過性に増加した。もともと HCC1937/p53 細胞は増殖するにつれて大型細胞が出現し大小混在した集団を形成する特徴をもつことから、細胞長径 50 μm 未満を小型細胞、50 μm 以上を大型細胞として比較した。ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞の数は dox1d で一過性に増加し dox7d にかけて減少した。ALDH1A3 発現の有無で比較すると ALDH1A3<sup>+</sup>細胞における細胞長径では dox1d は control に比べて、小型化の傾向がみられた (P<0.001)。さらに ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は dox1d から dox4d にかけて時間依存的に、大型化した (P<0.001)。一方、ALDH1A3<sup>-</sup>細胞は dox1d から dox4d まで ALDH1A3<sup>+</sup>細胞より大型であった (P<0.001)。Control 細胞における ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の割合が 45.8%と高い値を示したことから癌幹細胞以外での ALDH1A3 の発現の可能性が推定される。増殖マーカーである Ki-67 を使った二重免疫細胞化学染色において ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>細胞の総数は、dox1d で増加し、続けて dox3d にかけて減少し、dox7d 以降、再び増加した。さらに ALDH1A3 と Ki-67 の発現パターンを細胞サイズ別にみると dox1d における ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>小型細胞の数は一過性に顕著に増加した。また ALDH1A3 と Ki-67 の免疫蛍光二重染色でも両者の共発現が示された。ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>細胞の細胞長径において dox5d は dox1d に比べて大型化の傾向がみられた (P<0.001)。次に ALDH1A3<sup>+</sup>細胞における管腔上皮分化誘導マーカー GATA3 の発現を解析した。ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の割合は dox1d で増加し、その後、dox5d まで高い割合を保ち、一方、GATA3<sup>+</sup>細胞の割合は ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の動きより遅れて dox3d から dox5d にかけて増加し、dox6d から dox9d にかけて減少した。同一細胞内で ALDH1A3 と GATA3 の共発現を示す細胞も存在することが免疫蛍光二重染色により確認された。細胞の大きさと GATA3 発現には正の相関がみられた。また dox2d から dox8d にかけて GATA3<sup>+</sup>細胞は GATA3<sup>-</sup>細胞に比べて細胞の大きさが顕著に大きくなる傾向がみられた (P<0.001)。ALDH1A3 と同様に癌幹細胞マーカーのひとつである Sox-2 の発現パターンを解析した。細胞の大きさととの関係を見ると、Sox-2<sup>+</sup>細胞は dox1d で小型化の傾向がみられ、dox2d 以降、Sox-2<sup>+</sup>




細胞と Sox-2<sup>-</sup>細胞は、いずれも大型化の傾向を示した。これに対して ALDH1A3<sup>+</sup>細胞では dox1d から dox3d にかけて小型細胞の多くがみられ、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞における平均細胞長径が 60 μm 未満であった。すなわち、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は Sox-2<sup>+</sup>細胞と比べて小型化の傾向を示している。また Sox-2<sup>+</sup>細胞の細胞数を経時的にみると、dox7d までの Sox-2 の発現パターンは ALDH1A3 のそれに類似していた。さらに細胞サイズ別による Sox-2 発現頻度は Sox-2<sup>+</sup>小型細胞が、dox1d で一過性の増加がみられ、Sox-2<sup>+</sup>大型細胞は dox2d にかけて増加し、Sox-2<sup>+</sup>小型細胞と Sox-2<sup>+</sup>大型細胞とともにアポトーシス抵抗性を示した。dox2d 以降、Sox-2<sup>+</sup>小型細胞と Sox-2<sup>+</sup>大型細胞は、いずれも dox10d にかけて漸減した。

今回得られた実験結果についての考察を以下に記す。ALDH1A3<sup>+</sup>細胞が dox1d で増加してアポトーシス抵抗性を示したことは、癌幹細胞がアポトーシス抵抗性である Mimeault らの報告に一致している。乳癌細胞における dox 投与による p53 誘導によって ALDH1A3<sup>+</sup>細胞が増加するという私の結果から ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は p53 依存アポトーシス抵抗性細胞であると考えられる。癌幹細胞の大きさについては明らかにされていないが、私の実験では、dox1d でアポトーシス抵抗性を示して生き残った細胞が主に ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞であることから癌幹細胞は小型細胞であることが推定される。実際に Qiuhui らは、癌幹細胞は主に休止状態にあり前駆細胞、成熟細胞より、一般的に小さいと報告している。癌幹細胞は非対称性に分裂し、前駆細胞に比べて分裂速度は遅いが、前駆細胞の増殖速度は速いといわれている。ALDH1A3<sup>+</sup>細胞、ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞はこの実験系で高い Ki-67 index を示したことから癌幹細胞以外にも分裂する前駆細胞が含まれていることを示唆している。ALDH1A3 は悪性度の高い転移巣において強発現するとされているのに対して、乳管発生における管腔分化誘導に関係している GATA3 は転移巣で低発現の傾向がみられ、両者の発現は逆相関を示すと報告されている。このことは私の実験結果において dox4d から dox6d における ALDH1A3 と GATA3 の発現が逆相関を示したことと一致する。GATA3<sup>+</sup>細胞が ALDH1A3<sup>+</sup>細胞に遅れて増加する理由は、集団を再構成するために p53 誘導によるアポトーシス後に残った ALDH1A3<sup>+</sup>細胞に管腔分化誘導が生じたためであると考えられた。dox5d において免疫蛍光二重染色で ALDH1A3 と管腔前駆細胞マーカーである GATA3 の共発現を示す細胞が 58.5% の割合で検出されたことにより ALDH1A3 が管腔前駆細胞にも発現する可能性が示唆された。癌幹細胞マーカーである ALDH1A3 と Sox-2 の経時的な発現パターンの類似性は両者の相関を強く示唆している。同研究室内の他者の実験結果では同一細胞内における ALDH1A3 と Sox-2 の遺伝子発現を FACS で解析したところ、両者の発現は正相関を示すことが確認された。また FACS による細胞周期では Sox-2 が前駆細胞すなわち細胞分裂に入った細胞にも発現していることが明らかとなった。さらに Sox-2 と GATA3 の共発現が確認されたことにより、Sox-2 が管腔前駆細胞にも発現することが明らかとなった。これらの結果により Sox-2 は ALDH1A3 と同様に乳癌幹細胞に特異的ではなく、前駆細胞と管腔前駆細胞にも発現することが示された。今回の私の実験結果において両者の相違点も明らかになった。dox1d における Sox-2<sup>+</sup>細胞数が 11 倍の顕著な増加を示したことは、細胞分裂のみでは説明できず、Sox-2<sup>-</sup>細胞に発現のスイッチが入り Sox-2<sup>-</sup>細胞から Sox-2<sup>+</sup>細胞に変化した可能性があると考えられた。Sox-2 は通常では発現が抑制されているが、アポトーシス誘導というストレス下で発現し、集団の再構成に関与することが示唆された。それに対して ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は Sox-2 のような発現の変化ではなく、生き残った細胞の数が 1.5 倍の増加を示したと考えられた。

