

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07665

研究課題名(和文) 新規の乳癌発癌モデル系による発癌・進行メカニズムの解明と予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel mouse early breast cancer induction model for studies of breast tumorigenesis and prevention

研究代表者

伊東 潤二 (Itou, Junji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：10638844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスで初期乳がんを誘導する実験系(初期乳がん誘導系)を確立し、乳がんの発生および初期の現象を研究することを目的とした。DNA修復能の低下とエストロゲン(E2、女性ホルモンのエストロゲンの一種)の連続投与(30日間)を組み合わせることで、マウスの乳管に、ヒトの初期乳がんで見られるような異形成を誘導することに成功した。また、この誘導系で異形成を抑える物質を探索したところ、イソフラボン類や発酵大麦エキスに初期乳がんを抑える効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、初期の乳がんをマウスで調べる実験系を確立した。それにより、乳がんの発生や初期の現象を研究できるようになった。そして、本研究はその実験系を使い、女性ホルモンのエストロゲンに起因する乳がんではMYC遺伝子が関わっていることを明らかにした。さらに、初期乳がんを抑える物質を探索し、イソフラボン類と発酵大麦エキスに、その可能性があることをみつけた。

研究成果の概要(英文)：To study early breast cancer, we aimed to establish mouse early breast cancer induction model. We successfully observed mammary dysplasia formation, which is also observed in human early breast cancer, when we daily injected E2, a female hormone, to mice having DNA repair deficiency for 30 days. We tested the effects of isoflavones and fermented barley extract in our early breast cancer induction model, and observed their preventive effects, suggesting that these materials have potentials of breast cancer prevention.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳がん マウスモデル エストロゲン 乳がん予防

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんの罹患率は高い。乳がん治療が進歩し続けているが、罹患率が上昇を続けているため、乳がんでの死亡者数は多い(引用文献①)。その解決の1つとして、予防法確立による罹患率の低下が挙げられる。しかし、乳がんの発生および初期は不明な点が多く、予防の研究が進んでいない。なぜなら、それを研究できるマウスモデル系がなかったからである。そこで、マウス初期乳がん誘導系の確立とその系での初期乳がん研究および予防の研究が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 本研究は、マウスの初期乳がん誘導系の確立を目的とした。
- (2) 確立したマウス初期乳がん誘導系で乳がんの発生および初期を調べることを目的とした。
- (3) 乳がんの発生や初期の進行の抑制が可能かどうかの検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養実験

エストロゲン(女性ホルモン)の受容体を発現している MCF-7 細胞(乳がん細胞)を ATCC より入手し、用いた。MCF-7 細胞の培養は、10% FBS、100 units/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、1 nM  $\beta$ -エストラジオール (エストロゲン的一种、E2) を含む RPMI-1640 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件で行った。

*PRKDC* 遺伝子の発現抑制には、shRNA を用いた。レンチウイルスベクター-pLKO.1 に *PRKDC* に対する shRNA 配列を組み込み、Lenti-X 293T 細胞でウイルス粒子を作製した。そのウイルス粒子で MCF-7 細胞を処理し、ピューロマイシンで導入細胞を選別した。

G1 期で DNA 二本鎖切断を調べるために、FBS 不含、E2 不含、フェノールレッド不含の培地で 24 時間の飢餓状態にした後、10 nM の E2 で刺激を与え、免疫染色で DNA 二本鎖切断のマーカーである gH2A.X を検出した。抗体は、Cell Signaling Technology 社の抗 gH2A.X 抗体(#2577S)を 200 倍希釈で用いた。

### (2) マウス実験

6~8 週齢のメスのマウスで実験を行った。日本クレア社より、C.B17/Icr 野生型および scid 変異マウスを購入した。日本 SLC 社より C57BL/6J マウスを購入した。腹腔内への薬剤の投与には、30G の針を用いた。投与した薬剤と濃度は次の通りである、E2 (6  $\mu$ g/day)、Progesterone (6  $\mu$ g/day)、Fulvestrant (100  $\mu$ g/day)、NU-7441 (100  $\mu$ g/day)、KJ-Pyr-9 (0.2 mg/day)、(s)-equol (6  $\mu$ g/day)、genistein (6  $\mu$ g/day)。発酵大麦エキス(FBE)は、8% w/w で RO 水に溶かしたものを給水で投与した。

