

博士論文

増殖因子 GDF15 による乳がん幹細胞様細胞の  
維持機構の解析

笹原 麻子

## 目次

要旨.....	1
1. 序文.....	2
1.1. 乳がんとがん幹細胞.....	2
1.2. TGF $\beta$ ファミリーの役割.....	5
1.3. GDF15 の役割.....	7
1.4. 本研究の目的.....	8
2. 方法.....	9
2.1. 細胞株と培養条件.....	9
2.2. 臨床検体の培養.....	9
2.3. スフィアアッセイ.....	9
2.4. 細胞増殖アッセイ (MTS assay).....	10
2.5. 細胞周期解析.....	11
2.6. 定量リアルタイム PCR 解析.....	12
2.7. ウェスタンブロッティング.....	12
2.8. サイトカインアレイ解析.....	13
2.9. 免疫染色と評価方法.....	15
2.10. 本研究の解析の流れ.....	16
2.11. 統計学的解析.....	17
2.12. 倫理.....	18
3. 結果.....	19
3.1. GDF15 は乳がんにおいて TGF $\beta$ に比べ有意にスフィア形成能を促進する.....	19
3.2. TGF $\beta$ シグナル伝達の標準的経路である Smad 経路はスフィア形成に関与していない.....	26
3.3. 長期の ERK1/2 活性化がスフィア形成に関与している.....	29
3.4. GDF15 は GDF15 そのものの発現を上昇させる.....	33
3.5. GDF15 はがん細胞で不均一に発現している.....	37
4. 考察.....	42
5. 結語.....	50

## 要旨

がん幹細胞は腫瘍の増殖、再発や標準的ながん治療への抵抗に深くかかわっていると考えられているが、がん幹細胞が腫瘍組織の中でどのように存在し、がん幹細胞性を維持しているのかは解明されていない部分が多い。本論文では TGF  $\beta$  family の一員である growth differentiation factor 15 (GDF15)に着目し、乳がんの細胞株及び臨床検体を用いてがん幹細胞の活性化の指標となるスフィア形成能解析やそれに関わるシグナル伝達経路を解析した。結果、GDF15 が自己分泌及び傍分泌により、ERK1/2 の活性化を介して GDF15 そのものの発現を増幅し乳がん幹細胞の維持に関与している可能性が示唆された。

## 1. 序文

### 1.1. 乳がんとがん幹細胞

乳がんは女性において罹患数の多い腫瘍であり、死亡率も高い[1]。乳がんは腫瘍の病理組織像から、luminal A、luminal B HER2 陰性、luminal B HER2 陽性、HER2 タイプ、triple negative の 5 つのサブタイプに分類される[2-6]。Luminal A および luminal B はホルモン受容体（エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体）陽性であり、luminal B HER2 陽性タイプや HER2 タイプは HER2 が過剰発現している。Triple negative タイプは、ホルモン受容体も HER2 も陰性である。近年の医療技術や研究の進歩により、乳がん診療は大きな発展を遂げており、現在の乳がん治療には手術療法その他、化学療法、内分泌療法、分子標的療法などの全身療法があり、奏効率も比較的高いとされている。治療法は前述のサブタイプおよび個々のリスクを検討し決定される（表 1）。現在の標準的治療のうち、分子標的療法は比較的新しい治療戦略であり、現在も新たな標的分子の研究が盛んにおこなわれている。HER2 過剰発現症例に対する抗 HER2 療法も分子標的療法の一つであり、多くの適応症例で一定の効果を発揮するものの、転移や再発を来すことも少なくない[7]。

サブタイプ	病理学的特徴	推奨される薬物療法
Luminal A	ホルモン受容体陽性 HER2 陰性 Ki-67 低値	内分泌療法
Luminal B HER2(-)	ホルモン受容体陽性 HER2 陰性 Ki-67 高値	内分泌療法±化学療法
Luminal B HER2(+)	ホルモン受容体陽性 HER2 陽性 Ki-67 低～高値	内分泌療法＋抗 HER2 療法 ＋化学療法
HER2 タイプ	ホルモン受容体陰性 HER2 陽性	抗 HER2 療法＋化学療法
triple negative	ホルモン受容体陰性 HER2 陰性	化学療法

表 1 サブタイプ別の推奨される薬物治療

Ki-67：細胞周期関連核タンパク質。細胞増殖および細胞周期のマーカーとして用いられ、Ki-67 高値＝高増殖能と判断する。

近年の研究により、がん幹細胞が腫瘍の増殖、再発、標準的がん治療への抵抗性に深く関与している可能性が示唆されてきており[8]、がん幹細胞に対する標的治療が乳がん診療においても求められてきている。がん組織は様々な細胞から構成され、正常組織同様、がん幹細胞とそこから分化した細胞による階層的な組織になっていると考えられている[8-12]。がん幹細胞がどのように腫瘍組織の中で維持されているかは解明されていない部分が多く、がん幹細胞の維持機構を解明することが、がん幹細胞を標的とした治療を確立するためには必要不可

欠であると考えられる。がん幹細胞は腫瘍組織の中で、自己複製能を有する特異的な細胞であり、様々な固形がんにおいてその存在が認められており、乳がんにおいても乳がん幹細胞の存在が示唆されている[10, 13]。In vitro でがん幹細胞の特性を確認する実験の一つとして、非接着培養系を用いたスフィア形成能の測定がある[14, 15]。スフィアとは、非接着培養系において、EGF と bFGF を含んだ無血清培地である sphere culture medium(SCM)で培養した際に形成される浮遊細胞集塊のことを指し、上皮細胞は非接着培養系では増殖することなく死滅する。一方、がん幹細胞様の特性を持った細胞は非接着培養条件下でも生存し、増殖すると考えられている。我々の研究室ではこれまでに、heregulin(HRG)や IGF2 の単独刺激で腫瘍のスフィア形成能を促進することを見出している[16, 17]。スフィア形成能の促進という特性は、その分子ががん幹細胞様細胞の維持に深くかかわっていることを示唆するものであり、HRG や IGF2 の他にも、同様の特性を有する分子がないかを探ることは有用なことだと考えられた。当研究室では過去に DNA microarray を行い HRG 刺激によって上昇してくる遺伝子を網羅的に解析しており[18]、今回、その中で増殖因子にターゲットを絞り、複数の増殖因子を用いてスフィアアッセイを行った。その中で、TGF $\beta$ ファミリーに属する GDF15 がスフィア形成を促進したため、この分子に着目し、GDF15 による乳がん幹細胞様細胞への関わりについて検討することとした。

## 1.2. TGF $\beta$ ファミリーの役割

TGF $\beta$  ファミリーは多様な作用を持つ増殖因子の集まりで、このファミリーには TGF $\beta$  や growth differentiation factor (GDFs) を含む 33 のサイトカインが含まれている [19-21]。これらのサイトカインは細胞増殖や遊走、分化、アポトーシスなど、様々な生物学的機能の制御に関与している。TGF $\beta$  ファミリーのサイトカインは、細胞表面の TGF $\beta$  受容体 II に結合することで TGF $\beta$  受容体 I との複合体形成を成立させ、これにより TGF $\beta$  受容体 I は自身の持つセリンスレオニンキナーゼを活性化させ、細胞内シグナル伝達タンパクである Smad2/3 をリン酸化させる。リン酸化された Smad2/3 は Smad4 と複合体を形成し、この活性化した複合体が核内に移行して転写が開始される (図 1)。遺伝子調節機構における Smad 伝達経路は TGF $\beta$  ファミリーの標準的な経路とされているが [20-22]、様々な遺伝子の発現において、TGF $\beta$  ファミリーはそれぞれの細胞環境に依存して Smad 依存性経路のみならず、その他の Smad 非依存性経路の活性化も介し、そのシグナル伝達は非常に複雑である [19, 21]。

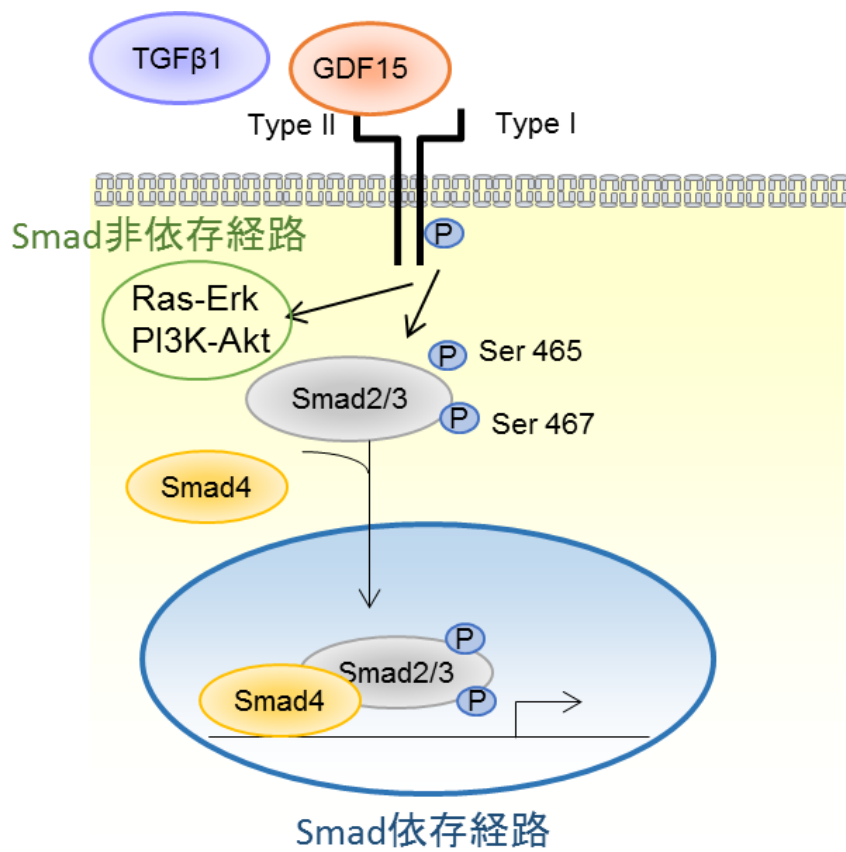


図 1 標準的な TGFβファミリーの伝達経路のモデル図



### 1.3. GDF15 の役割

Growth differentiation factor 15 (GDF15)はMIC-1、PTGF- $\beta$ 、PDF、PLAB、PL74、NAG-1とも呼ばれ、前述のTGF $\beta$ ファミリーに属している[23-25]。通常、生体内において、GDF15を多く発現しているのは胎盤のみであるが、外傷や炎症、あるいは担がん状態になると、マクロファージや上皮細胞、線維芽細胞など、様々な細胞でGDF15の発現が上昇することが知られている[23, 26]。

GDF15の機能は幅広く、例えば担がん状態により引き起こされる食思不振や悪液質が血清GDF15の上昇によるという報告もある[27]。GDF15のがんに対する作用として、「GDF15が細胞周期を停止させ、アポトーシスを誘導することで腫瘍に対し抑制的に働く」という報告が散見される一方で[23, 28-30]、

「GDF15には腫瘍形成を促進する働きがある」と示唆する研究も多く、現在は後者の考え方が主流となってきている[23, 27, 29, 31]。また、血清および腫瘍組織のGDF15高発現が予後不良を予測するバイオマーカーとなりうるといった研究報告もされている[29]。こういった、がんに関わる研究が多数報告される一方で、多くのがん種において、GDF15が「がん幹細胞」を制御する可能性についてはほとんど知られていない。さらに、GDF15がどういったシグナル伝達経路を介して生物学的機能を発揮しているのかも未だはっきりとは解明されていない。

#### 1.4. 本研究の目的

GDF15 が乳がん幹細胞の維持に関与しているとするれば、そのメカニズムを解明し GDF15 を標的とした治療法が確立されれば、乳がん診療における新たな治療戦略となると考えられた。そこで、本研究では「GDF15 が乳がん幹細胞様細胞の維持に関与している」という仮説のもと、GDF15 の乳がん幹細胞様細胞に対する機能について検討した。

さらに、これまで GDF15 のシグナル伝達経路として Smad 依存経路の活性化[31]や AKT、ERK1/2 の活性化[27, 29, 32-35]などの報告があるが、いまだに解明されていない点が多く、今回 GDF15 が乳がん幹細胞様細胞の機能を維持する際に関与するシグナル伝達経路を解析することを 2 番目の目的とした。

そして実際の臨床への応用にあたり、GDF15 が臨床の乳がん組織でどの程度発現しているかを、免疫染色を用いて検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞株と培養条件

乳がん細胞株の MCF7、T47D、BT20、MDA-MB-436、BT474 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入し、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿環境下で培養した。

培養試薬は 10% fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences) と 1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した RPMI 1640 (Nacalai Tesque) を使用した。

### 2.2. 臨床検体の培養

培養に用いた臨床の乳がん組織は東京大学医学部附属病院（文京区）、南町田病院（町田市）、公立昭和病院（小平市）より提供していただいた。手術中に採取された組織は 1% の penicillin-streptomycin を添加した Dalbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco) で 4°C に保ちながら運搬し、当日のうちに処理[16]しヒト初代培養がん細胞にし、1% の penicillin-streptomycin を添加した EpiCult™-B (Stemcell Technologies) で培養した。

