

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21438

研究課題名(和文) 難治性乳癌モデルマウスを用いた乳癌幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of breast cancer stem cells using mammary tumor model mice

研究代表者

山本 瑞生 (YAMAMOTO, MIZUKI)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90750365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では既存の分子標的治療法がなく予後が悪いトリプルネガティブ乳癌(TNBC)の腫瘍内に少数存在し腫瘍の悪性化に重要な乳癌幹細胞の性質や維持機構の解明を目指した。p53欠損乳腺上皮細胞に癌遺伝子Rasを導入して形成されるTNBCでは一部の細胞が乳癌幹細胞の産生に密接に関わる上皮間葉転換(EMT)を起こし、上皮様と間葉様細胞が共存していた。ヒト乳癌細胞株や乳癌臨床検体においても同様の現象が見られ、両乳癌細胞がお互いにEMTとその逆反応であるMETを促進していることが明らかとなり、このバランスの破壊が新たな乳癌治療法の開発に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is a heterogeneous disease classified into two biological subtypes. Basal-like subtype breast cancer, which is ER-, PR-, ERBB2- (TNBC) phenotype, shows higher malignancy than luminal type, and exhibits poor prognoses against various methods of therapy. In this study, we focused on the cancer stem cells (CSC), a malignant sub-population in the tumor. Using activated Ras and p53 knockout mammary epithelial cells, we found that a portion of cancer cells undergo epithelial to mesenchymal transition (EMT), one of mechanism of CSC generation. Therefore, we analyzed the mechanism of EMT and MET and demonstrate that the two populations significantly enhance the transition of cells from the other population to their own. We also demonstrate that primary breast cancer cells underwent EMT. Further studies to elucidate the molecular mechanisms governing the dynamic EMT and MET observed in breast cancer cells must be pursued to develop effective therapeutic strategies against TNBC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：乳癌 癌悪性化 癌幹細胞 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

[乳癌のサブタイプ分類と現在の治療戦略]

乳癌は遺伝子発現プロファイルによって5つのサブタイプ (Luminal-like, ERBB2-enriched, Basal-like, Claudin-low, Normal-like) に分類される。乳癌の約7割を占める Luminal-like 乳癌は生存や増殖をホルモン受容体 ESR や PGR 下流のシグナルに依存しており受容体のアンタゴニストが有効で、予後が比較的良好。約2割を占める ERBB2-enriched 乳癌は癌遺伝子 ERBB2 (HER2) の遺伝子増幅により発生し、ERBB2 下流の増殖シグナルに依存している。抗 ERBB2 抗体 Herceptin は乳癌細胞の膜上に過剰発現した ERBB2 と結合し、免疫細胞による抗体依存的な細胞傷害活性を誘導して抗腫瘍効果を示す。一方でこれらの治療標的を発現しない TNBC は約1割の乳癌患者に見られ、Basal-like, Claudin-low, Normal-like 乳癌が含まれる。現在までに TNBC に対する分子標的治療法は存在せず主に化学療法が用いられるが、比較的效果が見られる群と見られない群が存在し、後者は転移率や術後の再発率が高く予後が悪い。このため TNBC の中でも大半を占める Basal-like 乳癌の悪性化機序の解明とそれに基づいた新規治療標的の発見が望まれている。

[癌幹細胞仮説と乳癌におけるその実態]

1970年代に癌組織のうち一部の細胞が幹細胞のように振舞い癌組織を構築する能力を持ち、発がんや転移、再発に重要な役割を担うという「がん幹細胞仮説」が提唱された。その後 FACS による single cell を対象とした細胞分離や機能解析が可能となり、様々な癌腫においてこの仮説が証明された。1997年に AML 細胞において CD34+, CD38-細胞のみがマウスへの移植で AML を再現することが報告され、がん幹細胞の存在が示された (Bonnet D, Nature Medicine, 1997)。乳癌においても2003年に Al-Hajj らが乳癌細胞のうち少数の細胞集団 (CD24-, CD44+, EpCAM+) にのみ腫瘍形成能があることを示し、この集団を乳癌幹細胞として報告した (Al hajj, PNAS, 2003)。