解析は、マウスの第 4 乳腺で行った。組織染色のために、単離した乳腺を 10%ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製し、H&E 染色を行った。免疫染色のために、単離した乳腺を 4°C で、4% PFA で 15~20 分間固定し、洗浄後に 30%スクロースで処理し、凍結切片を作製した。乳腺全体の観察のために、4°C で、4% PFA で 2 時間固定し、Carmine 染色を行った。

免疫染色に用いた抗体は次の通りである、抗 gH2A.X 抗体(Cell signaling Technology、#2577S、1/200 希釈)、抗 CK8 抗体(DSHB、TROMA-I、1/200 希釈)、抗 CK5 抗体(Abcam、ab75869、1/200 希釈)、抗 PCNA 抗体(BioLegend、307912、1/20 希釈)。

全ての動物実験は所属機関の委員会で承認された後、NIH のガイドラインに従って行った。

## 4. 研究成果

### (1) E2 による DNA 二本鎖切断の検証

E2 により活性化したエストロゲン受容体が、核内で DNA 二本鎖切断を起こすことが知られている(引用文献②)。E2 刺激で DNA 二本鎖切断が起こるかどうかを調べるために、エストロゲン受容体陽性の乳がん細胞株 MCF-7 を用いた。G1 期で解析するために、MCF-7 細胞を 24 時間飢餓状態にした。その後、E2 で 2 時間刺激し、細胞を固定して免疫染色を行った。DNA 二本鎖切断のマーカーの gH2A.X を検出したところ、E2 投与でシグナルが増えていた(図 1A)。定量して評価するために、E2 で刺激後に 2 時間 E2 無しの培地で洗浄し、DNA 二本鎖切断の数を免疫染色で調べた(図

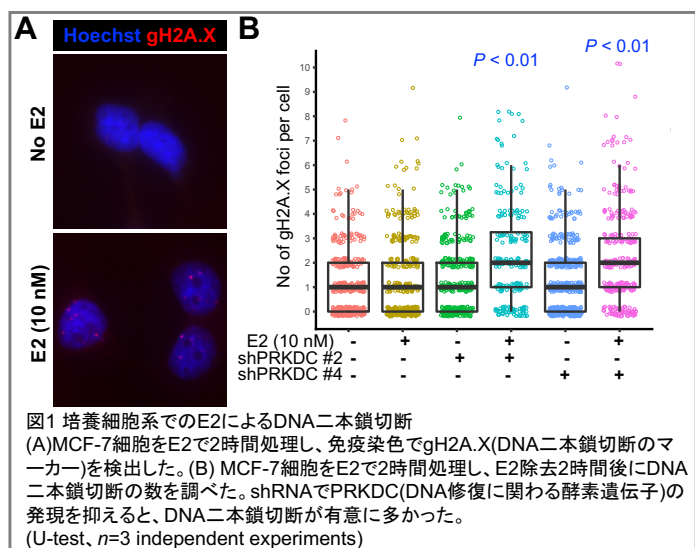


図1 培養細胞系でのE2によるDNA二本鎖切断 (A)MCF-7細胞をE2で2時間処理し、免疫染色でgH2A.X(DNA二本鎖切断のマーカー)を検出した。(B) MCF-7細胞をE2で2時間処理し、E2除去2時間後にDNA二本鎖切断の数を調べた。shRNAでPRKDC(DNA修復に関わる酵素遺伝子)の発現を抑えると、DNA二本鎖切断が有意に多かった。(U-test, n=3 independent experiments)

1B)。この条件では、E2 刺激で生じた DNA 二本鎖切断は修復され、E2 刺激無しのコントロールから変化がみられなかった。しかし、shRNA で DNA 修復に関わる酵素遺伝子 *PRKDC* の発現を抑制すると、DNA 二本鎖切断の有意な増加がみられた。これらの結果は、E2 で DNA 二本鎖切断が起こり、それが修復されることを示している。

E2 による DNA 二本鎖切断は、培養細胞系では確認されていたが、生体組織での観察の報告は少なかった。本研究は、*PRKDC* 遺伝子に変異を持ち、DNA 修復能が低下している *scid* マウスで、E2 による DNA 二本鎖切断を調べた(図 2)。E2 (6  $\mu$ g) を腹腔内投与し、6 時間後にマウスの乳腺を採取し、凍結切片で免疫染色を行った結果、*scid* マウスの乳腺上皮細胞(CK8 陽性)で gH2A.X シグナルが検出された。野生型では、gH2A.X 陽性の乳腺上皮細胞はほとんどみられなかった。

