

## 論文の内容の要旨

論文題目 NF- $\kappa$ B 誘導性細胞間相互作用に基づく乳癌幹細胞維持機構の解明

氏名 山本 瑞生

乳癌は細胞形態およびマーカー発現プロファイルからホルモン受容体を発現する Luminal-like 乳癌、ErbB2 を過剰発現する ErbB2 過剰発現乳癌、ホルモン受容体も ErbB2 の発現も見られない Basal-like 乳癌に大別される。現在、Luminal-like 乳癌治療には卵巣ホルモンの阻害剤やホルモン合成抑制剤などが用いられ、ErbB2 過剰発現乳癌治療には抗 ErbB2 抗体が用いられている。一方で Basal-like 乳癌はこれらの治療標的因子を発現せず、癌細胞そのものの悪性度も高いことから予後が悪い。そこで Basal-like 乳癌における悪性化の機構解析および新規治療標的の探索が求められている。

NF- $\kappa$ B は進化的に高度に保存された転写因子であり、炎症、器官形成、細胞増殖、細胞分化など様々な生命現象に重要な働きをもっている。一方で様々な癌腫において恒常的に活性化してその悪性化を誘導していることが明らかとなっている。私が所属する研究室では、Basal-like 乳癌において Luminal-like 乳癌や ErbB2 過剰発現乳癌に比べて NF- $\kappa$ B 上流のリン酸化酵素である NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK) が高発現し NF- $\kappa$ B 活性化を誘導していることを明らかにした。そこで本研究では①「Basal-like 乳癌における NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) 過剰発現の機構解析」を行った。

また、癌幹細胞は腫瘍内にわずかに存在する新たな腫瘍を形成する能力を持つ細胞であり、乳癌においては 2003 年にその存在が報告された。乳癌幹細胞は強い腫瘍形成能と共に様々なストレスに対する抵抗性も持つことが報告されており、転移や再発などの癌の悪性化にも関与すると考えられている。乳癌幹細胞における NF- $\kappa$ B 活性化の細胞生存および増殖への重要性についてはこれまでに様々なサブタイプ乳癌において報告があるがサブタイプ間での機能の違いや恒常的 NF- $\kappa$ B 活性化との関係については解析されていない。私が所属する研究室では Basal-like 乳癌特異的に恒常的に強い NF- $\kappa$ B 活性化がみられることを明らかにしていたため、サブタイプ間および細胞株毎の NF- $\kappa$ B 恒常的に注目して②「恒常的 NF- $\kappa$ B 活性化による乳癌幹細胞維持機構の解明」を目的として研究を行った。

### 【方法と結果】

Basal-like 乳癌における NIK 高発現を報告した以前の論文では比較対照が 2 種

類の Luminal-like 乳癌細胞株だけであったため、各サブタイプ乳癌細胞株および正常乳腺上皮細胞由来 MCF10A 細胞を合わせて 19 株の細胞株を用いて NIK mRNA 発現を検討した。その結果、Basal-like 乳癌細胞株において顕著に高い NIK mRNA 発現が確認された。そこで Basal-like 乳癌における NIK 高発現の機構解明を目的としてまず、NIK mRNA 安定性に注目して Luminal-like 乳癌および Basal-like 乳癌を比較した。ActinomycinD を用いて新規 mRNA 合成を停止させ残存する NIK mRNA の分解量を経時的に半定量 PCR を用いて計測した結果、両サブタイプ乳癌は同程度の NIK mRNA 分解速度を示した。次に Basal-like 乳癌 MB231 細胞および Luminal-like 乳癌 MCF7 細胞を各サブタイプの代表として選び、NIK プロモーター領域の転写活性をレポーターアッセイで検討した。その結果、両細胞において NIK 転写開始点から -25~-71 および -117~-184 の領域に転写活性を誘導する領域が存在することが分かったが、細胞株間の NIK 発現量の差を説明するような結果は得られなかった。外部からレポーター遺伝子を導入するレポーターアッセイではゲノム上のクロマチン構造が正確には再現されていないと考え、次にプロモーター領域のエピジェネティックな修飾によって Luminal-like 乳癌では転写が阻害されている可能性を検討した。DNA メチル基転位酵素およびヒストンメチル基転位酵素を阻害する 5-azacytidin を処理したところ、Luminal-like 乳癌特異的に NIK 発現亢進が見られた。しかし MCF7 細胞において NIK プロモーター領域の CpG メチル化は検出されなかったためこの作用はヒストンメチル基転位酵素の阻害によるものと考えられた。一方、MCF7 細胞では NIK プロモーター領域におけるアセチル化ヒストン量が有意に少ないことが分かったため、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害する VPA 処理を処理したところ MCF7 細胞において NIK 発現が亢進し、NF- $\kappa$ B 活性化が誘導されることが分かった。臨床検体のデータ解析から、細胞株だけでなく臨床検体においても Basal-like 乳癌において NIK が高発現していることが分かった。以上から NIK はエピジェネティックな発現抑制機構によって正常細胞や Luminal-like 乳癌細胞では発現が抑制されているが、Basal-like 乳癌の癌化に伴って抑制機構が破綻して発現亢進する可能性が示唆された。