[Basal-like 乳癌モデルマウスとしての C3-SV40TAg トランスジェニックマウスの利用]

Rat C3 ペプチドプロモーターの下流で SV40T 抗原を発現する C3-SV40TAg トランスジェニックマウス (C3 マウス) のメスは12週令において乳腺管腔内を癌細胞が埋める DCIS 様の形態を経て20週令前後で全例のマウスにおいて浸潤性乳癌が形成され (Maroulakou IG, PNAS, 1994)、ヒト Basal-like 乳癌の発生段階との類似が見られる。また様々なマウス乳癌モデルとヒト臨床検体の発現プロファイルと比較した研究において C3 マウス由来の

乳癌は全例が Basal-like 乳癌に類似した発現プロファイルを示す (Herschkowitz JI, Genome biology, 2007)。さらに我々は C3 マウスの乳腺上皮細胞ではヒト Basal-like 乳癌の起源と考えられている Luminal 前駆細胞において T 抗原が高発現していることを明らかにしており、C3 マウスはヒト Basal-like 乳癌と同じ起源の細胞から同じプロセスを経て高頻度に乳癌が形成される解析に適したモデルと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では細胞株では解析が困難な腫瘍内における乳癌幹細胞維持機構のより詳細な解析を目指し Basal-like 乳癌モデルマウスの乳癌幹細胞を同定し、その性質と腫瘍内における維持機構を解析し、新規治療法標的の発見を目的とした。

3. 研究の方法

C3 マウス由来の乳腺腫瘍中の乳癌幹細胞を同定・濃縮するために乳癌細胞を表面抗原を指標として FACS によって分離した。分離した癌細胞をマウス乳腺へ同所性移植し高い腫瘍形成能を持つ乳癌幹細胞画分を同定した。また、同様の手法で p53 欠損マウスに癌遺伝子 Ras を導入した乳癌についても解析を行い、マウス体内で発生した乳癌腫瘍における癌細胞集団の性質を分類した。p53 欠損マウスに癌遺伝子 Ras を導入した乳癌では癌細胞の一部が癌の転移や癌細胞性に重要であることがこれまでに報告されている上皮間葉転換を起こしていることが分かったため、乳癌細胞株を用いてその機構を解析した。

4. 研究成果

[C3 マウス由来乳癌の表面抗原による分画と腫瘍形成能の解析]

C3 マウス由来の乳癌の解析を行うにあたって我々は正常乳腺上皮細胞の分化マーカーの利用を検討した。正常乳腺上皮細胞は CD24, CD49f によって CD24 を高く発現する Luminal 細胞と、CD49f を高く発現する Basal 細胞に分画できる。これらのマーカーについて C3 マウス由来乳癌の発現を調べたところ、全例で CD24, 49f を中程度に発現する単一の集団となることが分かった。次に、正常 Luminal を更に Luminal 前駆細胞と成熟 Luminal 細胞に分画可能な成熟マーカー Scal と未分化マーカー CD61 について検討を行ったところ、興味深いことに、正常 Luminal 細胞では CD61 陽性の Luminal 前駆細胞と Scal 陽性の成熟 Luminal 細胞に分画出来ること、C3 マウス由来の乳癌の一部では腫瘍細胞全体が CD61 陽性でありながら、Scal を発現する細胞と発現しない細胞が混在していた。このことは少なくとも C3 マウス由来乳癌の一部の腫瘍では腫瘍細胞全体が CD61 という未分化マーカーを発現したまま、一部が成熟マ

