

「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 井澤 優希

学位の名称 博士（薬学）

論文名 幹細胞様ヒト乳癌細胞はマトリゲル上で血管擬態を惹起する

審査委員 主 査 中西 弘和




副 査 阿南 節子

副 査 高橋 玲

審査結果 合格

博士學位論文審査結果報告書

2019 年 2 月 8 日

学 位 申 請 者	井 澤 優 希	
審 査 委 員	主 査	中 西 弘 和 
	副 査	阿 南 節 子 
	副 査	高 橋 玲 

本学大学院薬学研究科博士課程在学中の井澤優希から、「幹細胞様ヒト乳癌細胞はマトリゲル上で血管擬態を惹起する」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、主査中西弘和、副査阿南節子・高橋玲の三名が審査委員として審査に当たった。




各委員は申請論文を時間をかけて丁寧に査読した後、1月17日に公開の論文発表・口頭試問会を開き、申請者に対して論文内容の確認並びに学力検査を兼ねて申請者に試問を行った。約50分間の発表・口頭試問であったが、各委員から忌憚のな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に対して的確に応答し、論文内容をよく理解して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。

申請論文に関しては、治療抵抗性を示す乳癌に対する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示されており、内容的に高く評価できるものである。

よって審査委員は全員一致で、申請者井澤優希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。

博士学位論文審査結果要旨

2019年2月8日

学 位 申 請 者	井 澤 優 希		
審 査 委 員	主 査	中 西 弘 和	
	副 査	阿 南 節 子	
	副 査	高 橋 玲	
<p>論 文 題 名</p> <p>幹細胞様ヒト乳癌細胞はマトリゲル上で血管擬態を惹起する</p>			
<p>(要 旨)</p> <p>井澤優希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 序論、3 研究方法、4 結果、5 考察、6 結論、7 補足データ、8 参考文献、9 謝辞</p> <p>癌幹細胞は、少数の細胞から構成される集団であり、腫瘍の進展と転移を促進し、化学療法および放射線治療に対して耐性を持つとされている。血管擬態 (vasculogenic mimicry: VM) は腫瘍細胞が血管様構造を形成する血管外微小血流機構で、癌の強い侵襲性に関係することが知られている。乳癌における VM 形成と癌幹細胞との関連を説明できる分子メカニズムは未だ不明な点が多い。この論文では治療抵抗性を特徴とするトリプルネガティブ乳癌由来のヒト乳癌細胞株を用いて、癌幹細胞の特性を有するアポトーシス耐性細胞に着目し、VM 形成と癌幹細胞の関連を明らかにしている。ヒト乳癌細胞株である HCC1937 細胞をマトリゲル上で 24 時間培養すると VM の特徴である honeycomb 構造が形成されることを示している。その際、免疫蛍光二重染色によって、癌幹細胞または前駆細胞の特性を示す ALDH1A3 は VM 構造の B 領域に発現し、分化した特性を有する GATA3 陽性細胞は集合領域 (A 領域) に局在することを明らかにしている。癌幹細胞の VM 形成能力を異なる 2 つの方法で選別し、VM 形成能力を比較している。ALDH 陽性を示す乳癌幹細胞が VM 形成能を有することと、アポトーシス抵抗性(治療抵抗性)を示す乳癌幹細胞がより強い VM 形成能を示すことが明らかにされている。トリプルネガティブ乳癌における治療耐性細胞が VM 形成において重要な役割を果たすことを提示した最初の実験的エビデンスである。今後、既存の抗血管形成療法が効果的でない場合に、抗 VM 形成療法の開発が腫瘍細胞への血液供給阻害や転移・再発を抑制する新たな治療法になることを示唆している研究結果である。</p> <p>以上のように本論文は、癌治療分野での新たな標的である癌幹細胞とその血管擬態形成能力との関係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>			

博士学位論文要旨

2019 年 1 月 7 日

学位申請名 井澤 優希

論文題目：

幹細胞様ヒト乳癌細胞はマトリゲル上で血管擬態を惹起する

Stem-like human breast cancer cells initiate vasculogenic mimicry on matrigel

(要旨)