次に、乳癌幹細胞に与える NF- $\kappa$ B 活性化の影響の検討について述べる。まず最初に 12 種類の様々なサブタイプの乳癌について乳癌幹細胞マーカー発現と恒常的 NF- $\kappa$ B 活性化の関係を調べた。その結果、Basal-like 乳癌においてのみ恒常的 NF- $\kappa$ B 活性化強度と乳癌幹細胞画分の割合の間に正の相関が見られた。さらに、レトロウイルスベクターを用いて Basal-like 乳癌細胞の NF- $\kappa$ B 活性化を調節すると乳癌幹細胞画分の割合も変化することが分かった。この機構を調べるため、バルクの乳癌細胞と乳癌幹細胞とを FACS で分離し NF- $\kappa$ B 活性化を比較した結果、両画分は同程度の NF- $\kappa$ B 活性化を示すことが分かった。そこで

NF- $\kappa$ B 活性化がパラクラインに働いて乳癌幹細胞画分の割合を調節する可能性を考えて、NF- $\kappa$ B 活性化を調節した細胞と GFP でラベルした細胞を共培養し、GFP ラベル細胞側の乳癌幹細胞画分の割合を検討した。その結果、経時的に GFP ラベル細胞側の乳癌幹細胞画分が共培養する細胞の NF- $\kappa$ B 活性化に応じて変化することが分かり、さらにトランズウェルチャンバーを用いた解析から細胞間接触の重要性が明らかになった。そこで Notch シグナルに注目し下流因子を探索した結果 Basal-like 乳癌特異的に NF- $\kappa$ B 活性化によって Jag1 が発現することが分かった。さらに、shRNA による Jag1 発現抑制や  $\gamma$ -secretase 処理による Notch シグナル抑制により NF- $\kappa$ B 誘導性の乳癌幹細胞画分増加が減弱することが分かり、腫瘍全体における NF- $\kappa$ B 活性化が Jag1 発現を介して乳癌幹細胞の Notch シグナル活性化を誘導する「乳癌幹細胞の維持・増殖に適した環境形成能力」を持つことが分かった。一方で、乳癌組織には癌細胞以外に様々な正常細胞が存在することが知られている。そこで正常細胞における NF- $\kappa$ B 活性化の Jag1 発現への影響を検討した。その結果、マクロファージや繊維芽細胞において NF- $\kappa$ B 活性化依存的に Jag1 発現が誘導されることが分かった。また卵巣ホルモンの誘導體である MPA をマウスに処理したところ、正常乳腺上皮細胞のうち Basal 細胞で Jag1 発現亢進が見られた。同時に Luminal 細胞で RANKL 発現の亢進が見られたため RANKL による Basal 細胞の NF- $\kappa$ B 活性化が Jag1 を誘導した可能性が示唆された。以上の結果から炎症や妊娠時に見られる正常細胞の NF- $\kappa$ B 活性化が乳癌幹細胞の維持・増殖に適した環境を形成する可能性があることが分かった。最後に、乳癌幹細胞による癌悪性化の表現型の一つと考えられる転移について Jag1 発現の影響を検討した結果、Basal-like 乳癌特異的に原発巣の Jag1 発現と転移率が相関することが分かった。以上より、NF- $\kappa$ B -Jag1-Notch シグナルが Basal-like 乳癌特異的に存在し乳癌幹細胞の増殖・維持に適した腫瘍内環境を形成して癌の悪性化を誘導していることが示唆された。

### 【考察】

前半の NIK 発現機構解析から、エピゲノムの異常による NIK mRNA の発現亢進が Basal-like 乳癌における非古典的 NF- $\kappa$ B 活性化を誘導している可能性が示唆された。しかしタンパクレベルでの NIK 発現が極めて低く、乳癌サブタイプ間での発現量の比較が出来ていない。今後は免疫沈降法によるタンパク濃縮法などを用いてタンパクレベルでの NIK の発現解析を行う必要がある。

後半の NF- $\kappa$ B 活性化による乳癌幹細胞維持機構の解析から、NF- $\kappa$ B 阻害剤と同様に Notch 阻害剤が Basal-like 乳癌の乳癌幹細胞を標的とした治療に応用できる可能性が考えられた。また癌細胞だけでなく正常細胞を含む腫瘍全体の NF- $\kappa$ B 活性化が腫瘍内環境を調節して乳癌幹細胞を維持する可能性が示唆され

た。現在までの乳癌幹細胞研究は乳癌幹細胞におけるシグナル伝達解析が主であったが、今後さらにこの様な乳癌幹細胞と周囲の細胞との関わりについて研究が進むことで乳癌の根治に向けた治療法の開発が進むと考えられる。