

「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 井上 沙奈

学位の名称 博士（薬学）

論文名 再構成されたトリプルネガティブ乳癌細胞集団の浸潤・間葉
転換過程における癌幹細胞様細胞の役割

審査委員 主 査 桑原 淳

副 査 和田 戈虹

副 査 高橋 玲

審査結果 合

博士学位論文審査結果報告書

2023年 1月 31日

| | | |
|-------|-------|---|
| 学位申請者 | 井上 沙奈 | |
| 審査委員 | 主査 | 桑原 淳  |
| | 副査 | 和田 戈虹  |
| | 副査 | 高橋 玲  |

本報告書は、申請者（井上沙奈）の博士論文を審査した結果をまとめたものである。本学大学院薬学研究科医療薬学専攻在学中の申請者から必要書類を添えて論文「再構成されたトリプルネガティブ乳癌細胞集団の浸潤・間葉転換過程における癌幹細胞様細胞の役割」が2023年1月6日提出された。申請者の指導教授（高橋玲）は研究分野の専門性から博士論文審査委員を依頼した（主査：桑原淳教授、副査：和田戈虹教授）。高橋教授も副査として博士論文審査に参加した。本研究科は2023年1月13日に公開で博士論文発表会を開催し、申請者の博士論文に関する発表が約30分、質疑応答が約20分行われた。アポトーシスに耐性のあるトリプルネガティブ乳癌細胞(TNBC)の集団における癌幹細胞の役割を調査した。Doxycyclineでp53発現を誘導できるヒト乳癌細胞集団を作成し、アポトーシスに対する耐性を示す細胞で再構成された細胞集団(RE)を解析した。REは高い浸潤性や移動能力、および上皮間葉移行関連遺伝子の発現を示し、これらの結果は、TNBCが再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムへの解明に寄与するものである。本論文で得られた知見は、医学分野においても重要な意義を持つと考えられる。審査過程を通じて審査委員は申請者の薬学研究科での研究活動がディプロマポリシー（学位授与の方針）の各基準を満たしていることを確認した。そして、提出論文の水準が研究科で定めた「学位論文審査基準」の評価項目を十分に満たすものであることを確認した。




以上のことから、審査委員は全員一致して井上沙奈氏に対して博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。

博士学位論文審査結果要旨

2023年

1月

31日

| | | |
|-------|---|---|
| 学位申請者 | 井上 沙奈 | |
| 審査委員 | 主査 | 桑原 淳  |
| | 副査 | 和田 戈虹  |
| | 副査 | 高橋 玲  |
| 論文題名 | 再構成されたトリプルネガティブ乳癌細胞集団の浸潤・間葉転換過程における癌幹細胞様細胞の役割 | |
| (要旨) | <p>井上沙奈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、結論、論文目録、謝辞、参考文献、図</p> <p>癌細胞は癌幹細胞(CSC)を頂点としたヒエラルキーを構成しており、高い可塑性と自己複製能を備えている。CSC は化学療法や放射線療法に抵抗性を示し、再発や転移・浸潤にも関与することが治療上大きな問題であると考えられている。この論文では、癌幹細胞・前駆細胞・分化細胞および増殖に関連する遺伝子の発現パターンや浸潤能を解析することで、アポトーシス抵抗性を示し再構成されたトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) 細胞集団における CSC の役割を明らかにしている。実験方法として、p53 過剰発現によって誘導されるアポトーシスに耐性を示す細胞が再構成する乳癌細胞集団について、EMT マーカーの発現と Matrigel における浸潤能獲得を解析している。さらに、アポトーシス耐性細胞集団における CSC の役割と EMT を誘導する可塑性を調査している。この論文は、間葉様 CSC を含む乳癌細胞集団が EMT 獲得に関与することを示した最初の報告であり、これらの結果は、TNBC が再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムの解明に手がかりを与えられられる。</p> <p>以上の審査結果から、審査委員は全員一致で、本論文が博士論文の水準に十分達していると結論した。</p> | |

