

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19044

研究課題名(和文) 乳癌の脳転移における局所エストロゲン合成の仕組みの解明

研究課題名(英文) Local estrogen synthesis in brain metastasis of breast cancer

研究代表者

柴原 裕紀子 (Shibahara, Yukiko)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30645932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト乳癌の脳、肺、骨転移の病理組織標本を入手し、免疫染色を行った。通常のER, PR, HER2, Ki-67のほか、エストロゲン合成酵素についても検討し、原発巣が入手できた症例については、原発巣と転移巣の比較を行った。本結果は第104回病理学会総会にて口頭発表している。In vitro実験はラットのアストロサイト、ヒトのアストロサイトの培養細胞を用いて、ヒト乳癌培養細胞との共培養を行い、RNAやサイトカインの抽出を行い、microRNA microarrayおよびサイトカインアレイを行った。増殖能や遊走能についても検討した。ここから主要なRNA, microRNAについて、追加検討している。

研究成果の概要(英文)：We collected metastatic tumor tissues from breast cancer patients. Metastatic sites included brain, lung and bone. Histopathological and immunohistochemical analysis of metastatic tumors was done. We reported these results at the 104 th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology. Next, we did in vitro studies using rat and human astrocytes and breast cancer cells. Astrocytes and cancer cells were cocultured and analyzed for proliferation. RNA and cytokines were measured using microRNA microarray and cytokine array. Further analysis is ongoing.

研究分野：乳癌病理学

キーワード：乳癌 病理学 遠隔転移 脳転移 エストロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌の初期発見、早期診断、早期治療が進む一方、転移性乳癌については、臨床的、基礎的にも依然として、未解明なメカニズムが多く、治療選択肢は限られている。

乳癌患者の約 30%は最終的に脳転移をきたし、数年以内に転移性腫瘍によって、死亡することが多い。乳癌患者の増加は社会的にも大きな問題であり、乳癌が 30-60 代の生産人口の女性に多くみられることから、乳癌をいかに転移させないか、いかに転移巣を有効に治療するかを研究することは社会的責務でもある。

一旦、脳転移をきたすと神経学的所見を呈することが多く、癌そのものを治療する以前に、症状を緩和する治療が優先されることも多い。つまり、ステロイドや抗けいれん薬等による症状の安定をはかる必要があり、その上で、手術療法、全脳照射を含む放射線療法にうつる。これらの治療をはじめられたとしても、従来の治療の有効性はさまざまな臨床研究の成果によって改善してはいるが、依然 curative といえるレベルに至る症例は少ないのが現実である。さらに Local therapy が有効であった症例では局所症状をコントロールしたのち、または同時進行性に化学療法やハーセプチンを主体とする systemic therapy に移るが、いまだ確立されたプロトコルはなく、化学療法そのものによる有害事象も懸念される。

乳癌が脳転移をきたすリスク因子には原発巣のサブタイプによるものが大きい。Triple-negative, HER2+, basal-like は脳転移をきたすリスクの高い乳癌である。これらのサブタイプでは初回診断時点ですでに脳に転移している例が多くあり、また、臨床的に明らかではない場合でも脳を含むその他の臓器に micrometastasis をきたしている例が多く認められる。

一方、乳癌はホルモン依存性腫瘍であることが知られ、ER 陽性乳癌は乳癌のなかでも予後の良好な腫瘍であるが、10 年以上、寛解状態が続いたのちに、転移で再発する例が認められることも事実である。臨床的に検知できるレベル以下の腫瘍量が micrometastasis として潜んでいたと推測される。乳癌の脳転移の研究は主に triple negative, HER2+ type を主体に行われており、ER 陽性乳癌の脳転移巣におけるエストロゲン合成メカニズムは明らかとなっていない。