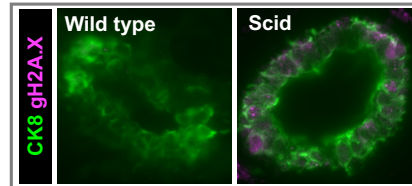


図2 マウス乳腺でのE2によるDNA二本鎖切断  
8~10週齢のマウスにE2(6 $\mu$ g)を腹腔内投与し、6時間後に乳腺組織を採取した。免疫染色で、CK8(乳腺上皮細胞のマーカー)とgH2A.Xを検出した。

以上のことから、E2 刺激により DNA 二本鎖切断が起こることが培養細胞系とマウス個体で確認できた(図 1A、2)。また、DNA 修復能が低下した状態では、E2 による DNA 二本鎖切断が残存することが示唆された(図 1B)。

## (2) Scid マウスへの E2 の連続投与で起こる乳管の変化

疫学研究より、乳がんの発生にエストロゲンが関わることを示唆されている(引用文献③)。また、乳がんリスクを上昇させる遺伝子変異の多くが DNA 損傷の認識や修復に関わるものである。本研究は、DNA 修復能が低下している *scid* マウスへの E2 の連続投与で、乳がんを誘導できるかもしれないと考えた。そして、*scid* マウスに E2 を 30 日間、毎朝投与し、乳管の形態を H&E 染色で観察した(図 3)。その結果、Scid+E2 群の乳管で二相性の喪失、核異型などの異形成がみられた。

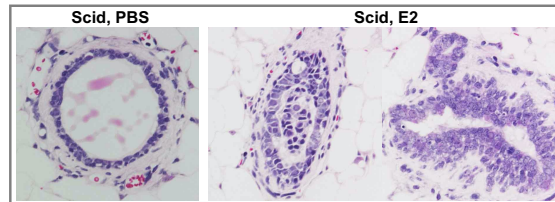


図3 Scid+E2連続投与でマウス乳腺に生じる変化  
マウスへのE2(6 $\mu$ g)の腹腔内投与を30日間行い、乳腺組織を採取した。H&E染色で組織形態を観察した。Scid+E2連続投与で、核異型や二相性の喪失がみられた。(n=6 mice)

浸潤性の乳腺上皮細胞の有無を調べるために、CK8(乳腺上皮細胞マーカー)と CK5(筋上皮細胞マーカー)で免疫染色をした(図 4A)。CK5 の層が破綻して CK8 陽性細胞が間質に浸潤している乳管断面の割合を評価した結果、Scid+E2 で微小浸潤を伴う異形成の頻度が増えていた(図 4B)。

Scid マウスの代わりに、野生型マウスの DNA 修復能を薬剤(NU-7441)で低下させた実験を行なった。Scid マウスと同様に、薬剤で DNA 修復能を低下させても、E2 の投与で異形成が観察された。

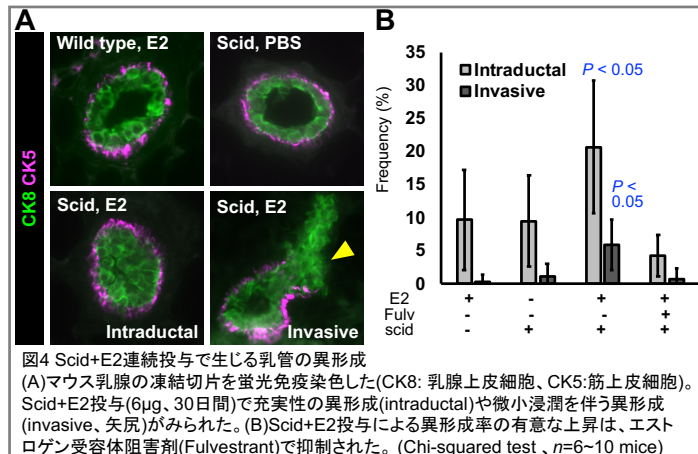


図4 Scid+E2連続投与で生じる乳管の異形成  
(A)マウス乳腺の凍結切片を蛍光免疫染色した(CK8: 乳腺上皮細胞、CK5:筋上皮細胞)。Scid+E2投与(6 $\mu$ g、30日間)で充実性の異形成(intraductal)や微小浸潤を伴う異形成(invasive、矢頭)がみられた。(B)Scid+E2投与による異形成率の有意な上昇は、エストロゲン受容体阻害剤(Fulvestrant)で抑制された。(Chi-squared test、n=6~10 mice)