博士学位論文要旨

2023年 1月 6日

学位申請者名 井上 沙奈

論文題目：

再構成されたトリプルネガティブ乳癌細胞集団の浸潤・間葉転換過程における
癌幹細胞様細胞の役割

(要旨)

【背景・目的】

乳癌は、世界中の女性の間で最も頻繁にみられる癌である。癌細胞は癌幹細胞(CSC)を頂点としたヒエラルキーを構成しており、高い可塑性と自己複製能を備えている。CSCは化学療法や放射線療法に抵抗性を示すこと、再発や転移・浸潤に関与することが治療上大きな問題であると考えられている。本研究では癌幹細胞・前駆細胞・分化細胞および増殖に関連する遺伝子の発現パターンや浸潤能を解析することで、アポトーシス抵抗性を示し再構成されたトリプルネガティブ乳癌(TNBC)細胞集団におけるCSCの役割を明らかにすることを目的とする。具体的には、p53の過剰発現によって誘導されるアポトーシスに耐性のある再構成された乳癌細胞集団を作成し、アポトーシス耐性細胞集団は、EMTマーカーの発現とMatrigelにおける浸潤移動によって特徴付けられ、アポトーシス耐性細胞集団におけるBCSCの役割とEMTを誘導する可塑性を調査した。これらは、間葉様CSCを持つ乳がん細胞集団がEMT獲得に関与することを示した最初の報告であり、これらの結果は、TNBCが再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムの解明に手がかりを与える。

【材料・方法】

ヒト乳癌細胞HCC1937はTNBC由来であり、にDoxycycline(Dox)で発現誘導可能なp53遺伝を導入し、Doxを添加しアポトーシスを誘導した。control細胞をUTと名付け、Doxを添加し、細胞数が最小値となる添加5日目でDox無添加培地に換え再び培養し、2~3度継代後、再構築された細胞集団をREと名付けた。UTとREについて、Dox非添加と添加後の生存細胞数を計測した。Fluorescence-activated cell sorting (FACS)によってp53、ALDH1A3、CD44⁺CD24⁻の発現パターンとBrdUによる細胞周期を解析した。そして、二重免疫細胞化学染色によってALDH1A3とKi-67の発現を解析した。さらに、Matrigel invasion assayでは、ギムザ染色または蛍光免疫染色し、細胞の浸潤性を解析した。また、

その細胞から TRIzol で RNA を抽出し、VE-cadherin、MMP-9、Snail それぞれの TaqMan®プローブを用いて RT-PCR 解析を行った。

【結果・考察】




Dox 非添加での UT と RE 生細胞数は、両者差がなく経時的に増加したが、Dox を添加すると、UT はアポトーシスにより経時的に細胞数が漸減したのに対し、RE では漸増した。BrdU を用いた細胞周期の FACS 解析では、UT では Dox 添加後、アポトーシスが進行するにつれて S 期および G2/M 期の細胞数割合が減少したが、RE は Dox 添加しても細胞周期に変化がみられず、Dox 非添加の状態を維持していた。このことは、RE にはより多くのアポトーシス抵抗性の CSC 様細胞が存在することや、CSC 以外の細胞にもアポトーシス抵抗性を示している可能性が示唆される。実際、CSC マーカーとして、ALDH1A3⁺、CD44⁺CD24⁻の細胞数割合を FACS で解析すると、UT に比べて、RE では CSC 様細胞の割合が常に高値を示していた。二重免疫細胞化学染色では、幹細胞、すなわち ALDH1A3⁺Ki-67⁺細胞は、UT では Dox 添加によって一過性に増加するのに対して、RE では、Dox 非添加から Dox 添加後に至るまで高い割合が維持されていた。さらに、RE の CSC 様細胞は、UT のそれよりも長軸/短軸の比が大きい細胞形態を示した。FACS では、RE が CSC 様細胞の割合が高く、ALDH1A3⁺ 上皮系 CSC よりも多くの CD44⁺CD24⁻間葉系 CSC を含むことを示した。そして、癌細胞の浸潤能については、Matrigel invasion assay では、RE の高い浸潤性が示され、さらに、共焦点レーザー顕微鏡の連続スライス画像より観察すると、UT の細胞浸潤は単一細胞のみならず、polygon、complex mesh などの VM (Vasculogenic Mimicry: 血管擬態) 様の構造を示していた。すなわち、UT は三次元細胞集団を形成するのに対し、RE は平面集団で、より高い浸潤能力、および上皮間葉移行関連遺伝子の有意な高発現を示した。この実験結果での再構成細胞集団にみられた変化は、TNBC 細胞が再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムへの解明に手がかりを与える。

