

審査の結果の要旨

氏名 山本 瑞生

本研究は悪性度が高く有効な治療標的分子の無い **Basal-like** 乳癌の悪性化機構の解析を目的として、**Basal-like** 乳癌特異的に恒常的活性化が見られる転写因子 **NF- $\kappa$ B** の活性化機構の解析、および **NF- $\kappa$ B** 下流における乳癌幹細胞維持機構の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. **Basal-like** 乳癌では **Luminal-like** 乳癌、**ErbB2** 過剰発現乳癌や正常乳腺上皮細胞株と比較して非古典的 **NF- $\kappa$ B** 活性化に重要な **NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK)** の mRNA 発現が亢進していることが分かった。種々の検討からサブタイプ間における **NIK mRNA** の安定性、**NIK** プロモーター活性およびプロモーター領域の **CpG** メチル化は発現亢進に関与しないことが分かった。一方で **NIK** プロモーター領域のヒストンアセチル化が **Basal-like** 乳癌では亢進しており、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である **Varproic acid** によって **Luminal-like** 乳癌では低く抑えられていた **NIK** 発現が亢進し非古典的 **NF- $\kappa$ B** 活性化が誘導されることが示された。
2. 臨床検体における **NIK mRNA** 発現を、公開されている乳癌マイクロアレイデータを用いて解析したところ、散発的 **Basal-like** 乳癌だけでなく **BRCA1** 変異による家族性 **Basal-like** 乳癌の検体においても他のサブタイプの乳癌に比べて有意な **NIK** 発現亢進を認めた。
3. 転写因子 **NF- $\kappa$ B** の乳癌幹細胞維持機構への関与を乳癌サブタイプおよび恒常的 **NF- $\kappa$ B** 活性化の強度に注目して解析した結果、**Basal-like** 乳癌細胞株において恒常的 **NF- $\kappa$ B** 活性化の強度と **CD24<sup>low</sup>**, **CD44<sup>high</sup>**, **EpCAM<sup>positive</sup>** 乳癌幹細胞画分の存在割合が正の相関を示すことが分かった。
4. レトロウイルスベクターを用いて **NF- $\kappa$ B** 活性化を抑制する **Super repressor I $\kappa$ B $\alpha$**  および **NF- $\kappa$ B** を強く活性化させる恒常的活性化 **IKK $\beta$**  を発現させて表面抗原の発現、スフィア形成能および免疫不全マウスにおける造腫瘍能を検討した結果、恒常的および誘導性の **NF- $\kappa$ B** 活性化が乳癌幹細胞の割合を増加させることが示された。さらに、**NF- $\kappa$ B** 活性化を調節した細胞と **GFP** ラベルした細胞との共培養実験から、この作用にはパラクラインに働く **NF- $\kappa$ B** 下流因子の関与が示唆された。
5. 35 種の乳癌細胞株マイクロアレイデータにおける恒常的 **NF- $\kappa$ B** 活性化と遺伝子発現の相関を指標としてこの **NF- $\kappa$ B** 下流因子の探索を試み、**Notch** シグナルのリガンド

である **Jag1** が **NF-κB** 活性化と正の相関を持って発現していることが示された。実際に **NF-κB** 活性化を調節した細胞における発現解析を行ったところ **Notch** リガンドの中で **Jag1** のみが **NF-κB** によって誘導されることが示された。さらに **Jag1** を過剰発現させることで乳癌幹細胞の割合が増加し、逆に **Jag1** 特異的な **shRNA** の導入によって発現を抑制することで **NF-κB** 誘導性の乳癌幹細胞の割合の増加が抑制されることが示された。

6. 乳癌細胞だけでなく、乳腺腫瘍中に存在することが知られているマクロファージや繊維芽細胞および乳腺上皮細胞においても **NF-κB** 活性化によって **Jag1** が誘導されることが示された。公開されている乳癌臨床検体のマイクロアレイデータを用いた乳癌サブタイプ別の解析から、**Basal-like** 乳癌特異的に、原発巣における **Jag1** 高発現群では低発現群に比べて有意に無転移生存率が低いことが示された。

以上、本論文は **Basal-like** 乳癌細胞における恒常的 **NF-κB** 活性化の原因がエピゲノム異常による **NIK** の発現亢進によること、および恒常的 **NF-κB** 活性化の下流では **Jag1** を介した細胞間相互作用によって乳癌幹細胞が維持されることを明らかにした。本研究はこれまで有効な治療標的の無い **Basal-like** 乳癌の悪性化における **NF-κB** 活性化の重要性を示した点で重要であり、**NF-κB** を標的とした新規治療法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。