ーカ-Scal を発現するという正常細胞とは異なる分化系譜を持っている可能性が示唆された。そこで Scal 発現の有無で C3 マウス由来乳癌をセルソーターを用いて分取し、免疫不全状態のヌードマウスの乳腺付近の皮下に移植して腫瘍形成能の違いを解析した。1000 細胞、もしくは 10000 細胞を移植した力所において二か月後までに全例で腫瘍が形成されたが、腫瘍サイズの経時的变化を検討したところ、Scal 陰性の細胞を移植した力所では優位に腫瘍サイズが増加しており、最終的な腫瘍サイズも Scal 陽性由来の乳癌と比べて約 2 倍になっていた。このことは乳癌細胞にも正常細胞と同様の Scal 発現による分化系譜が存在し、分化が進んだ Scal 陽性細胞では腫瘍形成能が低下した可能性が示唆された。しかしながら C3 マウス由来の乳癌からは Scal 陽性細胞が存在しない腫瘍も見つかっており、必ずしも Scal 発現亢進を伴う腫瘍細胞の分化が促進されるわけではないことも分かった。今後さらに Scal 発現と乳癌細胞の分化、癌幹細胞性の変化について解析を進める必要がある。

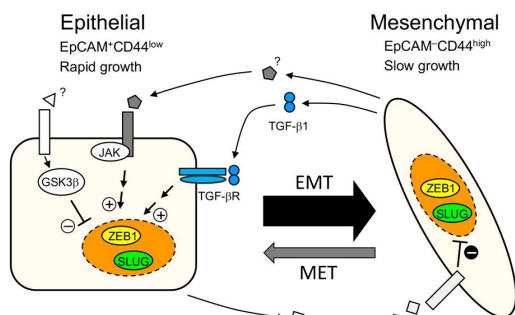
[p53 欠損乳癌上皮細胞における癌遺伝子 Ras 導入乳癌の分画と性質の解析]

我々は次に、p53 欠損乳癌上皮細胞に癌遺伝子 Ras(V12G)を導入することで形成される乳癌について検討を行った。この乳癌もホルモン受容体を発現せず、ERBB2 の高発現を伴わない TNBC の性質を持っていることが分かっている。p53 欠損乳癌上皮細胞から成熟 Luminal 細胞、Luminal 前駆細胞、Basal 細胞を分画し、それぞれに活性化型 Ras を導入してヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成を検討した。その結果、約 1 月で全例が Ras を強く発現する腫瘍を形成した。形成された腫瘍の性質の解析を目的として表面抗原の発現を調べたところ、興味深いことに Ras を発現する腫瘍細胞のなかに上皮マーカー EpCAM を発現する細胞と EpCAM を発現しない細胞が共存することが分かった。EpCAM の発現変化は上皮細胞が間葉系の細胞に変化する上皮間葉転換(EMT)の可能性が示唆されたため、EpCAM 陰性と EpCAM 陽性の画分の上皮マーカーや EMT 関連遺伝子について発現を調べた。その結果、EpCAM 陰性乳癌細胞では CLDN3 などの上皮マーカーの発現が顕著に低下していた一方で、SNAI2, ZEB1 などの EMT 誘導転写因子の発現が亢進しており、実際に EMT が起きていることが分かった。これまでに EMT は癌細胞の運動性を高めるだけでなく、免疫細胞による攻撃からの逃避や、抗癌剤抵抗性など様々な癌悪性化を誘導する機構が報告されており、EMT によって癌幹細胞が発生するという知見も示されている。そこで我々は TNBC の中で EMT を起こす機序と EMT を起こした間葉系細胞と EMT を起こしていない上皮細胞が共存する機構について解析を試みた。

[乳癌細胞における上皮間葉転換(EMT)とその逆反応 MET のバランス制御機構の解明]