結論として、アポトーシス抵抗性乳癌細胞が浸潤性を示す細胞集団を再構成する過程において、CSC 様細胞が深く関与していることを明らかにした。この上皮間葉転換を起こす可塑性は、CSC 様細胞の不均一性 heterogeneity に起因することを見いだした。このことから、上皮様 CSC と間葉様 CSC およびハイブリッド型 CSC の存在が新たな癌細胞集団の特性を決定すると考えられた。TNBC 由来の HCC1937 細胞はハイブリッド型 CSC、EMT 様 CSC を含むヘテロな集団で、しかも、治療を機に EMT を起こしやすい細胞集団になる可能性が示唆された。そのことから、従来の治療法とは異なり、EMT を起こす能力がある間葉様 CSC を標的とした治療法を開発する必要がある。すなわち、我々の実験系では、元々の細胞集団において p53 アポトーシスに抵抗性のある間葉様 CSC を想定した治療法を探索する必要がある。今後は p53 アポトーシス誘導以外のメカニズムすなわち、抗がん剤、放射線治療による集団再構成で生じる治療抵抗性獲得様式を検討する。さらに、この実験系

は Dox の飲水投与によるアポトーシス誘導が可能であるため、動物実験腫瘍移植モデルでの検証を追加する。

試問結果の要旨

2023年 1月 31日

| | | |
|--|-------|---|
| 学位申請者 | 井上 沙奈 | |
| 審査委員 | 主査 | 桑原 淳  |
| | 副査 | 和田 戈虹  |
| | 副査 | 高橋 玲  |
| <p>(要旨)</p> <p>博士論文発表会を公開で実施し、審査委員3名ならびに教員、大学院生、学部生が多数参加し、学位申請者に対する質疑応答が行われた。その結果、研究の独自性、新規性が認められ、申請者が博士の学位を授与されるに十分に値すると判断した。以下、試問の内容をまとめる。</p> <p>質問1 「HCC1937はクローンではなく heterogeneity で、p53 導入実験は heterogeneity の中からセレクションしていると考えていいのか、またそのセレクションしている細胞集団からは、遺伝子変異している可能性は排除されるのか。エピジェネティックな変化の可能性はあるのか。形態学的などでいろいろ見ているが、結局何がアポトーシスを起こしているのか。クローンを取ることができれば、それを遺伝子解析すればよいのではないか。クローニングは不可能なのか。シングルセルで培養すると、分化することにより性質が変わるのか。」</p> <p>回答1 「p53 導入実験は、単細胞からクローニングしている。癌細胞は不安定な状態であるので変異する可能性はあるが、10日間という短期間に集団全体の性質が変わる可能性は排除される。エピジェネティックな変化が短期間に起こる可能性は考えられる。形態学的観察の結果でも、アポトーシス抵抗性を示す RE は heterogeneous な集団のため、細胞の特徴はそれぞれ異なる。そのため、シングルセルの抽出のみでは、アポトーシス抵抗性メカニズムの解明は難しい。」</p> <p>質問2 「他の研究で、Snail の発現は p53 によって抑制される報告がある。RE は p53 活性が低いと仮定するとアポトーシスに対応できており、Snail 発現が上がるなら理解できるが、Dox2d で p53 が誘導されていて Snail 発現も上がるという今回の結果と矛盾している。p53 発現が上がっているということは、耐性獲得のプロセスにおいて p53 反応経路自体に変化が起きているのではないか。」</p> | | |