### 2.3. スフィアアッセイ

スフィアアッセイは所属研究室の過去の論文[16]に従って行った。概要としては、

24well の非接着プレートに、細胞株は 1,000~2,500cells/well、臨床検体は 5,000cells/well を単細胞にして播種した。スフィアは増殖因子を含んだ無血清培地である sphere culture medium (SCM: 20ng/ml の epidermal growth factor (EGF; Millipore)、20ng/ml の basic fibroblast growth factor (bFGF; PeproTech) と B27 (Thermo Fisher) と heparin (Stem Cell Technologies) を添加した penicillin-streptomycin 入りの DMEM/F-12 溶液)、または DMEM/F-12 溶液に 200ng/ml の recombinant human GDF15 (R&D Systems Inc.) もしくは 200ng/ml の recombinant human TGF $\beta$  (R&D Systems Inc.) を添加した溶液で培養した。さらに、阻害剤を用いたスフィアアッセイでは上記に加え、SB431542 (Selleckchem) または U0126 (Cell Signaling) を添加した。リガンド及び阻害剤は 2 日に 1 回の頻度で再度添加した。スフィアの形成状況に応じ、播種から 4-7 日で集計を行い、スフィアの直径が 75 $\mu$ m 以上のものをスフィアとしてカウントし、もともとの播種数で割ることでスフィア形成効率として算出し、グラフ化した。

#### **2.4. 細胞増殖アッセイ (MTS assay)**

1.0 $\times$ 10<sup>3</sup> 個の細胞を 96well の接着プレートに播種し、前述の (2.1. で記載) 細胞株の培養条件で 1 日培養したのちに、0.5% FBS を添加した RPMI 1640 でさら

に 12 時間血清飢餓培養を行った。その後、GDF15 (200ng/ml) または TGF  $\beta$  (200ng/ml) を添加し、さらに 3-5 日間培養した。Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) を用いてプロトコルに従い比色定量し、グラフ化した。

## 2.5. 細胞周期解析

細胞は 35mm の接着培地で前述の (2.1. で記載) 細胞株の培養条件で 1 日培養し、さらに 0.5% FBS を添加した RPMI 1640 で 12 時間血清飢餓培養を行うことで細胞周期を揃えた。GDF15(200ng/ml) を添加し 50 時間後に回収した。なお、U0126 投与条件では GDF15 投与の 1 時間前に U0126 を添加している。回収した細胞は phosphate buffered saline (PBS; Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、4°C の 70% ethanol (Wako) 10ml を投与し -20°C で over night して固定した。その後、再度 PBS にて 2 度洗浄し、0.25mg/ml RNase A (Nacalai Tesque) 溶液 0.5ml を投与し 37°C で 30 分間インキュベートした。さらに、5 $\mu$ l の propidium iodide staining solution (PI; BD Biosciences) を加え、4°C で 30 分暗所に静置し、40 $\mu$ m のナイロンメッシュに通した後にフローサイトメトリーで解析した。

## 2.6. 定量リアルタイム PCR 解析

細胞は接着培地で前述の（2.1.で記載）細胞株の培養条件で培養し、GDF15(200ng/ml)投与の前日に血清飢餓培養した。U0126 投与条件では GDF15 投与の 1 時間前に U0126 を添加している。さらに、anti-GDF15 (R&D systems) を投与した実験では、GDF15 を中和するために、GDF15 投与から 24 時間後に培地交換せずに anti-GDF15 を投与している。それぞれ、図に明記してある時間に RNeasy Micro kit (Qiagen)を用いてトータル RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)を用いて cDNA へと転写した。Taqman probes (Applied Biosystems)を用いて定量リアルタイム PCR 解析を行った。

## 2.7. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは標準手順で行った[17]。概要としては、細胞は接着プレートで前述の（2.1.で記載）細胞株の培養条件で培養し、GDF15(200ng/ml)および TGF  $\beta$  (200ng/ml)投与の前日に血清飢餓培養した。阻害剤を用いた実験では GDF15 および TGF  $\beta$  投与の 1 時間前に SB431542 または U0216 を添加した。Phosphatase inhibitor (Nacalai Tesque)と EDTA-free protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を加えた RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific) を

用いてそれぞれ、図に明記してある時間にタンパクを回収した。回収したタンパクは Prostate Protein Quantification Kit (Active Motif) を用いて定量した。1次抗体として使用した Smad2、p-Smad2、ERK1/2、p-ERK1/2、Oct4、Sox2、Nanog 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。2次抗体として用いた、horseradish peroxidase (HRP)標識抗マウス、抗ウサギ抗体は GE Healthcare より購入した。化学発光は LAS 4000 mini (Fujifilm)を用いて検出した。

## 2.8. サイトカインアレイ解析

細胞は接着培地で前述の (2.1. で記載) 細胞株の培養条件で培養し、GDF15(200ng/ml)および TGF $\beta$  (200ng/ml)投与の前日に血清飢餓培養した。細胞は 10 $\mu$ g/ml の Aprotinin (Sigma)と 10 $\mu$ g/ml の Leupeptin (Tocris)と 10 $\mu$ g/ml の Pepstatin (Tocris)を 添加した Lysis Buffer 17 (R&D Systems)を用いて溶解し、回収した。R&D Systems より購入した Human XL Cytokine Array Kit (Proteome Profiler<sup>TM</sup> Array)を用いて、添付のプロトコルに従いサイトカインアレイ解析を実施した。このキットでは以下 (表 2) の 102 サイトカインを検出できる。化学発光は LAS 4000 mini (Fujifilm)を用いて検出した。

Adiponectin	Aggrecan	Angiogenin
Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	BAFF
BDNF	Complement Component C5/C5a	Chitinase 3-like 1
Complement Factor D	CD14	CD30
CD40 ligand	C-Reactive Protein	Cripto-1
Cystatin C	Dkk-1	DPPIV
EGF	EMMPRIN	ENA-78
Endoglin	Fas Ligand	FGF basic
FGF-7	FGF-19	Flt-3 Ligand
G-CSF	GDF-15	GM-CSF
GRO- $\alpha$	Growth Hormone	HGF
ICAM-1	IFN- $\gamma$	IGFBP-2
IGFBP-3	IL-1 $\alpha$	IL-18
IL-1ra	IL-2	IL-3
IL-4	IL-5	IL-6
IL-8	IL-10	IL-11
IL-12 p70	IL-13	IL-15
IL-16	IL-22	IL-23
IL-24	IL-27	IL-31
IL-32 $\alpha/\beta/\gamma$	IL-33	IL-34
IP-10	I-TAC	Kallikrein
Leptin	LIF	Lipocalin-2
MCP-1	MCP-3	M-CSF
MIF	MIG	MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$
MIP-3 $\alpha$	MIP-3 $\beta$	MMP-9
Myeloperoxidase	Osteopontin	PDGF-AA
PDGF-AB/BB	Pentraxin-3	PF4
RAGE	RANTES	RBP4
Relaxin-2	Resistin	SDF-1 $\alpha$
Serpin E1	SHBG	ST2
TARC	TFF3	TfR
TGF- $\alpha$	Thrombospondin-1	TNF-alpha
uPAR	VEGF	Vitamin D BP

表 2 Human XL Cytokine Array Kit (Proteome Profiler™ Array)で検出可能なサイトカイン一覧。

アルファベット順に記載



## 2.9. 免疫染色と評価方法

細胞は接着プレートで前述の（2.1.で記載）細胞株の培養条件で培養し、PBS (Nacalai Tesque) で洗浄した後に培地を scrape して細胞を回収した。遠心分離し、Mildform (Wako)を用いて細胞を固定しパラフィンブロックを作成し、4 $\mu$ m の切片を作成した。切片を脱パラフィン化し、anti-GDF15 antibody (polyclonal, 1:200, Atlas Antibodies)でインキュベートした。臨床の乳がん検体は金沢医科大学病院より提供していただいた。10%のホルマリンで固定した各腫瘍のパラフィンブロックより 4 $\mu$ m の切片を作成し、脱パラフィン化の後に Bond-Max autostainer (Leica Microsystems)をプロトコルに従って使用し染色した。抗原賦活化は pH9、100 $^{\circ}$ Cで 20 分間、Epitope Retrieval 2 solution (Leica)を用いて行った。その後、anti-GDF15 antibody (polyclonal, 1:200)で 15 分間インキュベートした。検出には Leica 社の Bond-Max avidin-biotin-free polymer system を用いた。発色基質には diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)を用いた。その後、ヘマトキシリンを用いて核染色した。撮影には Olympus 社の DP25 を用いた。GDF15 陽性細胞のカウントは金沢医科大学の病理医により盲検的に行われた。

## 2.10. 本研究の解析の流れ

本研究では「GDF15 が乳がん幹細胞様細胞の維持に関与する」という仮説のもとに、まず複数の乳がん細胞株 (2.1. で記載) 及びヒト初代培養がん細胞 (2.2. で記載) を用いて GDF15 刺激によるスフィアアッセイ (2.3. で記載)、ウェスタンブロッティングによる未分化マーカーの発現解析 (2.7. で記載)、細胞増殖アッセイ (2.4. で記載) を実施して GDF15 の乳がん幹細胞に対する機能を評価した。その後、乳がん幹細胞様細胞の維持に関わるシグナル伝達経路を解明する目的で、ウェスタンブロッティングによる p-Smad2、p-ERK1/2 の発現解析 (2.7. で記載) 及び阻害剤を用いたスフィアアッセイ (2.3. で記載)、細胞周期解析 (2.5. で記載) を行い、このシグナル伝達経路に何らかのサイトカインが介在すると予測し、サイトカインアレイ (2.8. で記載)、阻害剤、中和抗体を用いた qRT-PCR (2.6. で記載) を行った。これらの外因性の GDF15 刺激による作用解析の他に、内因性の GDF15 の発現を調べる目的で、Oncomine データベースの解析と細胞株や臨床の乳がん組織を用いた免疫染色 (2.9. で記載) を行った。(図 2)

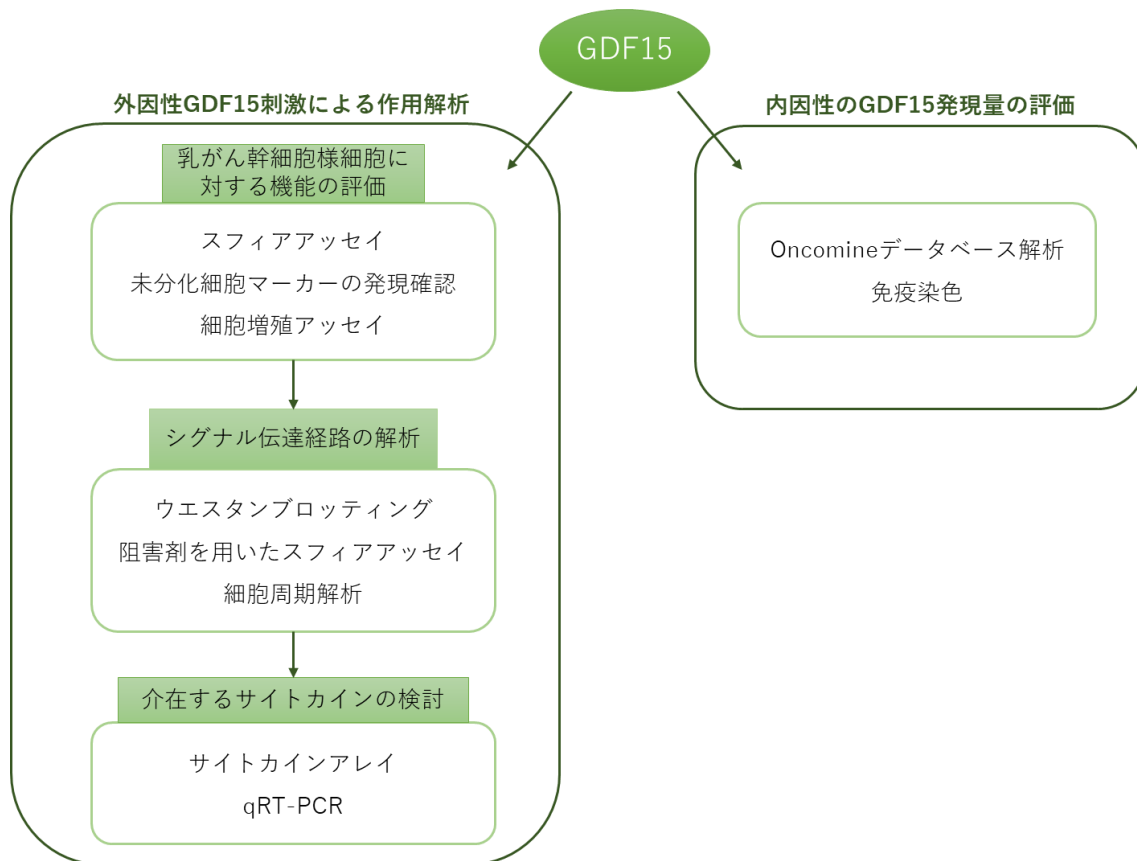


図2 本研究の解析の流れのフローチャート

## 2.11. 統計学的解析

2つのサンプル間の比較には対応のない t 検定を用いた。スフィア形成能の比較には対応のある両側 t 検定を用いた。免疫染色による各サブタイプの GDF15 染色の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。各値は mean±SD で表示している。p<0.01-0.05(\*), p<0.001-0.01(\*\*), p<0.0001(\*\*\*)を有意とみなした。いずれも Excel を使用して解析した。