ヒトの初期乳がんでも、図 3、4 のような表現型がみられる。そのため、以上の結果は、DNA 修復能の低下+E2 投与で、ヒトの初期乳がんの表現型をマウスに誘導できることを示している。

## (3) 誘導した初期乳がんでの細胞増殖

Scid+E2 で誘導した初期乳がん様の異形成で細胞増殖の活性化を調べるために、免疫染色で PCNA を検出した(図 5)。その結果、Scid+E2 で増殖している乳腺上皮細胞の割合が増加していた。乳腺組織全体の変化を調べるために Carmine 染色を行った(図 6)。その結果、対照群では乳管が滑らかであるのに対し、Scid+E2 群では、細かい隆起が複数みられた。これらの結果は、誘導したマウス初期乳がんが細胞増殖が活性化していることを示している。

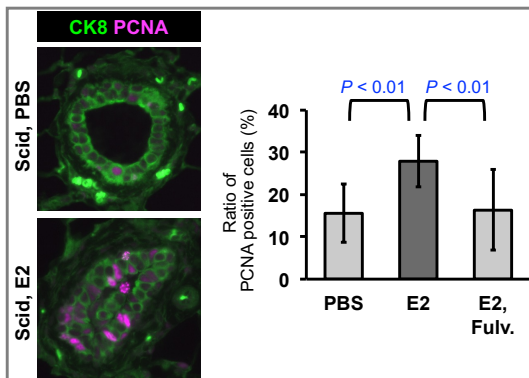


図5 誘導した乳管の異形成での細胞増殖  
マウス乳腺の凍結切片で、PCNA陽性細胞の割合を調べた。Scidマウスで、E2投与で増大し、Fulvestrantで抑えられた。(t-test、n=4 mice)

## (4) Myc の阻害による初期乳がんの抑制

エストロゲン受容体陽性細胞では、E2 で刺激すると Myc が発現することが知られている(引用文献④)。本研究でも、MCF-7 細胞で E2 による Myc の発現上昇を確認した(図 7A)。そして、図 1 の DNA 修復能低下の条件と同じ状態(shPRKDC の導入)で調べると、Myc の発現量が増大していた。マウス乳腺組織でも、*in situ* hybridization で、



Scid+E2 で Myc の発現上昇がみられた (図 7B)。

マウスの Scid+E2 の実験で、Myc 阻害剤 (KJ-Pyr-9) を投与した結果、PCNA 陽性細胞の割合の上昇が抑えられた (図 8)。また、Scid+E2 に比べ、Myc 阻害剤で浸潤性の異形成の頻度も低下した (図 9)。これらの結果は、Scid+E2 で誘導されるマウス初期乳がんの原因の一つが、E2 による Myc の発現上昇であることを示唆している。

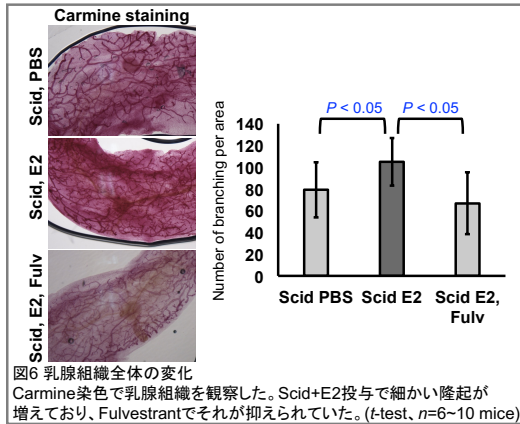


図6 乳腺組織全体の変化  
Carmine染色で乳腺組織を観察した。Scid+E2投与で細かい隆起が増え、Fulvestrantでそれが抑えられていた。(t-test, n=6-10 mice)

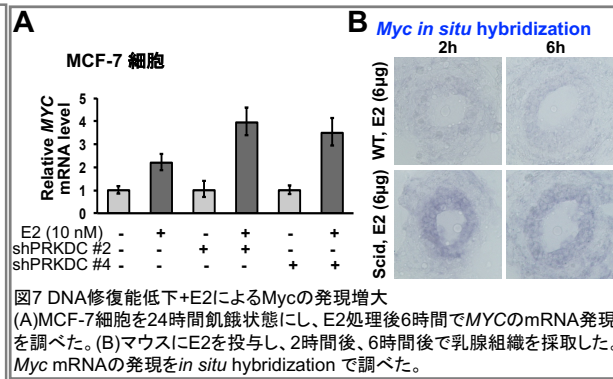


図7 DNA修復能低下+E2によるMycの発現増大  
(A)MCF-7細胞を24時間飢餓状態にし、E2処理後6時間でMYCのmRNA発現を調べた。(B)マウスにE2を投与し、2時間後、6時間後で乳腺組織を採取した。Myc mRNAの発現をin situ hybridizationで調べた。