回答 2 「確かに Snail は p53 によって抑制される報告はあるが、逆に Snail が p53 を分解する報告もあり、p53 と Snail の直接的な相互作用の詳細は不明である。さらに、p53 に関する Snail 以外のパスウェイも考慮する必要がある。今回みられた Snail 発現亢進は、マトリゲル中の一部の細胞での解析結果であり、集団全体の発現パターンとは異なる可能性がある。」

質問 3 「RE が異なる細胞のセレクションによって再構築されたとすれば、その違いを生み出している何らかの遺伝子を特定し、導入して研究を進めてみるとよいのではないか。ALDH 自身の酵素活性と CSC 化の原理について現在わかっていることはあるのか。薬剤の効果も ALDH によって変化があるので、そこと結びつけていければよいと思う。」

回答 3 「UT と RE の遺伝子発現の差から責任遺伝子を特定し導入することは、ご指摘の通り、今後重要な課題と考える。ALDH ファミリーの中の ALDH1A サブタイプは、レチノイン酸合成にも関与しており、レチノイド受容体に結合し、500 を超える遺伝子の転写を調節するため、その中で CSC に特異的な働きを特定するのは困難であるが、レチノイン酸を標的とした直接的または間接的な ALDH 阻害をすることによって、幹細胞特性の喪失、細胞増殖の減少、浸潤、および薬物感作などを起こすという結果が報告されている。」

質問 4 「p53 の発現量が UT, RE で一緒なのか。また、アポトーシス抵抗の有無について比べる意義はどうか。」

回答 4 「RE では、p53 の発現に欠落はなく、UT と同等であることが FACS 及び免疫細胞化学染色で確認されている。また、抗がん剤ではアポトーシス誘導以外の細胞傷害作用を伴うことや、実験環境の安全設定が必要である。一方、p53 発現誘導システムは on, off 調節が容易であることや、アポトーシス以外の細胞傷害作用が少なく、再現性に優れることから今回用いられた。」

質問 5 「WT-p53 を導入して生き残った細胞を解析しているが、癌では p53 変異しているにもかかわらず、わざわざ WT-p53 入れる理由はどうか。p53 変異について調べる必要があるのではないか。」

回答 5 「p53 が欠損している株であることを利用して、アポトーシスを誘導する手段として今回用いた。また、遺伝子を導入する一種の治療モデルとして考えることもできる。人為的にアポトーシスを誘導する実験系を作ることが今回の目的であるので、我々は WT-p53 プラスミドで安定的にトランスフェクトされた HCC1937 を使用し、Tet-On システムにより p53 過剰発現させる方法を用いた。」

質問 6 「TNBC を用いた理由は、元々 CSC に近いものが cell line にあったから使用したのか。cell line 中に CSC は存在し、それを p53 で Enrich したと考えるべきか。heterogeneity で元々あったのを見たのか、あるいは p53 によって新たな集団を作ってしまったのか。」

回答6 「我々が用いた HCC1937 は、CSC を含む比較的未分化な細胞が多く存在するとされる TNBC 由来の細胞株である。p53 過剰発現によるアポトーシスを誘導した後は、生き残った CSC 様細胞の割合がさらに多くなったと考えている。元々 UT に存在していたハイブリッド型、EMT 様 CSC がアポトーシスによって Enrich されて、EMT 様の表現型を持った細胞集団に変化したと考えられる。」

質問7 「UT と RE の性質が異なるのにも関わらず、なぜ RE は UT に戻らないのか？」

回答7 「もう一度何らかの方法でセレクションすると RE が UT に戻る可能性は否定できないが、我々の実験では、数カ月 RE を培養した限り UT に戻ることはなかった。p53 による遺伝子発現制御によって RE を作製したと仮定すると、RE は UT に戻る可能性はあるが、実際には起こらなかったことが、集団再構成において細胞のセレクションが行われたと今回考えた根拠の一つである。実際の癌治療では、抗がん剤治療で生き残って増悪した細胞集団は、元の集団に戻らないことが知られている。」