## 2.12. 倫理

本研究は東京大学医科学研究所、東京大学医学部附属病院、南町田病院、公立昭和病院、金沢医科大学、金沢大学の倫理審査委員会により承認されており、研究に参加した方々の同意は研究に関わる前に書面にて取得している。(承認番号 24-29-1207)

### 3. 結果

#### 3.1. GDF15 は乳がんにおいて TGF $\beta$ に比べ有意にスフィア形成能を促進する

GDF15 が、がん幹細胞様細胞に対して何らかの機能を有しているかを調べるため、まず複数の乳がん細胞株を用いてがん幹細胞様細胞の特性であるスフィア形成能を測定した。結果、GDF15 はそれぞれのサブタイプを代表する細胞株 (luminal type の MCF7、HER2 陽性タイプの BT474、basal type の BT20) で有意にスフィア形成を促進した (図 3、4)。対照的に、TGF $\beta$  は BT474、BT20 を用いたスフィアアッセイではスフィア形成を全く促進せず、MCF7 でのスフィアアッセイにおいても、コントロールに比べ有意にはスフィア形成を促進しなかった。この結果を踏まえ、GDF15 が特異的にスフィア形成を促進する点に焦点を置き、さらに別の乳がん細胞株 (luminal type の T47D、basal type の MDA-MB-436; MM436) を用いてスフィアアッセイを行った。結果、前述の細胞株同様、T47D、MM436 でも GDF15 は有意にスフィア形成を促進した (図 5)。

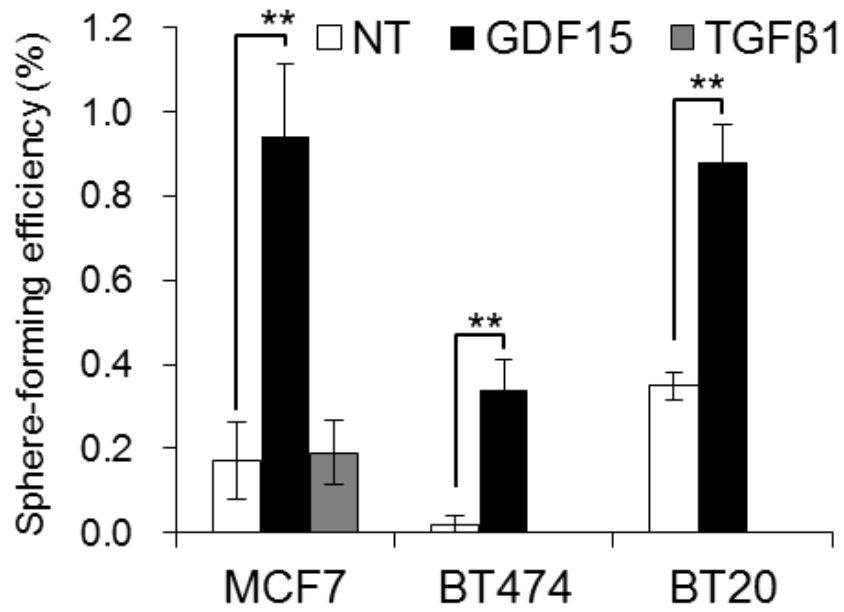


図3 乳がん細胞株を用いたスフィアアッセイの結果

各細胞株に GDF15(200ng/ml)または TGFβ (200ng/ml)を添加したスフィアアッセイ。NT : not treated。n=4。 \*\*P < 0.01。

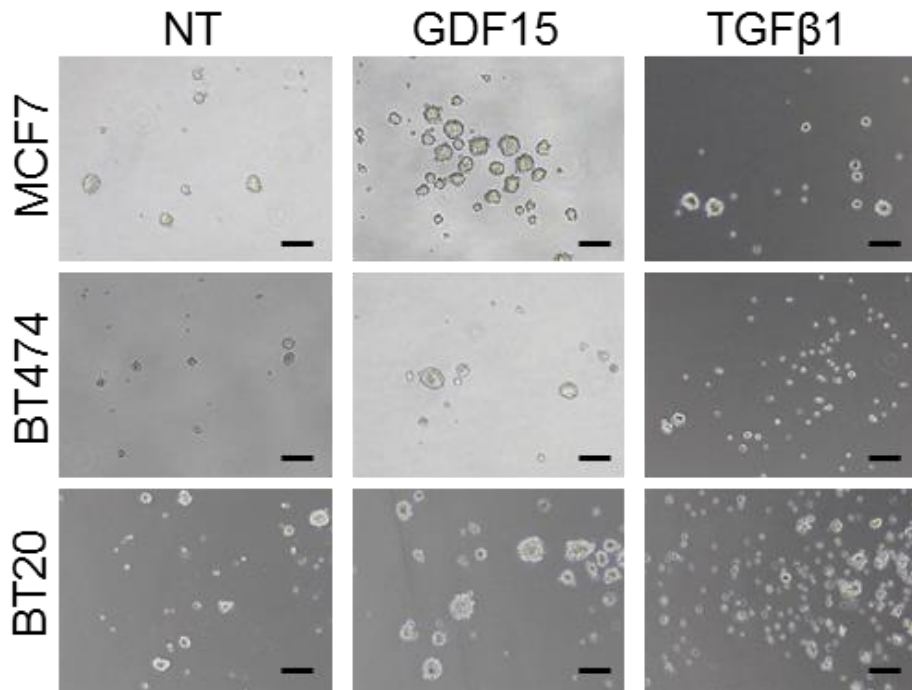


図4 (図3)の結果のスフィア像

NT : not treated。 Scale bar: 100μm。

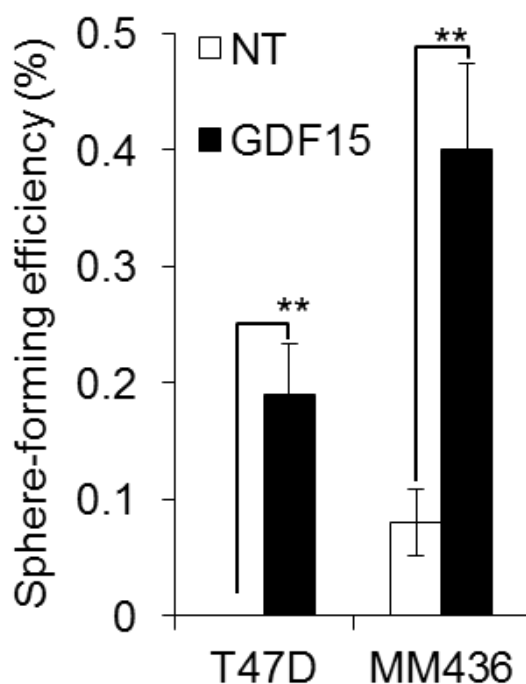


図5 T47D、MM436を用いたスフィア形成アッセイの結果

各細胞株に GDF15(200ng/ml)を添加したスフィア形成アッセイ。

NT : not treated. n=4. \*\*P < 0.01。

がん細胞株は人工的に不死化されており、細胞株の結果だけではスフィア形成能を厳密に評価できるとは言い切れず、乳がん患者のがん組織から得られたヒト初代培養がん細胞のうち、継代数の浅い細胞を用いることが GDF15 のスフィア形成能の正確な評価に必要であると考えられた。そこで、ヒト初代培養がん細胞を用いてスフィアアッセイを行った。事前に SCM でスフィアの形成が

確認できた 8 サンプルについて GDF15 を用いてアッセイを行った。結果、8 サンプル中 2 サンプルにおいて、GDF15 が有意にスフィア形成能を促進した。また、TGF $\beta$  は細胞株の結果と同様に、いずれのサンプルでもスフィア形成を促進しなかった(図 6、7、表 3)。



図 6 ヒト初代培養がん細胞のスフィア像

ヒト初代培養がん細胞を用いたスフィア形成アッセイのうち、sample #2 のイメージ像。それぞれ、GDF15(200ng/ml)、TGF $\beta$  (200ng/ml)を添加。

NT : not treated. Scale bar: 100 $\mu$ m



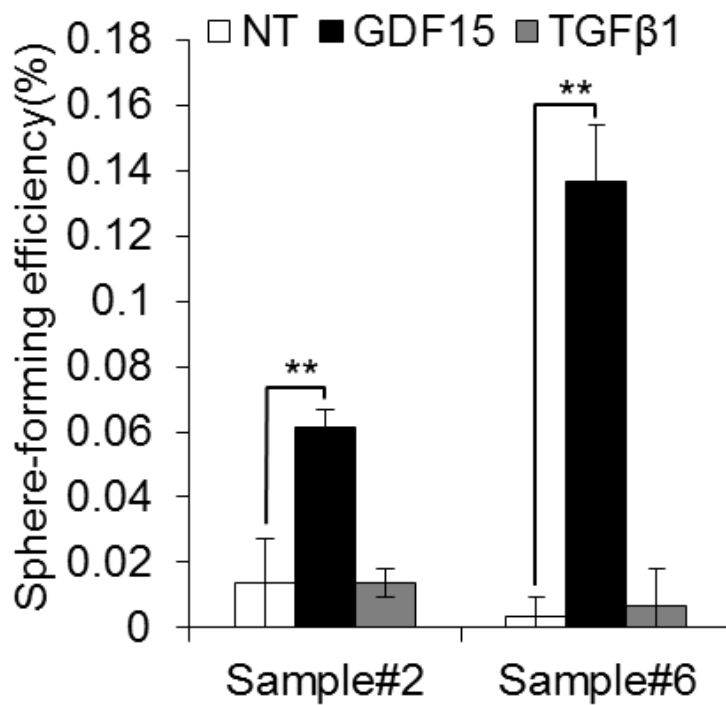


図7 ヒト初代培養がん細胞のスフィア形成アッセイ結果

ヒト初代培養がん細胞を用いたスフィア形成アッセイのうち、sample#2 および sample#6 の結果。NT : not treated。n=4。 \*\*P < 0.01。

Sample ID	Passages number	Subtype	Sphere formation
1	4	Luminal B HER2(+)	-
2	1	Luminal A	+
3	2	Luminal B HER2(-)	-
4	2	Luminal A	-
5	1	Luminal B HER2(-)	-
6	6	Luminal A	+
7	0	Luminal A	-
8	0	Luminal A	-

表3 スフィアアッセイに用いたヒト初代培養がん細胞の詳細

図 3 および図 5 の結果で、MCF7 が GDF15 に良く反応していたため、以降の主要な実験は主に MCF7 を用いて行うこととした。次に、がん幹細胞様細胞のもう一つの特性である未分化細胞マーカー(Oct4、Sox2、Nanog)の発現を調べた[36]。結果、Oct4、Sox2、Nanog のいずれにおいても GDF15 刺激により発現が上昇していた (図 8)。

次に、GDF15 の細胞増殖に対する効果を調べるため、MTT アッセイを行った。結果、GDF15 は細胞増殖を促進せず、むしろ細胞増殖を抑制する傾向を示した。(図 9)。

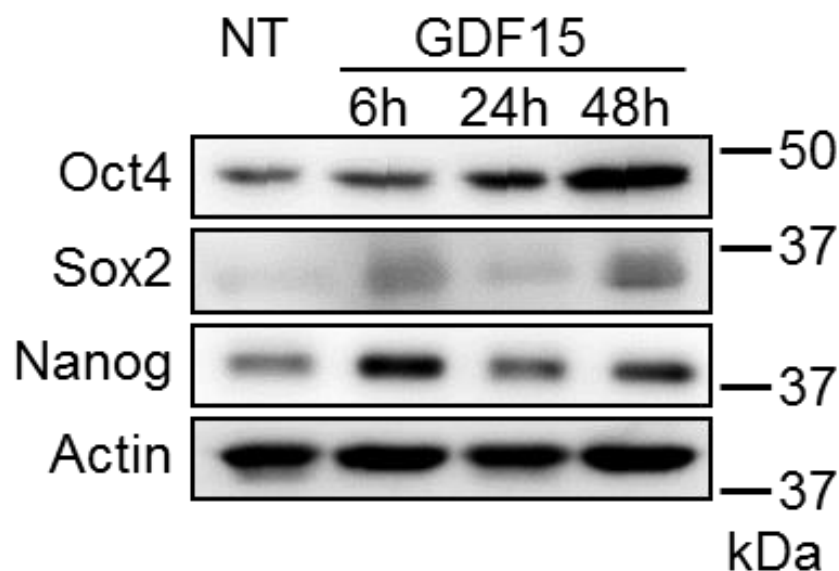


図 8 がん幹細胞マーカーの発現をみたウエスタンブロッティング

MCF7 に GDF15(200ng/ml)を添加し、記載された時間で回収した。ローディングコントロールとして Actin を使用。NT : not treated。