【目的・背景】

癌幹細胞は『自己複製能と多分化能の両方を有する癌細胞』と定義されており、腫瘍の中でも少数の細胞から構成される集団である。癌幹細胞は腫瘍の進展と転移を促進し、化学療法および放射線治療に対して耐性を持つとされる。癌幹細胞によって強い侵襲性を獲得するとされる癌腫の例として、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) が挙げられる。TNBC は臨床的に使用される乳癌分類において、エストロゲン (ER)、プロゲステロン (PR)、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) の全てが陰性を示す乳癌であり、強い治療抵抗性を特徴とする。乳癌においては、いくつかの癌幹細胞マーカーが知られている。ALDH1(aldehyde dehydrogenase 1)は乳癌幹細胞マーカーのひとつとされ、そのサブタイプの 1 つである ALDH1A3 の発現は、特に癌幹細胞と強い関係を示す。Sox-2(Sex-determining region Y(SRY)-box binding protein-2)は幹細胞の多能性の維持および胚発生の調節において重要な役割を果たし、乳癌幹細胞においてもその特異的発現が確認されている。一方、GATA3(GATA-binding protein 3)は、乳腺管腔上皮の分化に必須の役割を果たす zinc-finger 型転写因子である。

血管擬態 (vasculogenic mimicry: VM) は腫瘍細胞が血管様構造を形成する血管外微小血流機構で、侵襲性の強い腫瘍にみられる。VM は血管新生とは異なるものであるが、宿主血管から血液供給を受ける機能的な微小循環として作用することが確認されている。臨床的には、顕著な VM 形成を有する乳癌症例は、非 VM 症例よりも高い血行性再発率および低い 5 年生存率を示す。また、様々な癌腫において、VM 形成と癌幹細胞の存在が予後に関与しているとの報告もある。

乳癌の悪性度と VM の関係が次第に明らかになってきているが、VM 形成における癌幹細胞の役割を説明できる分子メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では TNBC 由来のヒト乳癌細胞株を用いて、癌幹細胞の特性を有するアポトーシス耐性細胞に着目し、VM

形成と癌幹細胞の関連を明らかにすることを目的とする。

【研究方法】

ヒト乳癌細胞株 HCC1937 を American Type Culture Collection (ATCC) から入手して用いた。使用した HCC1937/p53 細胞は、HCC1937 細胞に doxycycline(Dox) で発現誘導可能な wt-p53 プラスミド (Tet-on Advanced system, Clontech, USA) を安定的に遺伝子導入し、分離されたクローンの一つである。HCC1937/p53 細胞を Dox 含有培地で 1~7 日間培養した細胞をそれぞれ Dox1d~Dox7d と名付けた。

〈マトリゲル上での培養 (thin gel 法)〉

VM 形成は、マトリゲル (CORNING, USA) 上で無血清培養することによって誘導した。30~40 μ L/well の液状のマトリゲルを氷上の 8well 培養スライドにコーティングし、37°C で 15 分間インキュベートしてゲル化させた。opti-MEM 培養液中の細胞 (2.45×10^5 /well) をマトリゲル上に播種後、37°C, 5%CO₂ の条件下で培養し、VM 形成を観察した。

〈droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)〉

total RNA を TRIzol (Life Technologies, USA) で抽出し、SuperScriptIII 逆転写酵素 (Life Technologies, Inc.) を用いて cDNA を合成した。QX100™ Droplet Digital™ PCR システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、目的遺伝子を増幅し、解析した。GAPDH (Hs03929097_g1)、VE-カドヘリン (Hs00170986_m1)、MMP-2 (Hs01548727_m1)、MMP-9 (Hs00957562_m1) それぞれの TaqMan® プローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いて反応を行なった。

〈蛍光免疫染色〉

マトリゲル上の細胞を 4%パラホルムアルデヒド中で 30 分間固定し、0.25% TritonX-100 で 10 分間透過処理を行なった。一次抗体として抗 ALDH1A3 (Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗 Ki-67 (Mouse IgG1 monoclonal, DAKO, 1:500)、および抗 GATA3 (Mouse IgG2B monoclonal, R&D system, 1:300) を 4°C で一晩反応させた。二次抗体としてそれぞれ Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG1、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG を室温で 1 時間インキュベートし一次抗体結合を検出した。蛍光画像は共焦点レーザー走査顕微鏡 (A1, NIKON INSTECH, Japan) で撮影した。

〈ALDEFLUOR 分析と Fluorescence-activated cell sorting (FACS)〉

ALDEFLUOR キット (STEMCELL Technologies, Canada) で ALDH 酵素活性を検出し、Cell Sorter (SH800 SONY, Japan) を用いて ALDH⁺細胞と ALDH⁻を選別した。死細胞は 7-aminoactinomycinD (7-AAD) (BD Biosciences, USA) を用いて識別し除外した。