p53 欠損マウス由来の乳癌と同様に、ヒト TNBC 細胞株の中にも一部の癌細胞が EMT を起こして EpCAM 陰性となっている例が存在することを我々は見出し、この細胞株を用いて解析を進めた。この HCC38 細胞株は約 90%の上皮様細胞と 10%の間葉系細胞から構成されており、継代を繰り返してもこの比率が大きく変化することはなかった。2 つの集団の細胞は増殖速度が大きくことなり、上皮様細胞は比較的増殖が速いが、間葉系細胞は 3 分の 1 程度の速度で増殖していることが分かった。そのため 2 つの集団が培養中に EMT/MET を起こして相互に変化しているという仮説を立て、まず最初に各細胞を分取した際の変化について解析を行った。その結果、EpCAM 陽性細胞からは EpCAM 陰性細胞が発生し、約 10 日間で元の割合まで増加するのに対して、EpCAM 陰性細胞からは比較的ゆっくりと EpCAM 陽性細胞が発生することが分かり、相互に EMT/MET を起こしていることが示唆された。さらに、それぞれの細胞に Venus を発現させて蛍光によって区別できるようにしたうえで、EpCAM 陽性の Venus 陽性細胞の EMT に対して EpCAM 陰性の Venus 陰性細胞が与える影響を検討した。その結果、EpCAM 陰性細胞を共培養することで EMT が促進されることが分かった。逆に EpCAM 陽性細胞との共培養によって EpCAM 陰性細胞の MET が促進されることも分かり、相互に EMT/MET を促進することでバランスを取っていることが示唆された。次にこの EMT/MET の機序を解析するために様々なシグナル伝達阻害剤の影響を解析した。その結果、TGFβ 中和抗体と JAK/STAT 阻害剤が EMT を抑制すること、GSK3β 阻害剤が EMT を促進することを見出した。さらに EMT 誘導転写因子のノックダウン解析からこの細胞の EMT には SNAI2 と ZEB1 が重要であり、EMT のマスター転写因子と言われている SNAI1 は関与しないことが示唆された。また、この乳癌細胞における EMT/MET による上皮様・間葉系細胞の共存は乳癌臨床検体の初代培養においても見られることが分かった。腫瘍検体から単離した乳癌細胞を無血清培地で培養すると上皮様の癌細胞の増殖が見られる。この細胞について継代培養を行い経時的な EpCAM 発現を解析したところ、継代を重ねることで EpCAM 陰性細胞が増加することが分かった。この際、CLDN3 などの他の上皮マーカーの発現も低下する一方、SNAI2 や ZEB1 といった EMT 誘導転写因子の発現亢進が見られ、乳癌検体由来の癌細胞においても EMT が起きていることが示唆された。さらに EMT の進展とともに TGFβ1 の発現亢進が起きていることが分かり、乳癌細胞株と同様に自身が産生する TGFβ のシグナルを介して EMT が起きていることが考えられる。上皮様細胞が活発に増殖して腫瘍を形成する一方で間葉系細胞

が運動能や抗がん剤抵抗性によって転移・再発を引き起こすという役割分担によって腫瘍が人体に悪影響を及ぼすと考えられている。



- ⊕ : Induce/activate ZEB1/SLUG to enhance EMT
- ⊖ : Repress/inactivate ZEB1/SLUG to inhibit EMT
- : Repress/inactivate ZEB1/SLUG to enhance MET

本研究から、乳癌内における EMT/MET のバランス制御は図に示すように相互に促進し合う、比較的不安定な機構で成り立っていることが明らかとなり、外部からの阻害剤などの刺激によってバランスを破壊することが可能である。今後、このバランスを破壊することが腫瘍の悪性化に与える影響を解析し、新たな治療法の開発に役立てたい。

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 1 件)

Yamamoto M., Sakane K., Tominaga K., Gotoh N., Niwa T., Kikuchi Y., Tada K., Goshima N., Semba K. and Inoue J.

Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer.

Cancer Sci. in press (2017).

[学会発表](計 5 件)

山本瑞生、井上純一郎

Non-Cell-Autonomous Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer、日本癌学会学術総会(2015年10月)

山本瑞生、井上純一郎、妊娠期の乳腺成熟および幹細胞維持における TRAF6 の役割、日本分子生物学会年会(2015年12月)

Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue, TRAF6 regulates pregnancy-induced mammary gland development and maintenance of epithelial stem cells, KEYSTONE SYMPOSIA (2016, Mar.)

Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue, Differential roles of NF-kappaB activation in mammary gland development and breast cancer malignancy, 日本癌学会学術総会(2016年10月)

山本瑞生、井上純一郎、TRAF6 は乳腺幹細胞の維持および乳腺上皮細胞の細胞死抑制

によって妊娠期の乳腺発達を促進する、日本分子生物学会年会(2016年12月)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 瑞生 (YAMAMOTO, Mizuki)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90750365