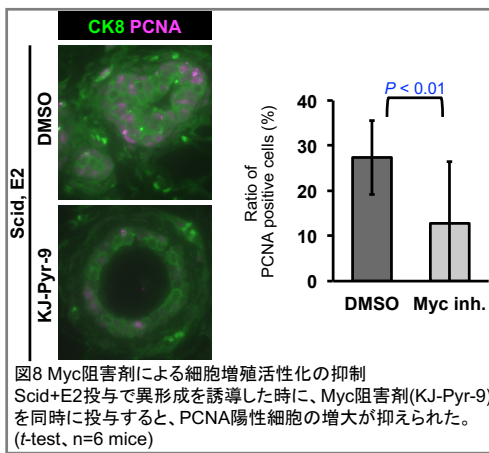


図8 Myc阻害剤による細胞増殖活性化の抑制  
Scid+E2投与で異形成を誘導した時に、Myc阻害剤(KJ-Pyr-9)を同時に投与すると、PCNA陽性細胞の増大が抑えられた。(t-test, n=6 mice)

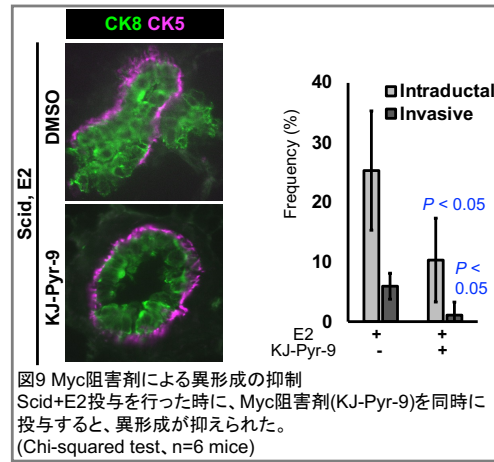


図9 Myc阻害剤による異形成の抑制  
Scid+E2投与を行った時に、Myc阻害剤(KJ-Pyr-9)を同時に投与すると、異形成が抑えられた。(Chi-squared test, n=6 mice)

### (5) 初期乳がん予防物質の解析

本研究で確立したマウス初期乳がん誘導系を用いることで、初期乳がんの発生や進行を抑える物質を評価できる。別の女性ホルモンであるプロゲステロン (PG) は、エストロゲンの活性を調整することが知られている (引用文献⑤)。しかし、個体に発生する乳がんに対する PG の働きは不明であった。本研究は、マウス初期乳がん誘導系で、PG が E2 による初期乳がん発生に影響するかを調べた (図 10)。その結果、PG を同時投与することで初期乳がんの発生頻度が低下した。この結果は、PG に初期乳がんを抑える効果があることを示している。

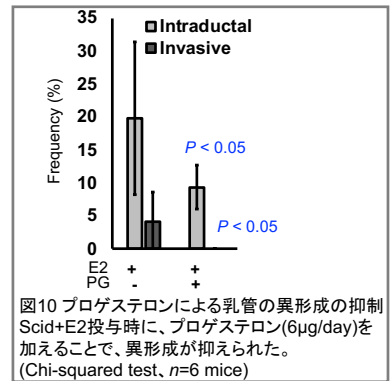


図10 プロゲステロンによる乳管の異形成の抑制  
Scid+E2投与時に、プロゲステロン(6μg/day)を加えることで、異形成が抑えられた。(Chi-squared test, n=6 mice)

疫学研究で、イソフラボン類の乳がん予防効果が示唆されていた (引用文献⑥)。しかし、実験的な証明はなかった。本研究のマウス初期乳がん誘導系でイソフラボン類の equol と genistein の効果を調べた (図 11)。その結果、それらのイソフラボン類で初期乳がんの発生頻度が低下した。この結果は、イソフラボン類に初期乳がんを抑える効果があることを示唆している。