【結果】

HCC1937/p53 細胞をマトリゲル上で 24 時間培養すると VM の特徴である honeycomb

構造が形成された。この構造の 3 次元配列を共焦点顕微鏡で撮影し、得られたスライス画像から Fiji/ImageJ を用いてスタックを作成したところ、honeycomb 構造の架橋領域 (B 領域) に 3 次元構造が確認された。さらに、ddPCR を用いて VM 関連遺伝子である VE-カドヘリン (vascular endothelial-cadherin) および MMP(matrix metalloproteinase)-9 の発現亢進が検出されたことから、今回の honeycomb 構造が真の VM によることを確認した。

免疫蛍光二重染色によって、VM 構造における ALDH1A3 と GATA3 の発現パターンを解析した。癌幹細胞または前駆細胞の特性を有する ALDH1A3⁺細胞は、VM 構造の B 領域に発現し、一方、分化した特性を有する GATA3⁺細胞は集合領域 (A 領域) に局在していた。

癌幹細胞の VM 形成能力は、異なる 2 つの方法で選別した癌幹細胞類似集団を用いて検討した。①ALDEFLUOR キットを用いた FACS による ALDH⁺細胞の分離方法: ALDH⁺細胞集団は 24 時間以内に VM 形成が完了したが、ALDH⁻細胞集団は VM を形成しなかった。②アポトーシス耐性を示す Dox2d 細胞を用いた方法: Control 細胞では 24 時間で VM 形成が完了し、その後、無血清培養条件のために徐々に VM 構造は崩壊した。一方、Dox2d 細胞では Control 細胞よりも早く、6 時間で VM 形成が完了し、その後は Control 細胞と同様に崩壊した。

【考察】

VM の立体構築については、thin gel 培養法を用いてマトリゲル上に VM 構造を誘導し、撮影されたスライス画像からスタック合成画像を作成して評価した。VM 構造における細胞の 3 次元配列は B 領域で顕著であることが明らかになった。この立体配列の差は形態的に VM の形成過程を明らかにする手掛かりになると考えられる。この形態学的特徴に加えて、VM 関連遺伝子の発現が確認されたことから、HCC1937/p53 細胞に VM 形成能力を持つ細胞が含まれていることが示された。

予後不良の炎症性乳癌 (IBC) では、ALDH⁺細胞が癌の侵襲と転移に関与することや、VM 形成率が高いことが報告されている。今回の研究では、我々が使用した HCC1937 細胞も予後不良の TNBC 由来であり、特に、ALDH⁺の割合が高いことが知られている。その中で ALDH⁺細胞は 24 時間以内に VM 形成が可能であることを明らかにし、一方、ALDH⁻細胞はこの能力を欠いていることを示した。この結果は、癌幹細胞様細胞として選別された ALDH⁺細胞の中に VM 形成の開始に必要な細胞を含んでいることを示し、この細胞集団が予後の悪化に関与することを示唆した。

マトリゲル上の免疫蛍光染色では、VM を形成しつつある B 領域に ALDH1A3⁺細胞が局在を示すことから、VM の形成促進において重要な役割を果たしていると推定された。我々が過去に報告した研究結果によると、癌幹細胞の活性化が起こると ALDH1A3 の発現が亢進し、それに続き、前駆細胞として Ki-67 発現を伴う細胞増殖、さらに、GATA3 発現を伴う細胞分化が起こることが明らかになっている。これに今回の結果を当てはめると、活性化された癌幹細胞(ALDH1A3⁺)は最初に B 領域において細胞増殖 (Ki-67⁺) を開始し、さらに

A 領域で GATA3⁺を発現する細胞が分化する過程で、VM 形成につながると考えられる。したがって、今回の結果は、VM 形成の促進において癌幹細胞が重要な役割を担っていることを明らかにし、分子メカニズム的に VM 形成過程を明らかにする手掛かりになると考えられる。