ここで、micrometastasis が macrometastasis に至るにあたって、癌転移巣で腫瘍微小環境が重要な役割を果たすと考えられるようになった。さらには、癌細胞をターゲットする従来の化学療法では治療効果が不十分な症例が多くみられるようになり、癌細胞を取り巻く環境の重要性が知られるようになった。なかでも癌周囲間質は癌細胞を取り囲む環境の中で、もっとも大きな

proportion を占め、癌の転移だけでなく、発癌～浸潤～脈管侵襲に至る一連のプロセスにおいて、重要な役割を果たすと考えられるようになった。

癌周囲間質は癌に対して、多種のシグナルによる影響を与えることで、腫瘍に好ましい環境を自ら作り上げる soil としての役割を果たしている。癌と癌周囲間質との相互作用により形成される集合体は『腫瘍微小環境』と称される。当研究室では、癌周囲間質(特に Cancer associated fibroblasts; CAFs)からの種々のサイトカインによって乳癌の局所エストロゲン産生を担うアロマトラーゼが誘導されることを報告し、アロマトラーゼが腫瘍抑制 microRNA として知られる let-7 により制御されていることを報告した(Shibahara et al., J Pathol, 2012)。

一方、乳癌の脳転移については、特殊な環境により特別な考察を要する。それは正常の脳に“間質”が存在しないとい点である。正常脳に存在する支持細胞は唯一アストロサイトのみである。本研究を始める予備段階として、ヒト乳癌の脳転移組織から作成した標本および免疫組織学的検討から、正常脳には存在しなかった間質細胞がヒト乳癌の脳転移組織に存在することを見出した。脳に転移した乳癌細胞の周囲には SMA(Alpha smooth muscle actin) 陽性を示す myofibroblast が認められたのである。この myofibroblast の由来については、いくつか考えられる。一つ、原発巣から脈管侵襲を経て、脳に至る際に、原発巣に存在した myofibroblast も癌細胞と一緒に運ばれてきた、二つ、脳の血管内皮細胞が endothelial-mesenchymal transition を経て、myofibroblast に形質転換した、三つ、乳癌細胞そのものが epithelial-mesenchymal transition を経て、myofibroblast に形質転換した。

さらに、免疫組織学的検討を行ったところ、GFAP(Glial fibrillary acidic protein)陽性となるアストロサイトが癌部内に見いだされ、時に癌細胞を取り囲むような形態を示すことも見出した。つまり、脳転移巣においては、CAF およびアストロサイトの両者が癌細胞に影響を与えている可能性が示唆されたのである。

これらの実験結果に基づき、乳癌原発巣同様、脳転移巣においても、CAF とアストロサイトにより構成される『腫瘍微小環境』が腫瘍の増殖や維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。脳転移巣における乳癌細胞と CAFs、乳癌細胞と astrocyte、CAF と astrocyte の 3 者間の相互関係について、未解明の点を検証する必要がある。

脳転移に対して手術・全脳放射線療法・ガンナイフ等の局所療法がある一定の効果を示す一方、近年は EGFR/HER2 inhibitor など、systemic therapy の可能性が breast cancer brain metastasis (BCBM)患者に対

して模索されつつある。Systemic therapy は BBB (blood brain barrier)により転移巣内の局所薬剤濃度の上昇が阻まれかつ、癌細胞が既に耐性を獲得していることが多いことから、課題は多い。脳転移についての知見は、estrogen receptor (ER)陽性乳癌は予後が他の subtype に比べ良好であること(Gil-Gil et al., Clin Transl Oncol, 2014)、原発巣で ER 陽性であっても、脳転移巣で ER を消失すること(Hoefnagel et al., Breast Cancer Res, 2010)が報告されている。

これに基づきわれわれは BCBM の増殖・進展に局所エストロゲン産生が関与するという仮説を立て、BCBM に対する内分泌療法の可能性について検討することを発案した。ER が脳転移巣において消失する機序は解明されておらず、BCBM における局所エストロゲン合成について未解明な点がほとんどである。また、閉経後 ER 陽性乳癌に対する第一選択薬、アロマターゼ阻害剤についても BCBM に対する効果は不透明で、症例報告を見るのみである。

本研究は BCBM における局所エストロゲン産生について、CAFs およびアストロサイトが果たす役割を明らかにし、サイトカインやエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ、エストロゲン関連 microRNA を主眼に、基礎的研究を行うことを目的とする。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では乳癌の脳転移における局所エストロゲン合成について基礎的研究を行うことを目的とする。