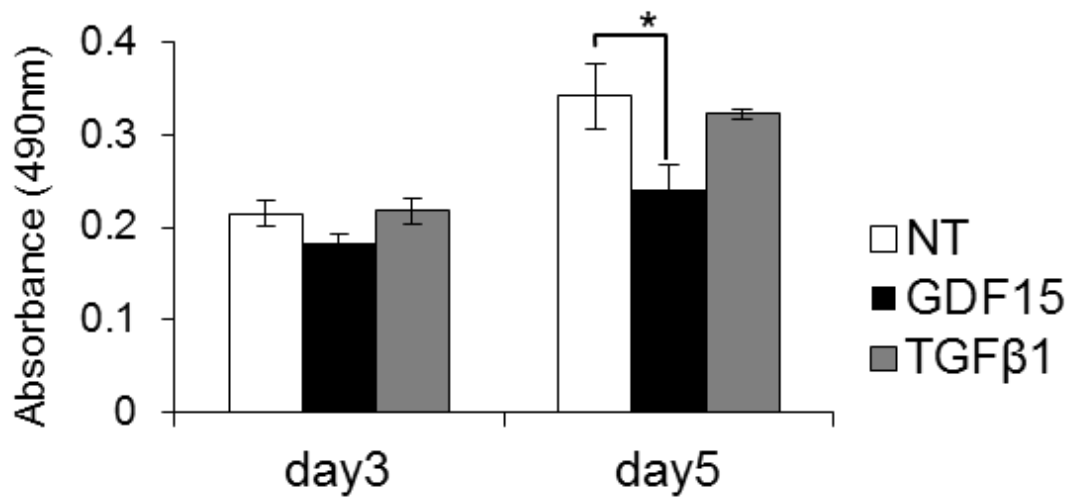


図9 MCF7を用いたMTTアッセイ

それぞれ、GDF15(200ng/ml)、TGFβ(200ng/ml)を添加し、3日目と5日目で結果を回収。NT : not treated。n=3。\*P < 0.05。

### 3.2. TGF $\beta$ シグナル伝達の標準的経路である Smad 経路はスフィア形成に関与していない

次に、GDF15 のスフィア形成に関わるシグナル伝達経路を特定すべく、まずリン酸化 Smad2 の発現をウエスタンブロッティングで確認した。結果、TGF $\beta$  は著明にリン酸化 Smad2 の発現を上昇し、GDF15 はわずかではあるがリン酸化 Smad2 の発現を上昇させた (図 10)。

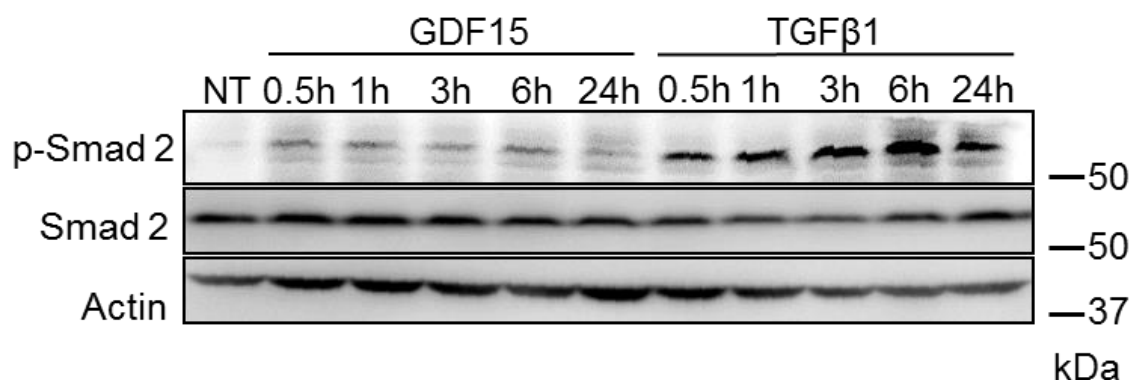


図 10 MCF7 を用いたリン酸化 Smad2 の発現確認

MCF7 を用いて GDF15(200ng/ml)または TGF $\beta$  (200ng/ml)刺激下での p-Smad2 および Smad2 の発現をウエスタンブロッティングで評価した。ローディングコントロールとして Actin を使用。NT : not treated。

GDF15 刺激によるリン酸化 Smad2 の発現は TGF  $\beta$  に比べると弱いものの、わずかではあるが上昇しており、やはりスフィア形成に Smad 経路が関与している可能性が考えられた。このため、TGF  $\beta$  type I 受容体を介したシグナルがスフィア形成に関与しているか調べるため、TGF  $\beta$  type I 受容体の選択的阻害剤 (ALK4、ALK5、ALK7) である SB431542 を用いてウエスタンブロッティング及び、スフィアアッセイを行った。ウエスタンブロッティングでは GDF15 及び TGF  $\beta$  により発現上昇したリン酸化 Smad2 が SB431542 で抑制される結果を認めた (図 11)。しかし、スフィアアッセイにおいては、GDF15 で促進されたスフィア形成能は SB431542 では抑制されなかった (図 12、13)。なお、TGF  $\beta$  刺激ではもともとスフィアをほとんど形成しないため、TGF  $\beta$  刺激を SB431542 で阻害したスフィアアッセイは行わなかった。

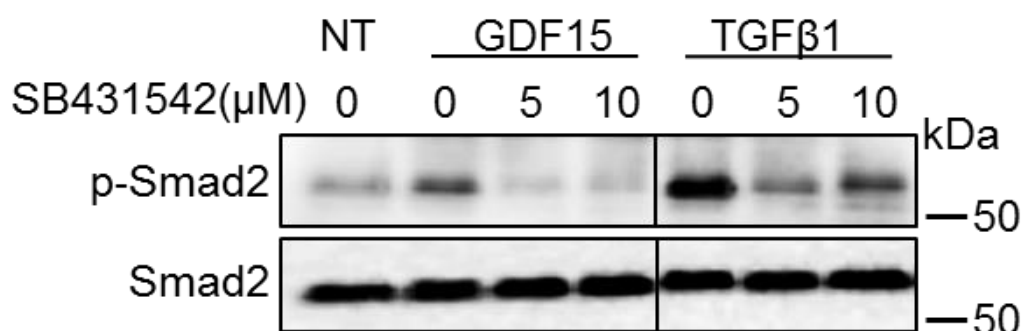


図 11 SB431542 を用いたウエスタンブロッティング

MCF7 の p-Smad2 および Smad2 の発現をウエスタンブロッティングで評価した。GDF15(200ng/ml)または TGF  $\beta$  (200ng/ml)投与の 60 分前に SB431542 を投与し、GDF15 または TGF  $\beta$  投与から 30 分後に回収した。NT: not treated。

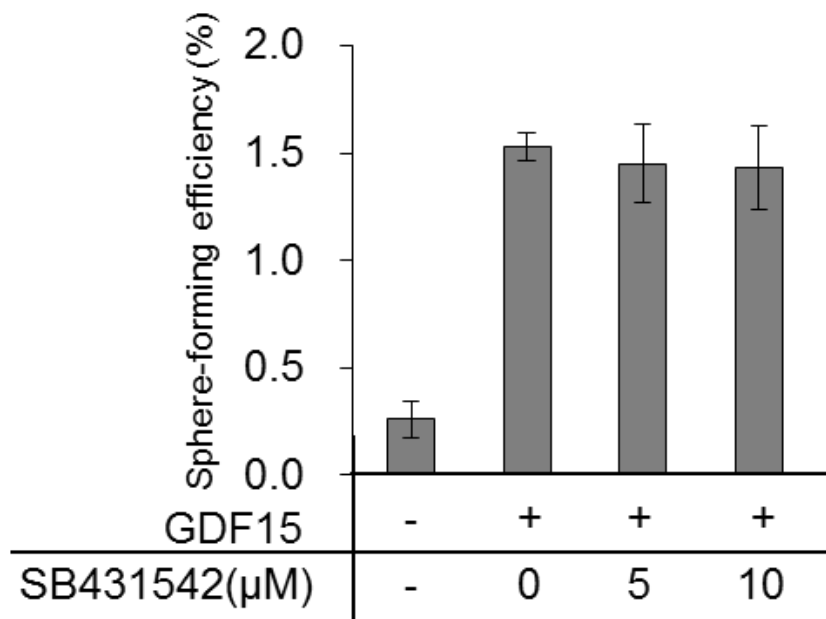


図 12 SB431542 を用いたスフィアアッセイ

MCF7 を GDF15(200ng/ml)で刺激し、さらに SB431542 を投与した。  
n=4。

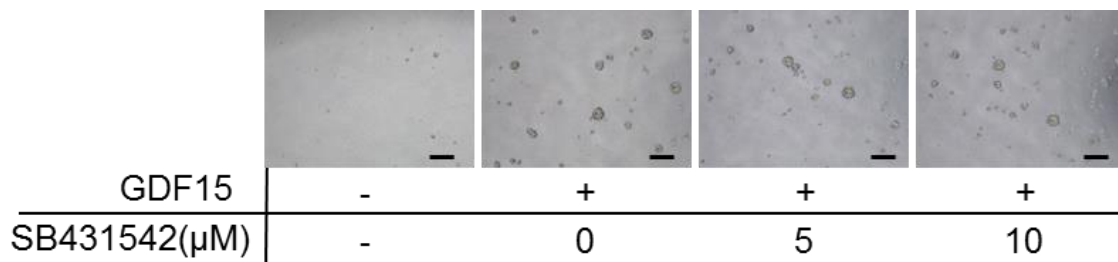


図 13 図 12 の結果のイメージ像

Scale bar: 100μm。

### 3.3. 長期の ERK1/2 活性化がスフィア形成に関与している

GDF15 が ERK1/2 の活性化を促進しているかをウェスタンブロッティングで調べたところ、TGF $\beta$  刺激では 6 時間で p-ERK1/2 の発現が上昇していたのに対し、GDF15 刺激下では刺激後 6 時間での上昇に加え、48 時間でも上昇しており、長期に ERK1/2 が活性しているという結果を得た(図 14)。さらに、MEK-ERK1/2 パスウェイの活性がスフィア形成に関与しているかを調べるために、MEK の選択的阻害剤である U0126 を用いてウェスタンブロッティング及びスフィアアッセイを行った。ウェスタンブロッティングでは、GDF15 により発現上昇した p-ERK1/2 が U0126 により抑制されている結果を得た(図 15)。また、スフィアアッセイにおいても同様に、GDF15 刺激で促進されたスフィア形成能が極めて低い濃度 (0.5 $\mu$ M) の U0126 で抑制され、濃度依存的にその抑制効果が強くなるという結果を認めた (図 16、17)。

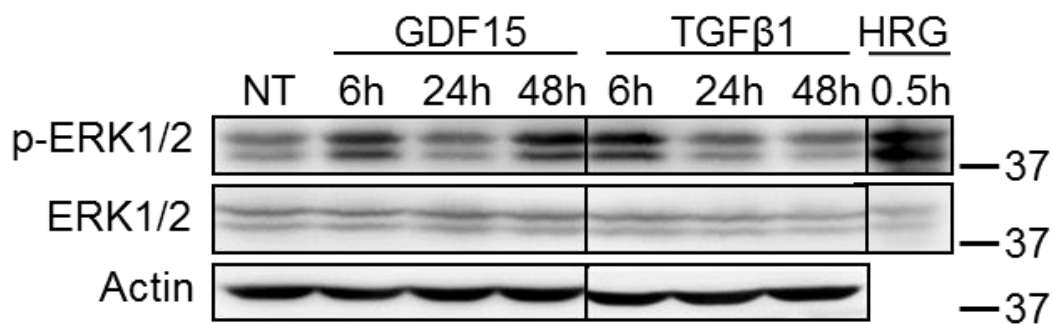


図 14 MCF7 を用いたリン酸化 ERK1/2 の発現確認

MCF7 を用いて GDF15(200ng/ml)または TGF β (200ng/ml)刺激下での p-ERK1/2 および ERK1/2 の発現をウエスタンブロッティングで評価した。HRG で刺激した MCF7 をポジティブコントロールとしてしようした。ローディングコントロールとして Actin を使用。NT : not treated。