Dox2d 細胞が ALDH⁺細胞に比較してより迅速な VM 形成を示すことには、いくつかの理由が考えられる。1) それぞれ選別した細胞亜集団中の癌幹細胞含有率の違い。Dox2d の p53 耐性細胞の割合は HCC1937/p53 全細胞の 31.05%であり、FACS によって単離された ALDH⁺細胞の割合は 51.77%であったことから、前者の方が VM 形成可能な癌幹細胞をより多く含んでいると考えられる。2) 培養細胞へのストレス。腫瘍環境の低酸素状態や腫瘍細胞への血液供給不足によるストレス条件下で VM が起こり、腫瘍細胞は侵襲性の強い腫瘍タイプになると報告されている。同様に、p53 誘発アポトーシスがストレスとして関与し、このストレスを受けて生き残ることができる Dox2d 細胞は VM を形成する能力を獲得し得ると推測できる。しかし、乳癌において、p53 に関連する TP53INP1 (p53 駆動酸化ストレス応答蛋白質) は VM 形成の阻害に関与することが報告されている。

【結論】

TNBC は他のタイプの乳癌よりも多くの癌幹細胞を含有しており、予後が悪い腫瘍であることが知られている。その原因の一つとして、TNBC における高い VM 形成率が提唱されている。我々の実験において、癌幹細胞は VM 形成の惹起に重要であることが示された。さらに、p53 誘発アポトーシスを免れた TNBC 由来 HCC1937/p53 細胞は癌幹細胞に類似した特性を示し、高い VM 形成能を示した。これらの結果は、TNBC における治療耐性細胞は VM 形成において重要な役割を果たすということを示す最初の実験的エビデンスである。今後、既存の抗血管形成療法が効果的でない場合に、抗 VM 形成療法の開発が腫瘍細胞への血液供給阻害や転移・再発を抑制する新たな治療法になることが期待される。

試問結果の要旨

2019年2月8日

学位申請者	井澤 優希		
審査委員	主査	中西 弘和	
	副査	阿南 節子	
	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し、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。

主査中西から、今回のマトリゲル上での培養は、フラスコ培養において細胞の癌化で観察される重層化 pile up ではないのかという点を質問した。これに対して申請者は、癌化でみられる通常の pile up とは異なる現象であり、in vivo に近い環境であるマトリゲル上の培養による 3 次元構築である血管擬態形成である。フラスコ培養ではこのような構造は形成されないと答えた。さらに、VM 形成は臨床予後と関連があるかという質問に対して、申請者は、顕著な VM 形成を有する乳癌症例では非 VM 症例と比較して血行性再発率が高く、5 年生存率も低い傾向があるという報告があること、さらに卵巣癌患者の組織を解析した論文では、予後と VM 形成さらに癌幹細胞マーカー ALDH1 との相関が報告されていると説明した。副査阿南からは、Ki-67 は臨床に活用できるかという質問がなされた。申請者の説明は、乳癌の intrinsic subtype による分類において、Luminal A 又は B 型の分類では、すでに Ki-67 が指標として使用されている。また、今回の実験からも VM の形成が盛んな B 領域において癌幹細胞マーカー ALDH1A3 と Ki-67 が共発現していた例などから、マーカーを組み合わせることで予後の予測等で使用できる可能性があると考えられることを説明した。副査高橋は、癌細胞集団の細胞に p53 遺伝子を導入した癌細胞をクローンとして単離した後になぜ heterogeneity を示すようになるかという点を尋ねた。申請者の説明は、癌幹細胞様の特性を有する細胞は heterogeneity な階層性を持った癌集団を形成する能力がある。つまり、p53 遺伝子を導入した癌細胞クローンが再び heterogeneity を有する癌細胞集団形成することそのものが、癌幹細胞の存在を証明していると考えられるとした。その他、公開口頭発表会においては、VM 形成は細胞増殖によるものかという質問があり、それに対して申請者は、VM 形成は 24 時間以内で完了するため、細胞周期の点から考えても細胞増殖による形成とは考えにくく、細胞表現型の変化と移動性によって VM 構造が形成されることが考えられることを説明した。さらに、マトリゲルには、様々なタンパク質が含まれていて、VM 形成はそれらの外的要因によって形成が惹起されているのではないかという指摘があった。それに対して申請者は、マトリゲルには様々な因子や腫瘍由来の同定されていないタンパク質も含まれているため、これらが VM 形成に影響を与えている可能性は否めない。しかし、ALDH 陰性細胞では VM 形成を示さないという対照実験結果があることが、外的因子のみでは VM 形成が生じないことを示していると説明した。

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治療抵抗性乳癌における血管擬態形成と癌幹細胞との関係をとらえた研究であり、医療への大いなる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。