(1) ヒト乳癌組織(原発、脳転移巣)を用いた病理組織学的、免疫組織学的検討

脳転移に加えて、比較のため、肺転移、骨転移についても検討する。

(2) CAFs が乳癌培養細胞に与える影響についての検討

増殖能、遊走能への影響

共培養によるエストロゲン関連遺伝子や microRNA の発現解析

(3) アストロサイトが乳癌培養細胞に与える影響についての検討

ヒト乳癌脳転移巣から抽出したアストロサイトの初代培養の確立

増殖能、遊走能への影響

酵素活性(アロマターゼ)の測定

培養液中のサイトカインの測定:サイトカインアレイ

共培養によるエストロゲン関連遺伝子や microRNA の発現解析

## 3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌組織(原発巣、脳転移巣)を用いた病理組織学的、免疫組織学的検討

ヒト乳癌組織の原発巣と脳転移巣のペア約 100 例について、標本作製、Hematoxylin-Eosin 染色を行い、形態学的に、

腫瘍の分布や線維化・壊死の程度を評価する乳癌の subtype 分類のため、ER, PR, HER2, Ki-67 の免疫染色を行い評価し、原発巣と転移巣の相違点についても検討する

CAFs の同定のため、CD34, alphaSMA の免疫染色を行い評価する

アストロサイトの同定のため、GFAP の免疫染色を行い評価する

その他、CYP19A1(アロマターゼ)や血管新生マーカー(CD31, vasohibin, HIF-1 alpha 等)の免疫染色を行う

(2) CAFs が乳癌培養細胞に与える影響についての検討

すでに当研究室にて確立している CAFs の初代培養細胞株を用いて、癌細胞との共培養を行う。共培養による増殖能、遊走能に対する影響を検討する。共培養により変動する酵素やサイトカイン活性、microRNA についての基礎データは研究室に有しているが、必要に応じて、PCR array 等によって特定の microRNA についての verification を行う。

(3) アストロサイトが乳癌培養細胞に与える影響についての検討

ヒト乳癌の脳転移巣からアストロサイトの初代培養を確立する。具体的には手術で摘出された脳転移巣の腫瘍部を用いて、Trypsin-EDTA 処理後、カラムにて glial cells の mix を抽出する。約 1 か月の mixture の培養を続けた後に、40 μm 程度の pore を有する mesh を通してアストロサイトを単離し、初代培養を確立する。アストロサイトの確認は GFAP の免疫染色により行う。

アストロサイトと乳癌細胞を共培養する。共培養による増殖能、遊走能の変化を各種アッセイにより評価し、CAFs による影響と比較・検討する

アストロサイトにより誘導されるアロマターゼを含む酵素や液性因子の検討のため、酵素活性の測定やサイトカインアレイを行う

アストロサイトとの共培養が乳癌細胞にもたらす RNA, microRNA の変化について global microarray を行う。この結果は研究室に保有する array データおよび internet 上で閲覧できる microarray database 等を用いて、CAFs で変動する RNA/microRNA とアストロサイトで変動する RNA/microRNA を比較する

これらの RNA, microRNA のうち、エストロゲン関連 RNA, microRNA をクラスター解析により抽出し、有意に変動した RNA/microRNA について real-time PCR 法を用いた詳細な検討を行う。具体的には、siRNA を用いてエストロゲンの局所合成や増殖能に与える影響について検討する

サイトカインアレイ、microRNA microarray の結果を合わせ、アストロサイトによるアロマターゼの誘導等、局所エストロゲン合成への関与について、免疫組織化学、real-time PCR 等で検証する

#### 4. 研究成果

ヒト乳癌のリンパ節、脳、肺、骨転移の病理組織標本を入手し、免疫染色を行った。当初の予定より少なくなったが、脳転移 60 例について免疫組織学的検討を行った。免疫染色では通常の ER, PR, HER2, Ki-67 のほか、CD34,

SMA, CYP19A1 などエストロゲン合成酵素についても検討し、原発巣が入手できた症例については、原発巣と転移巣の比較を行った。

免疫染色の結果を解析した結果、転移巣の多く(90%程度)が原発巣同様、間質細胞における CD34 消失、SMA 発現を示すことが分かった。特に、脳転移については全例で SMA 陽性間質細胞が認められたことが興味深い。その他の臨床病理学的因子との比較を行ったところ、リンパ節、肺、骨転移巣では SMA 発現が高い例ほど腫瘍細胞の Ki-67 (増殖能マーカー)発現が有意に高いことがわかった。一方、脳転移巣においては、SMA の陽性率と Ki-67 陽性率の間に相関関係は認められず、CAFs 以外のもう一つの腫瘍微小環境を形成するアストロサイトが脳転移巣に影響を与える可能性が考えられた。