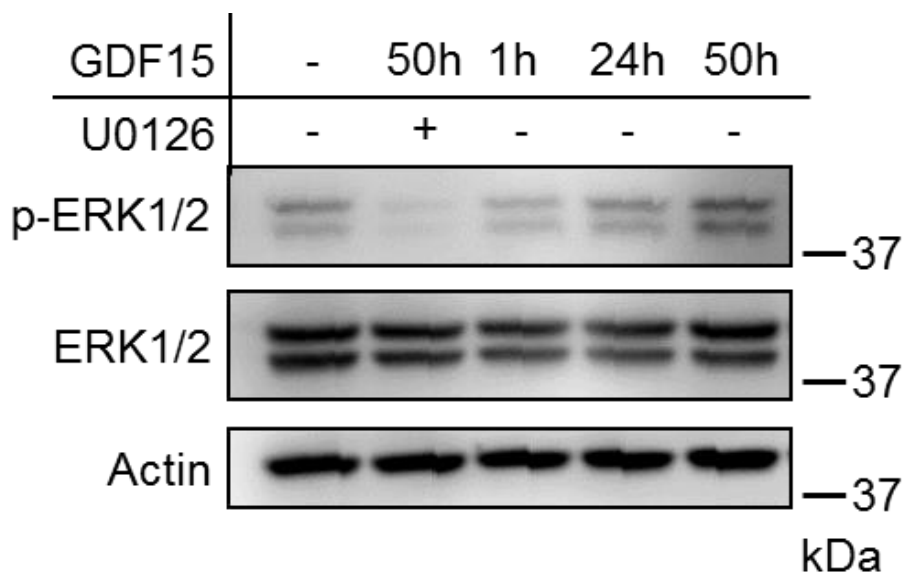


図 15 U0126 を用いたウエスタンブロッティング

MCF7 の p-ERK1/2 および ERK1/2 の発現をウエスタンブロッティングで評価した。GDF15(200ng/ml)または TGF β (200ng/ml)投与の 60 分前に U0126(5μM) を投与した。



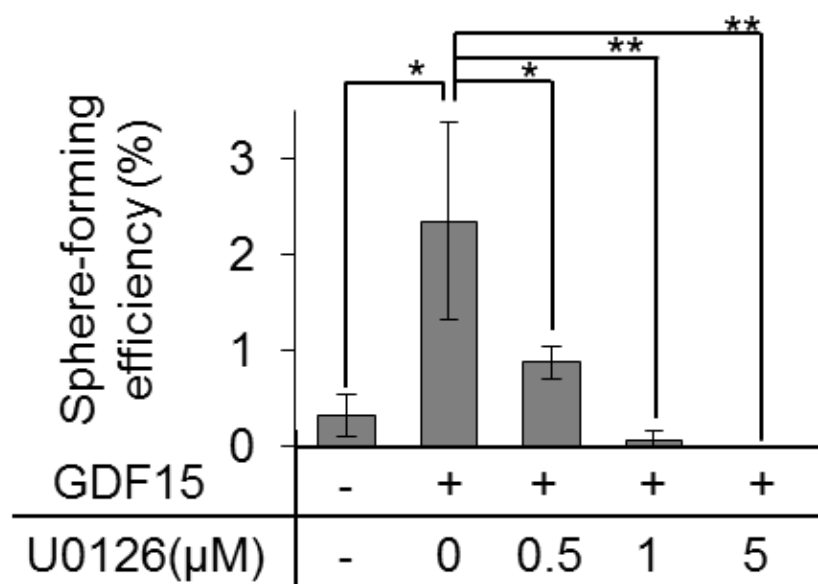


図 16 U0126 を用いたスフィアアッセイ

MCF7 を GDF15(200ng/ml)で刺激し、さらに U0126 を投与した。n=4。

\*\*P < 0.01、\*P < 0.05

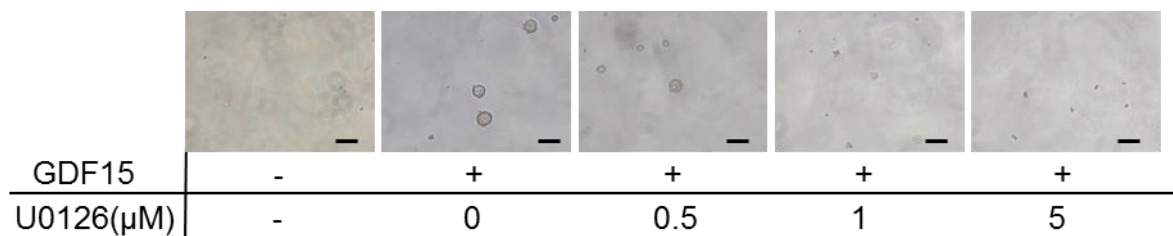


図 17 図 16 の結果のイメージ像

Scale bar: 100μm。

図 16 の結果が U0126 そのもののアポトーシス誘導や細胞増殖抑制作用によるものの可能性を否定するため、GDF15 刺激と同時に、U0126 投与の有無で細胞周期解析を行った。GDF15 刺激後 50 時間で解析を行い、U0126 投与の有無では G0/G1 期、S 期、G2 期の割合に差は出なかった (図 18)。また、図 18 の赤矢印の領域(sub-G1)にわずかにアポトーシスを起こした細胞を認めたが、この数も U0126 の有無では差は出なかった。以上より、U0126 の投与では明らかな細胞増殖の抑制やアポトーシス誘導は起きておらず、長期の ERK1/2 の活性化が GDF15 によるスフィア形成促進に関与していることが示唆された。

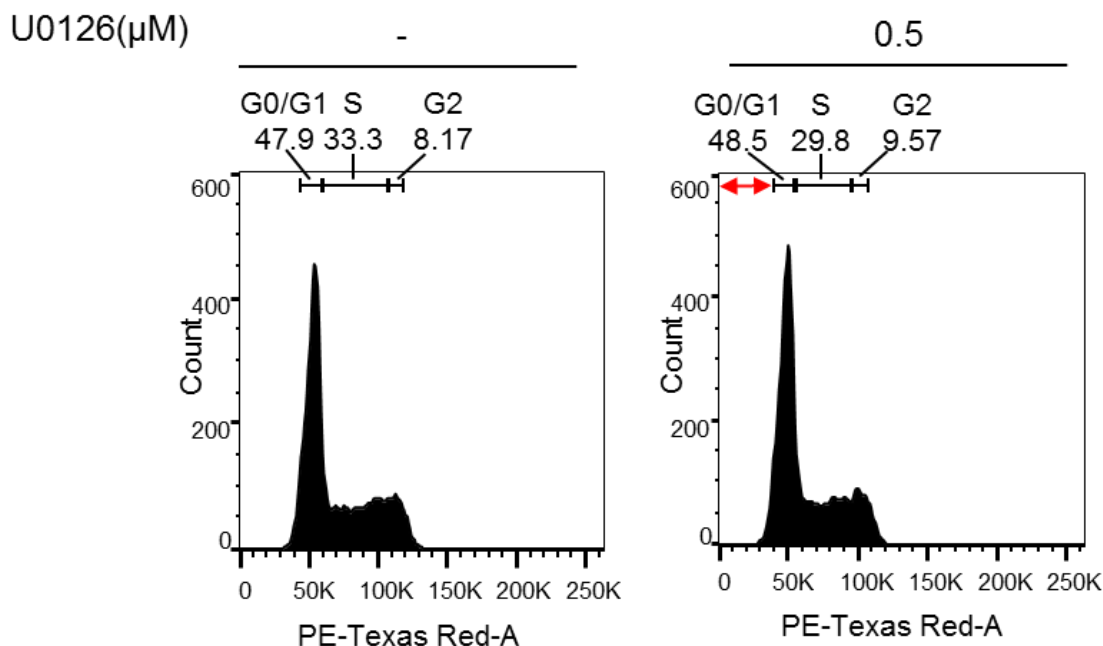


図 18 MCF7 を用いた細胞周期解析

MCF7 を GDF15(200ng/ml)で刺激し、一方には 0.5 μM の U0126 を投与した。アポトーシスを起こした細胞は赤い矢印の領域に出現する。

### 3.4. GDF15 は GDF15 そのものの発現を上昇させる

GDF15 の ERK1/2 刺激が長時間持続することから、この反応には何らかのサイトカインや増殖因子の産生が介在しているのではないかと考えた。そのため、サイトカインアレイキットを用いて GDF15 刺激により特異的に誘導されるサイトカインもしくは増殖因子がないかを網羅的に解析した。その結果、GDF15 刺激により GDF15 そのものの発現が GDF15 刺激から 54 時間後でも時間依存的に上昇している結果を認めた (図 19、20)。

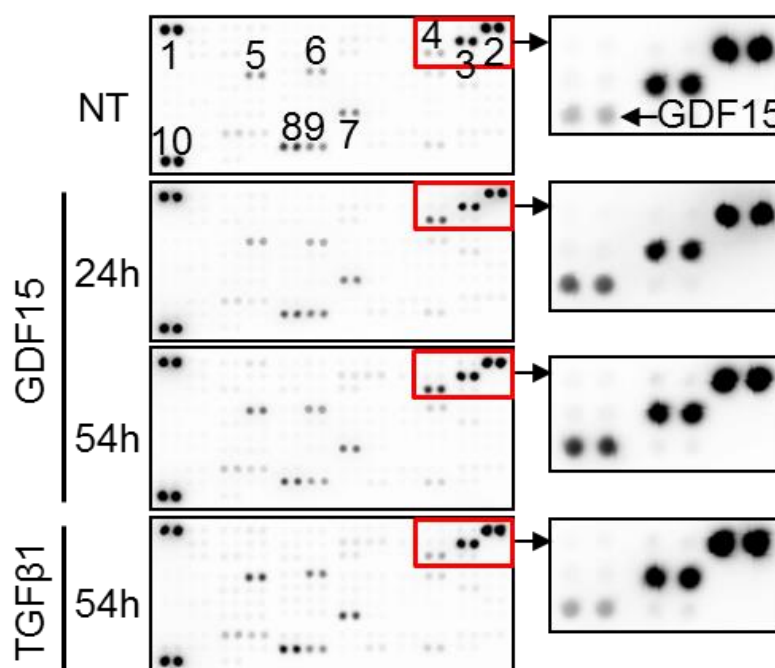


図 19 MCF7 を用いたサイトカインアレイ

MCF7 を GDF15(200ng/ml)または TGF $\beta$  (200ng/ml)で刺激して溶解液を回収し、解析した。NT : not treated。発現の上昇したスポットには番号を振った。各番号に対応するサイトカインは 1, 2, 10, 参照スポット; 3, EMMPRIN; 4, GDF15; 5, ICAM-1; 6, IGFBP-2; 7, MIF; 8, TFF3; 9, Tfr。

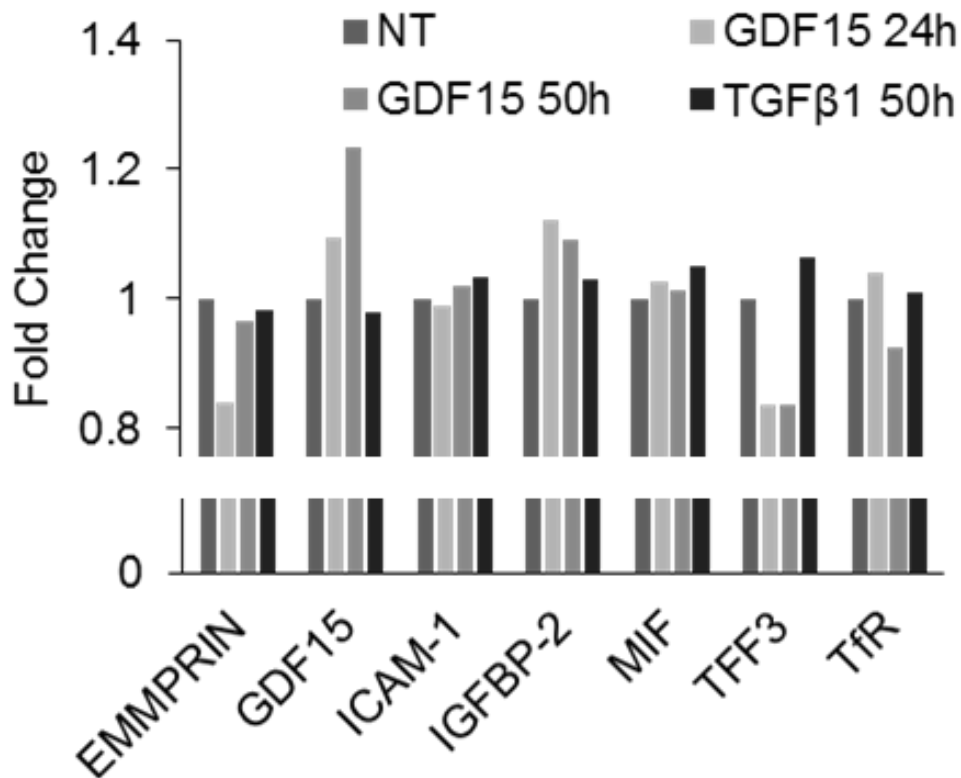


図 20 図 19 の画像密度をグラフ化して比較

ImageJ を用いて各スポットの画像密度を測定し、それぞれの値を NT との比で示した。NT : not treated。n=2。

さらに、MCF7 を用いて GDF15 刺激による GDF15 産生誘導が転写レベルでも起きているかを調べたところ、GDF15 刺激により *GDF15* 転写産物が著明に上昇し、この反応は U0126 により転写レベルで抑制されていた(図 21)。また、MCF7 と同じ luminal type である T47D でも、前述の結果と同様に、GDF15 刺激により *GDF15* 転写産物の著明な上昇を認めた (図 22)。次に、MCF7 において、この一連の反応が GDF15 の中和抗体を用いることで抑制されるかを確認

