OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ligand-dependent transcriptional heterogeneity in cell cycle commitment
Author(s)	Febri, Ririn Rahmala
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/107162
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （Ririn Rahmala Febri）	
Title	Ligand-dependent transcriptional heterogeneity in cell cycle commitment （細胞周期進行におけるリガンド依存的な転写不均一性についての研究）

Abstract of Thesis

Human epidermal growth factor 2 (HER2, also known as ErbB2) is amplified in about 20-30% of breast cancers and linked to aggressive growth. As a key regulator of cell proliferation, ErbB2 promotes progression through the G1/S transition, a crucial checkpoint for DNA replication and division. Unlike other ErbB members, ErbB2 lacks a direct ligand and depends on heterodimerization with ligand-activated ErbB receptors for signaling. Different ligands engage specific receptor complexes and pathways, potentially causing varied proliferative responses. Still, how ligand identity affects cell cycle commitment and transcriptional programs in ErbB2-amplified breast cancer remains unclear. This study examined how epidermal growth factor (EGF) and heregulin (HRG) regulate cell cycle progression in ErbB2-amplified BT474 breast cancer cells. Cell cycle dynamics were measured with FUCCI live-cell imaging, while signaling and transcriptional regulation were analyzed using time-course western blotting and single-cell RNA sequencing. The focus was on how ligand-specific signaling affects cell cycle entry and transcriptional heterogeneity.

Unexpectedly, EGF promoted faster cell cycle progression than HRG. Single-cell tracking showed EGF cells crossed the restriction point and entered S phase about three hours earlier (13.2 h vs. 16.2 h). This was surprising because HRG activates ErbB3 complexes, considered potent signaling units. Stronger receptor signaling did not speed up cell cycle entry, implying that the timing of downstream signaling, not strength, determines proliferation. Biochemical analyses showed ligand-dependent signaling differences: EGF caused rapid ERK activation and higher c-FOS expression, while HRG resulted in sustained AKT phosphorylation. These patterns correlated with distinct cell cycle regulator activation: EGF triggered earlier E2F activation, and HRG caused delayed but larger increases. Analysis of transcription factor activity further shows that EGF and HRG activate different regulatory programs: EGF mainly activates FOS networks, while HRG boosts MYC activity.

Single-cell transcriptomic analysis showed an additional layer of divergence between the two signaling states. HRG stimulation caused greater transcriptional heterogeneity than EGF, especially among G1/S progression genes. Variance analysis found higher variability at key regulators like CCND1 and CDK4 with HRG. Notably, this increase in transcriptional variability was not accompanied by a loss

of regulatory organization. Instead, gene network analysis showed stronger co-expression and connectivity among cycle genes. HRG simultaneously increased transcriptional heterogeneity while reinforcing network-level coordination, suggesting it promotes coordinated fluctuations rather than random noise. Conversely, EGF caused lower variability and rapid cell cycle progression, indicating a deterministic proliferation mode. Overall, EGF encourages efficient cell cycle commitment via ERK-FOS, while HRG creates a MYC-associated state characterized by elevated heterogeneity, extensive network rewiring, and delayed cell cycle commitment.

Collectively, this study demonstrates that ligand-dependent ErbB2 signaling governs not only the timing of cell cycle progression but also the transcriptional architecture underlying proliferative decision-making. The findings challenge the assumption that stronger receptor activation necessarily results in faster proliferation and instead highlight the importance of signaling dynamics, regulatory network organization, and transcriptional heterogeneity in determining cellular response. These results provide new insight into how distinct ErbB ligands shape proliferative behavior in ErbB2-amplified breast cancer and reveal previously unrecognized links between growth factor signaling, cell cycle commitment, and transcriptional state transitions.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ Ririn Rahmala Febri ）

	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授	岡田　眞里子
	副査　教授	篠原　彰
	副査　教授	石谷　太

論文審査の結果の要旨

本研究では、ErbB2 陽性乳がん細胞において、異なる ErbB リガンドである EGF と HRG がリガンド特異的なシグナル伝達と転写制御を介して G1/S 期への細胞周期コミットメントを制御する機構を解析した。リガンド刺激後の時系列の FUCCI ライブセルイメージング、ウェスタンブロット、siRNA や阻害剤を用いた摂動実験、およびシングルセル RNA シーケンシングを統合し、シグナル動態、転写プログラム、細胞周期進行の関係を定量的に検討した。

その結果、ErbB2 をより強く活性化することが知られる HRG よりも、EGF 刺激の方が早期に G1/S 期の制限点を通過させることが明らかとなった。機能解析および摂動実験の結果、EGF 依存的な細胞周期進行は主として ERK 経路に依存する一方、HRG 誘導性の細胞周期進行には ERK 経路および AKT 経路の双方が関与し、とくに AKT 経路への依存性が高いことが示された。また、これらのシグナル伝達経路は、それぞれ FOS および MYC を中心とする異なる転写プログラムを制御し、リガンド特異的な G1/S 期進行に寄与することが示唆された。さらに、シングルセル解析の結果、EGF 依存的な FOS 活性化は HRG 依存的な MYC 活性化よりも早期に生じることが明らかとなり、MYC 活性化の遅延が HRG 刺激時における細胞周期進行の遅延に寄与する可能性が示された。一方、MYC 依存的な誘導遺伝子群では、FOS 依存的な遺伝子群と比較して発現の不均一性が顕著であった。加えて、遺伝子共発現解析により、MYC 制御下にある細胞周期関連遺伝子群では発現相関が低いことが示され、これらの遺伝子発現のタイミングに不調和が生じている可能性が示唆された。このような転写制御の不均一性は、HRG 刺激時における細胞周期進行遅延をさらに増強する一因であると考えられる。以上の結果から、本研究は、同一細胞種においても外的環境の違いに応じて異なる転写プログラムが誘導され、その結果生じる遺伝子発現の不均一性が細胞周期進行の差異を規定することを明らかにした。

審査においては、本研究結果の生物学的意義、特に HRG 誘導性の MYC 転写プログラムにおいて観察された転写の不均一性を生じさせるメカニズムや遺伝子発現の相関、解析結果の解釈等について詳細な議論が行われた。本論文の主要な貢献は、一見して同一集団と想定される培養細胞株においても、異なる環境下において異なる転写因子を活性化し、それが細胞周期進行のタイミングや遺伝子発現のばらつきの違いを生み出すことを定量的かつ統計的に提示した点にある。特に AKT-MYC 軸は、多くのがんで薬剤に対する抵抗性との関連が指摘されていることから、この軸によって生じる遺伝子発現の不均一性に関する所見は、今後の薬剤抵抗性研究への発展や応用展開が十分期待できる。これらの議論の結果、本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。