結論として、本研究では、癌幹細胞マーカー ALDH1A3 と Sox-2、分化マーカー GATA3 および、増殖マーカー Ki-67 の発現パターンを比較解析することによって、アポトーシス抵抗性乳癌細胞と癌幹細胞との関係および癌ヒエラルキーの再構成におけるこれらの遺伝子の役割が明らかとなった。

# 試問結果の要旨

2017年2月8日

学位申請者	柏井香輪	
審査委員	主査	漆谷徹郎 
	副査	川崎清史 
	副査	高橋玲 

(要旨)

提出された学位申請論文をあらかじめ通読した上で、三名の審査員が揃って公開の口頭発表を聴講するとともに、当該発表会場での口頭試問ならびに個別の口頭試問を厳正に実施した。

主査漆谷は申請者に ALDH1A3 の酵素活性は癌幹細胞にどのような影響を及ぼすかという点を質問した。申請者は、ALDH1A3 は Retinal から Retinoic acid に酸化させる酵素であり、正常状態においては、Retinoic acid は核内に移行し、様々な物質と複合形成し分化を起こすはたらきをもつことを説明した。しかし、Retinoic acid が低濃度の時には、核内にある C/EBP beta は Retinoic acid などの複合物質が作用するプロモーター領域に結合することで ALDH1 発現を促進させる。その結果、薬物抵抗性が生じると説明がなされた。申請者は ALDH1A3 の酵素と薬物抵抗性を示す癌幹細胞との関係について明瞭に応答した。そして、なぜ細胞の大きさが大きくなるのか。また、それにどのような意味があるのかという問いかけに対して、癌幹細胞は分化が進むにつれて大型化する傾向があるという点について、申請者が説明した。

副査川崎は dox を投与しなかった場合のマーカーの変化、さらになぜ細胞内の発現量ではなく経時的な発現パターンの変化をみているのかについて申請者に質問した。この質問に対して申請者は、この研究の目的が dox 投与後に生存した細胞の集団が経時的にどのような変化をもたらすかについてみることでであると応答した。さらに、ALDH1A3 の発現には heterogeneity を疑う余地はないのかという問いかけに対して、申請者は、ALDH1A3+細胞の集団には一つの集団に 2 つの特徴をもった細胞が存在し、細胞分裂が活発な前駆細胞の特徴をもつタイプと癌幹細胞の特徴をもつタイプがあることを説明した。伊賀教授は Sox-2 が発現している癌細胞に対する治療法について申請者に質問した。申請者は、現在 Sox-2 を標的とした治療法はないが、私の研究結果で dox8d 以降 Sox-2 を発現している細胞数は減少していることから Sox-2 細胞は dox に対して感受性を示すことを説明した。今までトリプルネガティブの特徴をもった乳癌のタイプは抗癌剤に感受性を示さないと言われていたが、Sox-2 を発現しているタイプであれば抗癌剤に効きやすいと考えられる点についても論じた。申請者の実験は in vitro であるが、将来はマウスへの in vivo 実験を行い、それが可能になればヒトを使った臨床に応用できることを申請者は論じた。木津教授は、なぜ p53 発現のレベルをみないかという質問を申請者にした。それに対して、申請者は dox 投与後 p53 過剰発現を起こして細胞数が減少するという FACS のデータを説明した。さらにウェスタンブロット法によるデータもあわせて提示した。

以上、公開並びに個別の口頭試問を通じ、申請者の学力および人物ともに問題なく、論文内容は綿密に組まれた実験系から得られたデータに基づくものであり、癌の治療抵抗性のメカニズムの一部を明らかにした研究であり、医療への貢献を期待させる内容として高く評価できる。よって、三名の審査委員の見解は、本論文が学位授与に十分値する内容として一致したことをここに報告する。