したところ、抗 GDF15 抗体により *GDF15* の転写レベルでの発現上昇が濃度依存的に抑制された (図 23)。

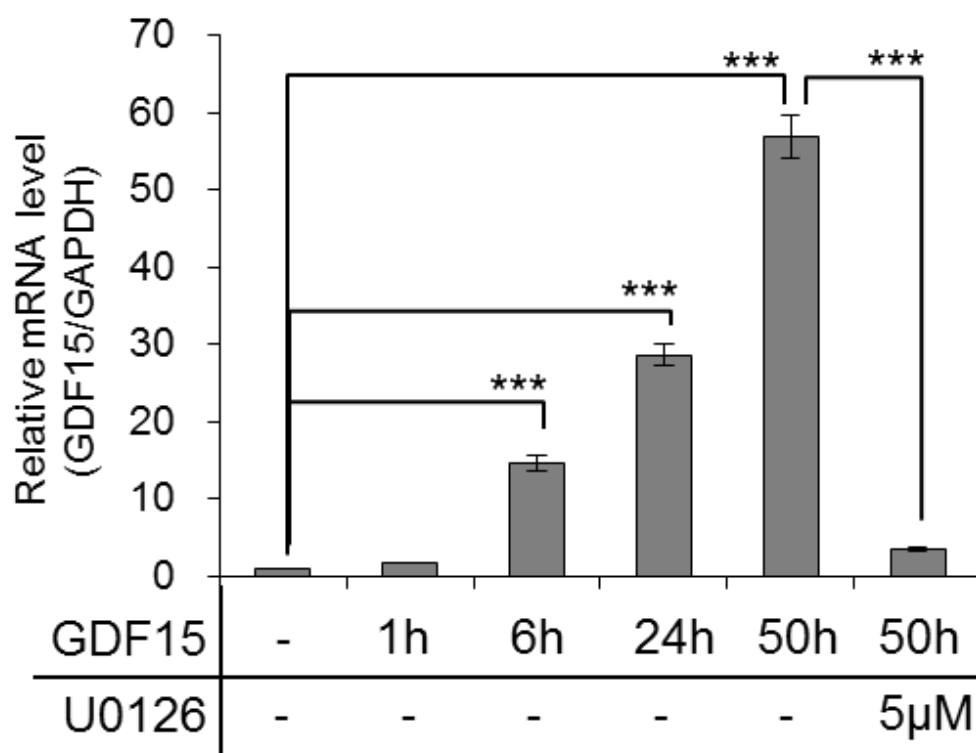


図 21 GDF15 刺激下での MCF7 の *GDF15* 測定

MCF7 を GDF15(200ng/ml)で刺激し、阻害剤投与条件では U0126 (5μM) を投与し、qRT-PCR で *GDF15* を測定した。NT : not treated。n=3。  
\*\*\*P < 0.001。

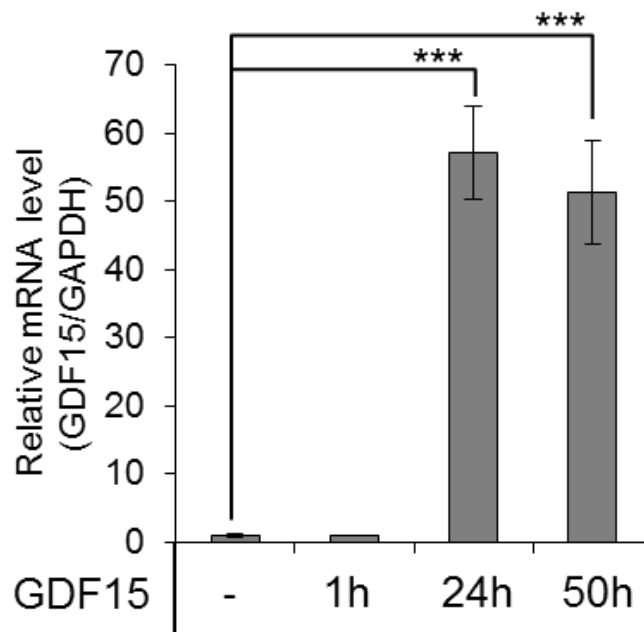


図 22 GDF15 刺激下での T47D の *GDF15* 測定

T47D を GDF15(200ng/ml)で刺激し、qRT-PCR で *GDF15* を測定した。NT : not treated. n=3. \*\*\*P < 0.001。

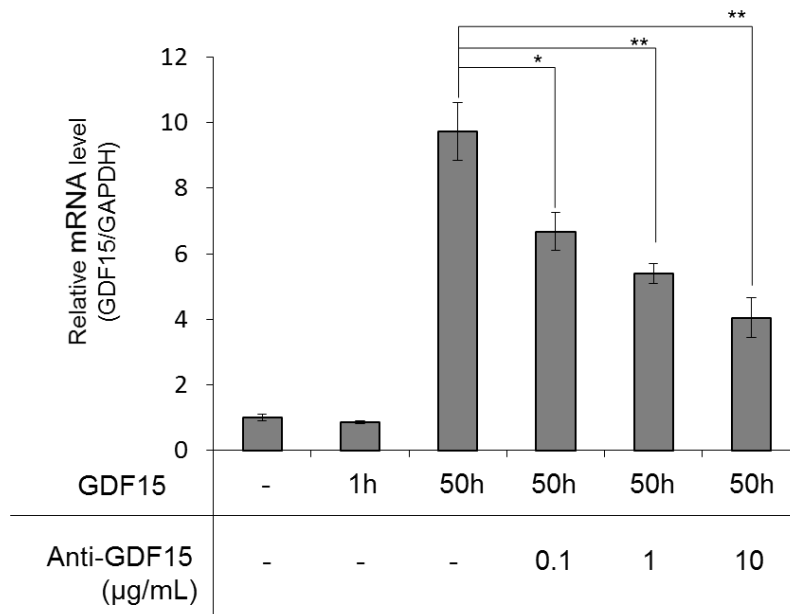


図 23 抗 GDF15 抗体を用いた GDF15 刺激下 MCF7 の *GDF15* 測定

MCF7 を GDF15(200ng/ml)で刺激し、24 時間後に培地を変えずに抗 GDF15 抗体を投与し、qRT-PCR で *GDF15* を測定した。NT : not treated. n=3. \*\*P < 0.01。

### 3.5. GDF15 はがん細胞で不均一に発現している

正常乳腺組織と乳がん組織との *GDF15* の発現レベルの差を比較するため、Oncomine データベース (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) を解析した。*GDF15* は正常乳腺組織に比べ乳がん組織で有意に発現が高かった (図 24)。

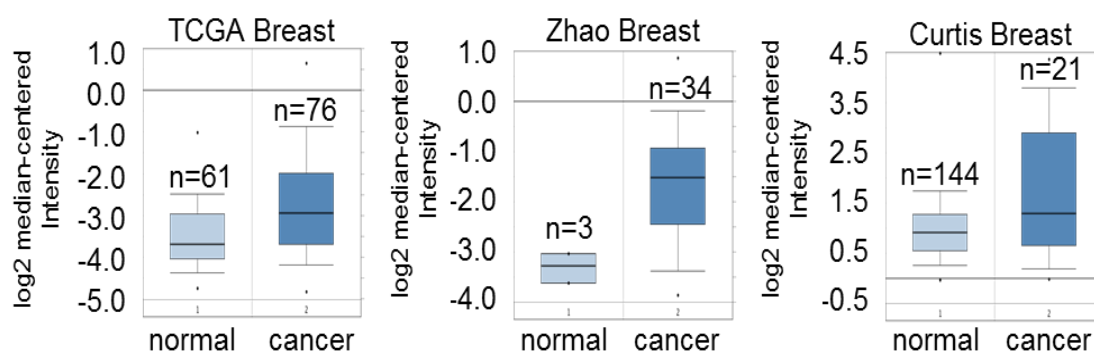


図 24 *GDF15* 発現解析結果

Oncomine database を用いて *GDF15* 転写産物の発現レベルを正常組織と乳がん組織とで比較した。

これまで、細胞株に recombinant human *GDF15* を人工的に添加し、その反応を見てきたが、乳がん組織そのものに発現する *GDF15* について観察するため、まず MCF7 を免疫染色して *GDF15* の発現を確認した結果、*GDF15* は細胞質に発現しており、その発現は非常に不均一であり (図 25)、強く *GDF15* を発現している細胞は非常に少なかった。

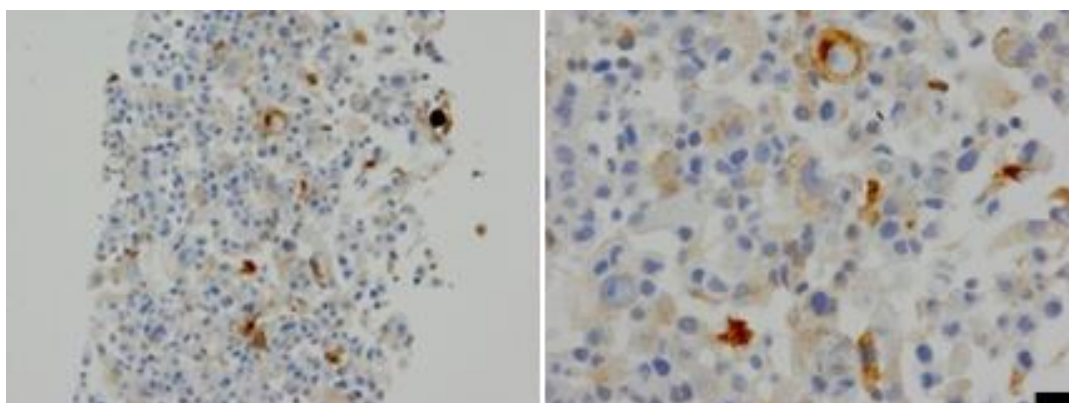


図 25 免疫染色による GDF15 の発現確認

MCF7 のパラフィンブロックを抗 GDF15 抗体を用いて染色し GDF15 の発現を評価した。左：200 倍、右：Scale bar 20 $\mu$ m。

次に、臨床検体を用いて、各サブタイプの GDF15 の発現レベルを調べた（表 4）。MCF7 の結果と同様に、GDF15 は細胞質に発現しており、luminal A や triple negative では発現レベルが著しく低かった（表 4、図 26、27）。Luminal A および triple negative では、GDF15 の発現が 5%を超えるサンプルは一つもなかったのに対し、luminal B や HER2 タイプでは GDF15 の発現レベルはサンプルによって大きな差があった。GDF15 の発現が 5%を超えるサンプルは luminal B HER2 陰性タイプで 2/5 サンプル、luminal B HER2 陽性タイプで 1/5 サンプル、HER2 タイプで 4/5 サンプルあり、この中には GDF15 の発現が 15%を超えるサンプルも luminal B HER2 陰性タイプで 1/5 サンプル、luminal B HER2 陽性タイプで 1/5 サンプル、HER2 タイプで 2/5 サンプルあった。そしてやはり、各細胞での発現レベルは不均一であった。



Case ID	Specimen	Subtype	Nuclear grade	Lymph node status	Pathological stage	GDF15 positive cells(%)
1	Breast	Luminal A	1	-	I	0
2	Breast	Luminal A	1	+	II A	0.1
3	Breast	Luminal A	2	+	II A	4.7
4	Breast	Luminal A	1	-	I	0.1
5	Breast	Luminal A	1	-	I	2.7
6	Breast	Luminal B	1	-	I	0
7	Breast	Luminal B	1	+	IV	62.4
8	Breast	Luminal B	3	+	II A	7.1
9	Breast	Luminal B	2	-	I	8
10	Breast	Luminal B	2	+	II B	4.9
11	Breast	LuminalB HER2(+)	2	-	I	2
12	Lymph node	LuminalB HER2(+)	3	+	III A	3.8
13	Breast	LuminalB HER2(+)	1	-	I	0.1
14	Breast	LuminalB HER2(+)	3	-	II A	0.2
15	Breast	LuminalB HER2(+)	1	-	I	18.1
16	Breast	HER2(+)	3	-	I	42
17	Soft tissue	HER2(+)	2	+	IV	7.8
18	Breast	HER2(+)	2	-	I	67.8
19	Breast	HER2(+)	2	+	III A	8.9
20	Breast	HER2(+)	3	-	II A	3.4
21	Breast	Triple negative	3	-	IV	0.7
22	Skin	Triple negative	3	+	IV	0.1
23	Breast	Triple negative	3	-	II A	0
24	Breast	Triple negative	3	-	I	0.2
25	Breast	Triple negative	3	-	I	0.3

表 4 免疫染色に用いた臨床検体の詳細

各サブタイプにつき 5 サンプルずつ解析した。主に乳腺内にできた乳がんより採取しているが、一部にリンパ節や皮膚転移巣からの組織も含まれている。

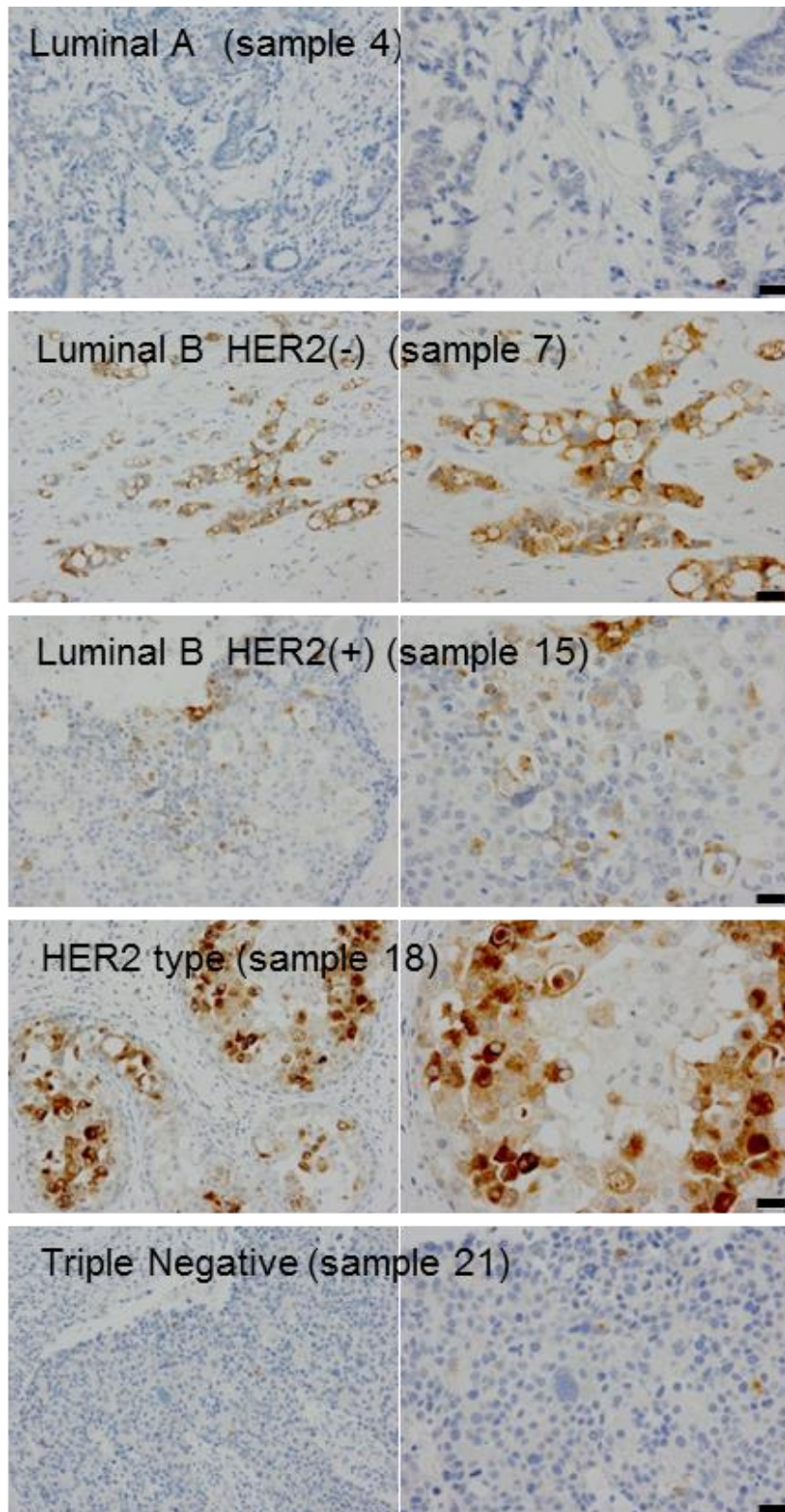


図 26 臨床検体を用いた GDF15 の発現確認の代表サンプルの免疫染色画像  
 画像中のサンプル番号は表 4 に対応している。左：400 倍、右：Scale bar  
 20 $\mu$ m。

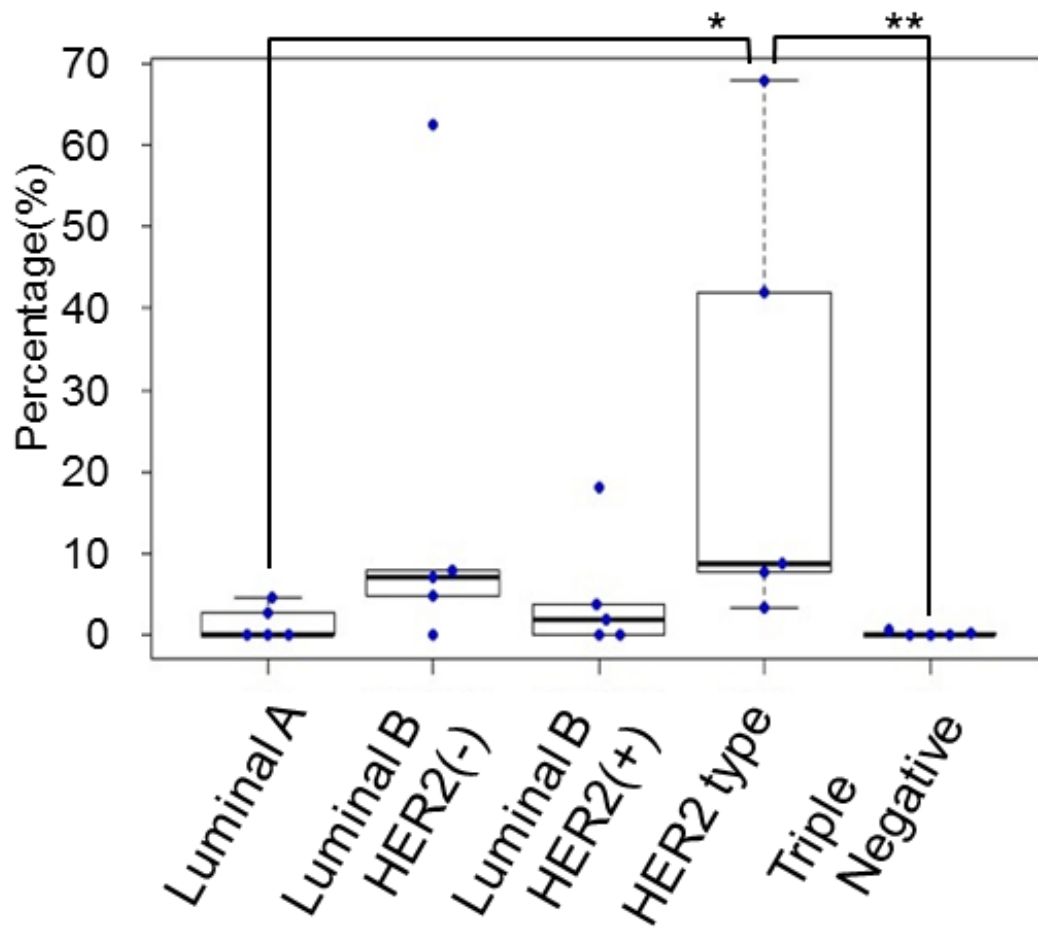


図 27 臨床検体の免疫染色結果

臨床検体 25 サンプル(各サブタイプ 5 サンプルずつ)の免疫染色結果の箱ひげ図。 \*\*P < 0.01、 \*P < 0.05

#### 4. 考察

今回我々は、GDF15 が自己分泌/傍分泌を介して乳がんのがん幹細胞様細胞の維持に関与しているという仮説を立てた。本研究では複数の乳がん細胞株において、GDF15 刺激がスフィア形成を促進し、MCF7 を用いた未分化細胞マーカーの確認においても、Oct4、Sox2、Nanog の発現が上昇しており、GDF15 が乳がん幹細胞様細胞の維持に関与しているという仮説に沿った結果を得た。しかしながら、ヒト初代培養がん細胞を用いたスフィアアッセイでは 8 サンプル中 2 サンプルのみでスフィア形成の促進を認め、GDF15 刺激によるスフィア形成促進は臨床においては一部の組織にのみ認められる効果であると考えられた。これらの 8 サンプルは SCM ではスフィアを形成していることから、がん幹細胞様細胞は存在していると考えられ、GDF15 によるスフィア形成促進効果を認めなかった 6 サンプルについては GDF15 とは異なる維持機構が関与していると推察された。当研究室では全てのサブタイプの乳がん組織を培養しているものの、実際に細胞増殖を認め、継代が可能になるヒト初代培養がん細胞は luminal タイプが多く、稀に HER2 タイプや triple negative タイプで継代可能になっても、SCM でスフィア形成するまでには至らなかった。このため、今回実験に使用した 8 サンプルはいずれも luminal タイプであり、GDF15 による乳がん幹細胞様細胞の維持機構がこういった症例でどの程度普遍的に認められる

のかは厳密には検証できていない。他施設の研究においてもやはり、ヒト初代培養がん細胞によるスフィア形成は luminal タイプが多いものの、HER2 タイプや triple negative タイプでも SCM でスフィアを形成した報告もあり[37]、今後は培養方法などを再検討し様々なサブタイプでの検証が必要であると考えられる。

GDF15 の伝達経路は未だ不明な点が多く、「標準的」経路というものはまだわかっていない。これまで、大腸がんにおける GDF15 の転移促進に Smad 依存経路が関与しているという報告を始め[31]、前立腺がん、乳がん、胃がん、食道がん、骨髄腫などの様々ながん種で AKT 及び ERK1/2 双方、もしくは各々単独での活性が関与しているという報告もあり[27, 32, 34, 38]、他の TGF $\beta$ ファミリー同様、GDF15 のシグナル伝達経路もその細胞環境に依存して非常に複雑であると考えられた。近年では、HER2 過剰発現の乳がん細胞において、GDF15 刺激が TGF $\beta$  受容体 - Src 活性を介して ErbB2 (HER2)を活性化させ、これにより一時的に ERK1/2 が活性化するという報告も複数なされている[33, 39]。本研究では、GDF15 は TGF $\beta$  のファミリーに属しているものの GDF15 刺激ではリン酸化 Smad2 の発現上昇は TGF $\beta$  によるリン酸化 Smad2 の発現上昇に比べ、わずかであった。その一方で、GDF15 刺激によるリン酸化 ERK1/2 の発現はとても強く、かつ持続的に上昇していた。これまでの報告では、ERK1/2 の活

活性化は急激に起こり、刺激より 5~10 分後にピークを迎え、60 分後には基準値まで戻るとされてきた。今回、我々は HER ファミリーを過剰発現しない MCF7 において、刺激から 6 時間でも ERK1/2 が活性化されている結果を示した。その後、ERK1/2 の活性は 24 時間で減少するものの、50 時間後に再度強く活性化していた。こうした、GDF15 刺激による長時間の ERK1/2 活性化については、これまでに報告されていない。24 時間で一度 ERK1/2 の活性が低下するのは、GDF15 刺激により誘導された GDF15 産生量が、ERK1/2 を刺激するに足る量に達していないためと考えられる。その後、GDF15 刺激により産生された GDF15 が ERK1/2 を刺激できる量に達するのが刺激より 50 時間後であると考えられる。GDF15 の長期的な刺激による ERK1/2 の活性に HER ファミリーが関与しているかどうかについては、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

本研究では MCF7 において、GDF15 刺激によるスフィア形成の促進に ERK1/2 が関与しているという結果を得た。さらに、サイトカインアレイ及び qRT-PCR の結果より、GDF15 刺激が GDF15 そのものの発現を誘導すること、MEK の選択的阻害剤である U0126 を用いることでこの発現誘導が抑制されることを示した。これらの結果より、GDF15 刺激によって活性化された ERK1/2 はスフィア形成を促進するのみならず、転写レベルで *GDF15* そのものの発現を

促進し、GDF15 タンパクを産生していることが示唆された。さらに、GDF15 刺激が GDF15-ERK1/2-GDF15 の回路を形成し、添加した GDF15 の効果が継時的に減少した後にもこの回路により GDF15 が維持されている可能性が示唆された(図 28)。Martinez らは過去に、ERK1/2 の活性が GDF15 の発現を誘導するという報告をしている[40]。前述の、様々ながん種における GDF15 による ERK1/2 の活性とこの研究を併せると、GDF15 刺激が GDF15 そのものの産生を誘導するという結果はある程度予測可能ともいえるが、これまで GDF15-ERK1/2-GDF15 回路の可能性を示唆した報告はなく、本研究が初めてとなる。しかしながら、今回の実験では MCF7 及び T47D でしか GDF15 刺激による GDF15 産生を示していないため、今後この可能性を裏付けるためには様々な細胞株及びヒト初代培養がん細胞での検討が必要であると考えられる。

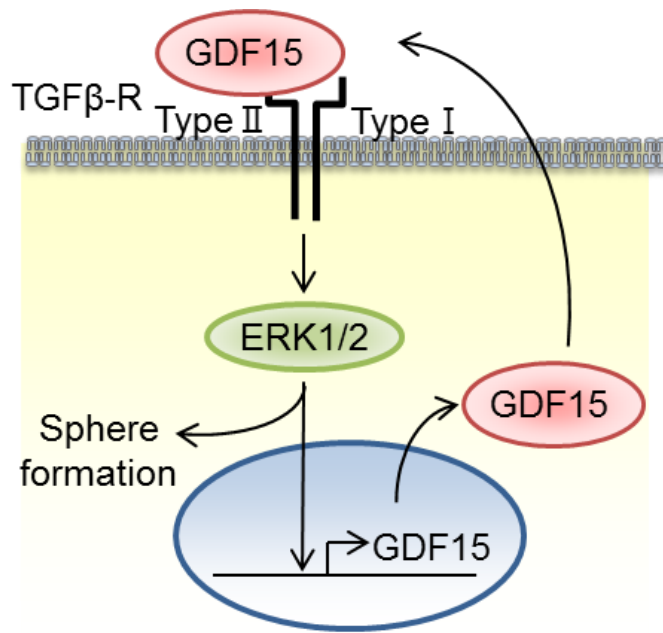


図 28 GDF15-ERK1/2-GDF15 回路のモデル図

本研究における MCF7 の免疫染色では、GDF15 の発現は非常に不均一であり、強く GDF15 を発現している細胞は非常に少なかった。この結果は、細胞株においても、細胞集団は不均一であるというこれまでの報告と一致する結果である[41]。さらに臨床検体における免疫染色でも、乳がん組織において、GDF15 の発現は非常に不均一であり、同一組織の中でもその発現量は細胞によって隔たりがあることが示された。また、2/3 の症例では GDF15 陽性細胞の占める割合は非常に少なく、全体の 5%以下という結果を認めた。今回の研究では各サブタイプにつき 5 サンプルと、解析数が少ないためこの結果は GDF15 の本来の発現傾向をみていないのかもしれないが、がん幹細胞は細胞増殖能が低いめにがん細胞の中で極わずかしか存在しないというこれまでの報告と合致する結



果ではあり[8]、GDF15 ががん幹細胞様細胞を指し示しているとも考えられる。一方で、luminal B や HER2 タイプでは全体の 15%以上が GDF15 陽性という症例もいくつか認め。こういった症例でのがん幹細胞様細胞の維持が GDF15 に依存しているとした場合、ひとたび GDF15-ERK1/2-GDF15 回路が形成されると、従来の化学療法では容易にはがん細胞は根絶されないと考えられ、従来の治療に加えて GDF15 回路を標的とした治療で直接がん幹細胞様細胞にアプローチすることで、より良い治療成績が残せる可能性があると考えられる。この可能性を広げるためには、今後、さらに詳しく分子レベルでのメカニズムを解明する必要があると考えられた。

本研究において、GDF15 の発現の弱い MCF7 タイプにおいても、外因性に GDF15 を添加したことでスフィア形成が促進されるという結果を得た。この結果から、たとえ内因性の GDF15 発現が弱くても、外的に GDF15 が加わると GDF15 の回路が形成される可能性が示唆された。通常、生体内の血清 GDF15 濃度は 200-1150pg/ml とされているが[42]、大腸がんや卵巣がん、乳がんなど様々ながん種において、健常者に比較して血清 GDF15 濃度が優位に上昇するという報告もある[26, 42, 43]。本研究で添加している GDF15 は 200ng/ml と、生理的濃度に比べかなり高い濃度で実験を行っているものの、研究開始時点では 50ng/ml でもスフィア形成を促進するという結果を得ており、今後はさらに低

い濃度でもスフィア形成を促進するのか検証する必要があると考えられる。本研究では、様々な細胞株における元々の GDF15 発現についての検討は行っていない。内因性の GDF15 の発現を調べることは GDF15 の機能を知る上では重要な研究であり、今後検証が必要であると思われる。さらに、内因性に GDF15 発現の高い細胞株を用いて、GDF15 を knock down した細胞株での実験もまた、有用な実験であると考えている。

GDF15-ERK1/2-GDF15 回路がどのようにスフィア形成を促進するのかはまだ解明できていない。我々の研究室はこれまでに FGF が ERK1/2 を持続的に活性化し、これにより幹細胞を制御する転写因子である Hes1 の発現を誘導することを示した[44]。誘導された Hes1 はマウスの神経幹細胞からのスフィア (neurosphere) 形成に寄与する。乳がん幹細胞様細胞においても、Hes1 が関与した、同様のシグナルが活性化されている可能性もある。

2014年に、血液がんの中でも非常に稀なタイプである多発性骨髄腫において、GDF15 ががん幹細胞の機能に関与している可能性を示す研究が報告された[45]。本研究も、GDF15 ががん幹細胞の機能に何らかの役割を有するという見解に沿ったものであり、乳がんだけにとどまらず、多くの固形がんにおいてもやはり GDF15 が同様の機能を有していると考えている。

今回我々は主に MCF7 を用いて GDF15 による乳がん幹細胞様細胞の維持へ

の検証を行い、一部で T47D の結果も示している。実際の研究では、MCF7、T47D に加え、basal type の BT20 を用いた実験を一部で行っているものの、結論に至るまではまだ複数回実験を繰り返して確認する必要があると考えており、結果としては提示できていない。このことから、今回の研究で示唆された GDF15 による乳がん幹細胞様細胞の維持機構は、現段階では一部の細胞株でのみ確認できている限定的な現象であり、今後様々な細胞株、ヒト初代培養がん細胞で検証を進め、普遍性について追及する必要があると考えられる。

## 5. 結語

本研究では GDF15 による乳がん幹細胞様細胞維持への関与について検討し、スフィア形成能の促進、未分化細胞マーカーの発現上昇により GDF15 による乳がん幹細胞様細胞の維持の可能性を示した。

さらに、GDF15 のシグナル伝達経路を検討し、GDF15 刺激が ERK1/2 の活性を介し GDF15 そのものの産生を促す可能性を示した。

乳がん組織において、GDF15 は不均一に細胞質に発現し、一部の乳がん組織において、GDF15 を高発現している症例があることを示した。

## 謝辞

まず初めに、本研究の指導教官である多田敬一郎准教授、ならびに前任であり、現在は獨協医科大学越谷病院の乳腺センター教授である小川利久先生、所属医局である胃食道・乳腺内分泌外科教授である瀬戸泰之先生には多数のご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

本研究は、指導委託という形で金沢大学がん進展制御研究所、分子病態研究分野の後藤典子教授の指導の下、完成に至りました。基礎的な知識が不十分で、右も左もわからない状態で研究を進める中、常に丁寧かつ熱心にご指導いただきました。心より深く御礼申し上げます。

また、指導委託を受けてくださいました東大病院医科学研究所分子療法分野の教授である東條有伸教授に深く感謝いたします。

ヒト初代培養がん細胞の作成にあたり、臨床検体をご提供いただきました、東京大学医学部附属病院乳腺内分泌外科の医局員の方々、公立昭和病院の金内一先生、南町田病院の矢野正雄先生には大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

免疫染色による GDF15 の発現解析では金沢医科大学臨床病理学の湊宏教授、病理学 I の清川悦子教授、乳腺内分泌外科の野口昌邦教授、野口美樹先生には多くのご協力、ご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

後藤典子教授の研究室の中田飛鳥さん、西村建徳さん、富永香菜さん、木村奈津子さん、村山貴彦さんには実験の手法を丁寧に教えていただき、さらに考察に関して多数のアドバイスをしていただきました。西村建徳さん、富永香菜さんにはデータ解析にもご協力いただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、研究に対して理解を示し、娘のかわいい盛りに単身赴任で仕事を頑張ってくれている夫と、寂しい思いをすることも多い中、すくすくと明るく元気に成長してくれている娘、実験などで帰宅が遅くなる際に、娘の迎えや世話を快く代わってくれた両親に心から感謝します。

## 引用文献

1. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin. **65**(2): p. 87-108, 2015.
2. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature. **406**(6797): p. 747-52, 2000.
3. Prat, A., et al., *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Molecular Oncology. **5**(1): p. 5-23, 2017.
4. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Research. **12**(5) , 2010.
5. Network, T.C.G.A., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature. **490**: p. 61-70, 2012.
6. Prat, A., et al., *Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer*. Breast. **24 Suppl 2**: p. S26-35, 2015.
7. Goldhirsch, A., et al., *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. Ann Oncol. **24**(9): p. 2206-23, 2013.
8. Kreso, A. and J.E. Dick, *Evolution of the cancer stem cell model*. Cell Stem Cell. **14**(3): p. 275-91, 2014.
9. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature. **414**(6859): p. 105-11, 2001.
10. Badve, S. and H. Nakshatri, *Breast-cancer stem cells-beyond semantics*. Lancet Oncol. **13**(1): p. e43-8, 2012.
11. Valent, P., et al., *Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details*. Nat Rev Cancer. **12**(11): p. 767-75, 2012.
12. Gotoh, N., *Potential Signaling Pathways Activated in Cancer Stem Cells in Breast Cancer. In Cancer Stem Cells Theories and Practice*. 2011.
13. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. **100**(7): p. 3983-8, 2003.
14. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev. **17**(10): p. 1253-70, 2003.
15. Ablett, M.P., J.K. Singh, and R.B. Clarke, *Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic?* Eur J Cancer. **48**(14): p. 2104-16, 2012.
16. Hinohara, K., et al., *ErbB receptor tyrosine kinase/NF-kappaB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A. **109**(17): p. 6584-9, 2012.
17. Murayama, T., et al., *Oncogenic Fusion Gene CD74-NRG1 Confers Cancer Stem Cell-*

- like Properties in Lung Cancer through a IGF2 Autocrine/Paracrine Circuit. Cancer Res.* **76**(4): p. 974-83, 2016.
18. Tominaga, K., et al., *Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells.* *Oncogene*, 2016.
  19. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono, *TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology.* *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **8**(5) , 2016.
  20. Massague, J., *TGFbeta in Cancer.* *Cell.* **134**(2): p. 215-30, 2008.
  21. Massague, J., *TGFbeta signalling in context.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**(10): p. 616-30, 2012.
  22. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.* *Nature.* **425**(6958): p. 577-84, 2003.
  23. Bauskin, A.R., et al., *Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer.* *Cancer Res.* **66**(10): p. 4983-6, 2006.
  24. Bootcov, M.R., et al., *MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(21): p. 11514-9, 1997.
  25. Fairlie, W.D., et al., *MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation.* *J Leukoc Biol.* **65**(1): p. 2-5, 1999.
  26. Welsh, J.B., et al., *Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(6): p. 3410-5, 2003.
  27. Johnen, H., et al., *Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1.* *Nat Med.* **13**(11): p. 1333-40, 2007.
  28. Unsicker, K., B. Spittau, and K. Krieglstein, *The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1.* *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**(4): p. 373-84, 2013.
  29. Corre, J., B. Hebraud, and P. Bourin, *Concise review: growth differentiation factor 15 in pathology: a clinical role? Stem Cells Transl Med.* **2**(12): p. 946-52, 2013.
  30. Eling, T.E., et al., *NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis.* *J Biochem Mol Biol.* **39**(6): p. 649-55, 2006.
  31. Li, C., et al., *GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer.* *Oncotarget.* **7**(1): p. 860-72, 2016.
  32. Urakawa, N., et al., *GDF15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways.* *Lab Invest.* **95**(5): p. 491-503, 2015.
  33. Joshi, J.P., et al., *Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2*



- phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells.* Biochem Pharmacol. **82**(9): p. 1090-9, 2011.
34. Kim, K.K., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells.* Carcinogenesis. **29**(4): p. 704-12, 2008.
  35. Wollmann, W., et al., *The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells.* Carcinogenesis. **26**(5): p. 900-7, 2005.
  36. Lewitzky, M. and S. Yamanaka, *Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors.* Curr Opin Biotechnol. **18**(5): p. 467-73, 2007.
  37. Eyre, R., et al., *Patient-derived Mammosphere and Xenograft Tumour Initiation Correlates with Progression to Metastasis,* in *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* p. 99-109. 2016.
  38. Corre, J., et al., *Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma.* Cancer Res. **72**(6): p. 1395-406, 2012.
  39. Park, Y.J., H. Lee, and J.H. Lee, *Macrophage inhibitory cytokine-1 transactivates ErbB family receptors via the activation of Src in SK-BR-3 human breast cancer cells.* BMB Rep. **43**(2): p. 91-6, 2010.
  40. Martinez, J.M., et al., *Drug-induced expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene/macrophage inhibitory cytokine-1/prostate-derived factor, a putative tumor suppressor, inhibits tumor growth.* J Pharmacol Exp Ther. **318**(2): p. 899-906, 2006.
  41. Murohashi, M., et al., *Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells.* Br J Cancer. **102**(1): p. 206-12, 2010.
  42. Brown, D.A., et al., *MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma.* Clin Cancer Res. **9**(7): p. 2642-50, 2003.
  43. Staff, A.C., et al., *Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer.* Gynecol Oncol. **118**(3): p. 237-43, 2010.
  44. Sato, T., et al., *FRS2alpha regulates Erk levels to control a self-renewal target Hes1 and proliferation of FGF-responsive neural stem/progenitor cells.* Stem Cells. **28**(9): p. 1661-73, 2010.
  45. Tanno, T., et al., *Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells.* Blood. **123**(5): p. 725-33, 2014.