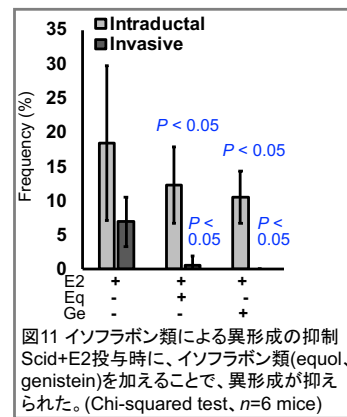


図11 イソフラボン類による異形成の抑制  
Scid+E2投与時に、イソフラボン類(equol, genistein)を加えることで、異形成が抑えられた。(Chi-squared test, n=6 mice)

新たな乳がん抑制物質を同定するために、発酵大麦エキス (FBE) の効果を評価した。その結果、FBE を投与することで、浸潤性の乳腺上皮細胞の発生が抑えられた (図 12)。しかし、充実性の異形成は抑えられなかったことから、FBE には初期乳がんの浸潤を抑える効果があると考えられる。

### (6) まとめ

本研究は、マウスの正常乳腺組織に初期乳がんを誘導する系を確立した、それにより、初期乳がんの研究や初期乳がん抑制の候補化合物などの評価が可能になった。

本研究では、そのマウス初期乳がん誘導系を用い、E2 に誘導される Myc が初期乳がんに必要なであることを明らかにした。また、イソフラボン類が初期乳がんを抑えること、FBE が初期乳がん

んの浸潤を抑制する効果を持つことを明らかにした。

<引用文献>

① Hyuna Sung *et al.*, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin*, 71 巻、2021、209-249

② Boug-Gun Ju *et al.*, A Topoisomerase IIb-Mediated dsDNA Break Required for Regulated Transcription, *Science*, 312 巻、2006、1798-1802

③ Genevieve Victoria Dall and Kara Louise Britt, Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk, *Front Oncol*, 7 巻、2017、110

④ Chunyu Wang *et al.*, Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor, *Mol Endocrinol*, 25 巻、2011、1527-1538

⑤ Hisham Mohammad *et al.*, Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer, *Nature*, 523 巻、2015、313-317

⑥ Heidi Fritz *et al.*, Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: a systematic review, *PLoS One*, 8 巻(11)、2013、e81968

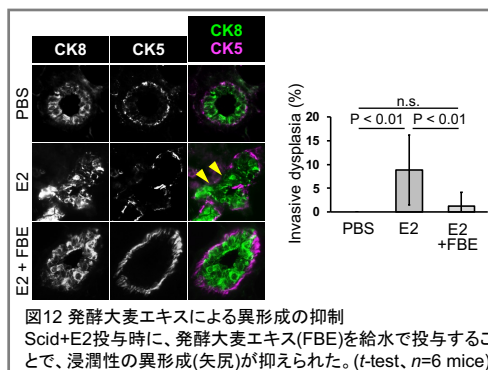


図12 発酵大麦エキスによる異形成の抑制  
Scid+E2投与時に、発酵大麦エキス(FBE)を給水で投与することで、浸潤性の異形成(矢尻)が抑えられた。(t-test、n=6 mice)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Junji Itou, Akihiro Nakamura, Hideki Hokazono, Masakazu Toi	4. 巻 54
2. 論文標題 Supplementation with Fermented Barley Extract Prevents Mammary Epithelial Cell Invasion in an Early Breast Cancer Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 73-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.20-00029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Itou Junji, Takahashi Rei, Sasanuma Hiroyuki, Tsuda Masataka, Morimoto Suguru, Matsumoto Yoshiaki, Ishii Tomoko, Sato Fumiaki, Takeda Shunichi, Toi Masakazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Estrogen Induces Mammary Ductal Dysplasia via the Upregulation of Myc Expression in a DNA-Repair-Deficient Condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100821 ~ 100821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Sunao, Ishii Tomoko, Sato Fumiaki, Toi Masakazu, Itou Junji	4. 巻 526
2. 論文標題 Eribulin mesylate-induced c-Fos upregulation enhances cell survival in breast cancer cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 154 ~ 157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊東潤二、佐藤史顕、戸井雅和
2. 発表標題 エストロゲンによる初期乳癌発生のメカニズムの解明
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東潤二
2. 発表標題 Tumor promoting effect of macrophages in a mouse early breast cancer model
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東潤二、高橋玲、松本純明、佐藤史顕、武田俊一、戸井雅和
2. 発表標題 Estrogen induces mammary ductal dysplasia via up-regulation of Myc expression.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東潤二
2. 発表標題 新規の乳癌誘導系による発癌メカニズムおよび超初期乳癌の研究
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	笹沼 博之  (Sasanuma Hiroyuki)  (00531691)	京都大学・医学研究科・准教授    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------