一方で、ER (エストロゲン受容体)についても興味深い結果が得られている。リンパ節、肺、骨転移巣においては、SMA の発現と ER 発現の間に有意な相関関係は認められなかった。しかし、脳転移巣では SMA が高いほど、ER 発現が高いことがわかった。

脳転移巣では SMA とエストロゲン受容体、増殖能の間に、他の転移巣とは異なる機序が存在していることが以上の結果から示唆され、その異なる原因の一つがアストロサイトであるとわれわれは推測した。

ここまでの免疫染色に結果は第 104 回病理学会総会にて口頭発表しており、その後の解析結果も合わせて、論文を執筆中である。

次に、ヒト乳癌脳転移の手術症例について、形態学的検討を行った。脳転移で手術検体として提出されるものは腫瘍本体 + 壊死からなるものがほとんどで、正常脳部分はわずかにしか含まれない。また、形態像のみで CAFs と astrocyte を判別するのは難しく入り混じっていることも多いことがわかった。よって、脳転移巣に含まれるアストロサイトのみを分離し、初代培養するのに十分なアストロサイトを得ることが困難であった。よって、当初予定していた癌周囲アストロサイトの初代培養を断念することになった。

代替の方法として、当研究室が得意とする Laser capture microdissection という手法を用い、脳転移症例数例に対して、行うこととした。これは光学顕微鏡での観察下のもと、病理医が腫瘍部分とその他の部分を判別し、切り分ける方法である。これによって、乳癌細胞とその周囲細胞とを分けることが可能にはなり、それぞれから RNA を抽出した。しかし、その他の周囲細胞には CAFs もアストロサイトも含まれており、この 2 者を分ける

ことは非常に困難であったため、次なる方法を模索することとなった。

アストロサイトのみを脳転移巣部分から単離することが非常に困難となったため、通常のアストロサイトを使用することとした。腫瘍関連アストロサイトについては、今後引き続き、検討する必要がある。

まず、市販されているラットのアストロサイトを培養した。そして、間質細胞で行った方法と同様の方法を用いて共培養を行った。この方法では、二種の細胞を上下別のチャンバーに培養するため、アストロサイトが癌細胞に与える影響、癌細胞がアストロサイトに与える影響について、検討することができた。増殖能や遊走能について、各種アッセイを行った。

続いて、同様の実験を市販されているヒトのアストロサイトの培養細胞を用いて、ヒト乳癌培養細胞との共培養を行った。乳癌細胞についてもエストロゲン陽性株、陰性株、HER2 陽性株をそれぞれ培養し、比較検討した。ラットのアストロサイトと同様に、癌細胞がアストロサイトに与える影響、アストロサイトが癌細胞に与える影響について、2 通りの培養の組み合わせを行った。それぞれの増殖能、遊走能について、検討した。間質細胞が癌細胞に与える影響と相反する結果が、アストロサイトが癌細胞に与える影響において認められた。

次にそれぞれ、共培養された癌細胞から RNA を抽出した。RNA については、microRNA microarray を施行し、有意な変動を示した microRNA について、target RNA を含め、現在追加検討を行っている。さらに、共培養された培養液を用いて、サイトカインの抽出を行い、サイトカインアレイも行っている。ここから主要な RNA, microRNA について、追加検討している。

今後、ここまですえられたデータをもとに、さらなる解析、実験を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

第 104 回 日本病理学会総会 口頭発表

Yukiko Shibahara, Yasuhiro Miki, Hiroaki Takahashi, Yasuhiro Nakamura, Takashi Suzuki, Hiroyoshi Suzuki, Mika Watanabe, Hironobu Sasano

Stromal fibroblasts in primary and metastatic breast cancer:

An immunohistochemical study

(乳癌の原発および転移巣における線維芽細胞について-免疫組織学的検討-)

2015年5月2日  
名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴原 裕紀子 (Yukiko Shibahara)  
東北大学・大学病院・医員  
研究者番号：30645932

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )