

論文審査の要旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

黒田 貴子

主論文の題目
および

掲載誌・審査委員

題目 Doxycyclin 誘導性 ER α 陽性 BRCA1 枯渇ヒト乳腺細胞の樹立

掲載誌 聖マリアンナ医科大学雑誌 2015;43:151-162

主査 遊道 和雄

副査 熊井 俊夫

副査 藤井 亮爾

[論文の要旨・価値] Breast and ovarian cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) 遺伝子の生殖細胞系列変異は家族性乳癌および卵巣癌の主要因の一つで、この BRCA1 変異による発癌は乳房と卵巣のみに臓器特異的にみられるが、その発癌機序は未だは解明されていない。これまでの報告から、発癌機序にはエストロゲンの関与が示唆されてきたが、BRCA1 機能不全により発症する Basal-like 型乳癌はエストロゲンレセプター(ER α)陰性であり、また、卵巣はエストロゲンの産生臓器であるが標的臓器ではなく、ER α の発現も低いことから、BRCA1 変異による発癌機序とエストロゲンとの関連については、さらに詳解を要するとされている。しかし最近になって、① Basal-like 乳癌の発生母地が ER α 陽性の乳腺上皮管腔前駆細胞由来であること、② 手術時検体の病理所見から、卵巣癌と考えられていた癌が ER α 陽性の卵管より発生する可能性のあることが指摘され、BRCA1 不全による発癌にはエストロゲンが重要な役割を担うことが再確認された。

BRCA1 の主要機能は遺伝子の恒常性維持であり、DNA二本鎖切断をエラーなく修復するための相同組替え修復に必須の役割を持つことから、学位申請者はBRCA1 不全による遺伝子不安定性を促進することにER α が関与すると仮説し、これを解明するためER α 陽性細胞株を用いた解析計画を立案した。しかし、乳腺については株化されたER α 陽性細胞株が未だないことから、本研究において申請者は、遺伝子工学的的手法 [doxycyclin (Dox)によるtet-on/offシステム]を用いてER α 陽性BRCA1 枯渇ヒト乳腺細胞株を樹立した。Tet-on/offシステムとはテトラサイクリン誘導体Doxを投与することで細胞に可逆的に目的遺伝子の発現を調節する実験系で、テトラサイクリン耐性オペロンで働くTetリプレッサー (TetR) とTetオペレーター配列(tetO配列)を利用し、TetRはテトラサイクリン非存在下でtetO配列に結合するが、テトラサイクリン存在下tetO配列に結合できないという性質を応用し、テトラサイクリン誘導体Dox処理により目的遺伝子発現を誘導/抑制 (tet-on/off) するものである。

実験では、ER α 陰性の正常乳腺細胞株である MCF10A を基に、tet-on/offシステムによって Dox 誘導性 ER α 陽性 BRCA1 枯渇細胞が作成された。この株細胞における ER α および BRCA1 の発現は western blot 法で、細胞内局在は蛍光免疫染色法、mRNA の発現は RT-qPCR、細胞増殖能は Cell-titer blue 法で評価され、Dox 誘導により BRCA1 の発現が抑制されると同時に ER α が発現されることが確認された。

さらに申請者は、細胞増殖能を指標として BRCA1 枯渇時における ER α の影響を検討した。その結果、Dox 誘導 ER α 陽性 BRCA1 枯渇細胞では ER α 陰性 BRCA1 枯渇細胞に比べて有意に増殖能が低下していたことから、BRCA1 が機能しない細胞においては ER α によって細胞増殖抑制または細胞死が起こる可能性について考察した。本研究は、BRCA1 変異による発癌の機序を解明するために必要な株細胞を樹立し、かつ重要な細胞特性を明らかにしたもので、学位論文に値すると評価した。

[審査概要] 学位審査は、平成 28 年 2 月 4 日に主査・副査および数名の陪席者を伴って、申請者による約 30 分間のプレゼンテーションの後、審査員から研究目的、臨床的意義、実験方法上の問題点、研究データの解釈、考察の妥当性および今後の展望についての約 25 分間の質疑応答により行なわれた。申請者はこれらの質問に懇切丁寧に明確に回答し、研究分野及び周辺領域について深い知識を持ち、さらに専門性を広げていきたいという意欲が感じられた。英文読解力は、指定した英文文献の和訳によって評価したところ、十分な能力があると判断した。以上より、学位授与に値すると判定した。

最終試験結果の要旨

[研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価]

研究遂行能力は十分あり、当該研究領域の今後の課題の検討、さらには将来展望についても明確な考えを示すことができ、高い研究能力、専門知識と語学力を十分に有するものと判断した。