

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791255

研究課題名 (和文)

乳癌癌幹細胞と相互作用を示すニッチ細胞の同定とその機能解析

研究課題名 (英文) Identification of the niche cells interacting with cancer stem cells and elucidation of their functions in breast cancer

研究代表者

白羽根 健吾 (SHIRAHANE KENGO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10529803

研究成果の概要 (和文)：

我々は、乳癌細胞株や切除組織を用いて、種々の癌腫の癌幹細胞マーカーとして報告されている CD44、CD133、EpCAM、CXCR4、c-MET などを発現する細胞集団の有無を解析した。その結果、EpCAM 以外の表面マーカーでそれぞれ陽性・陰性の細胞集団を見出した。また、乳癌細胞を用いて、癌幹細胞の分化や癌間質相互作用に深く関与する Notch ligand や宿主の腫瘍免疫に関与する FAS/FasL、LCP1 の発現を解析した。Notch ligand の中では DLL1 のみが高発現しており、DLL1 が乳癌の治療標的と成り得ることが明らかとなった。FAS/FasL は他の癌腫よりも低発現しており、宿主の免疫応答を受けにくいことが示唆された。LCP1 高発現乳癌症例は予後不良と報告されており、LCP1 が治療抵抗性乳癌細胞のマーカーと成り得ることが判明した。一方で、癌組織由来間質細胞から間葉系・内皮系幹細胞マーカー発現細胞を分取し、生物学的機能解析を行った。その結果、大腸癌や膵癌などの癌腫で CD10 陽性癌関連間質細胞が、癌細胞の浸潤・転移・腫瘍形成を強く促進することが明らかとなった。これらの新たな癌幹細胞・間葉系幹細胞特異的な分子は、乳癌における新たな診断・治療標的と成り得ることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the ratio of populations expressing several markers, including CD44, CD133, EpCAM, CXCR4 and c-MET, which reported as the cancer stem cell (CSC) markers in the other malignancies. As the result, we found the positive and negative populations in all markers except EpCAM. Additionally, we quantified the expression levels of Notch ligands, which reported to be associated with cellular differentiation of CSCs and cancer-stromal interactions. We found that breast cancer cells expressed higher levels of DLL1 alone than those in other cancer cells. We also quantified the expression levels of FAS/FasL and LCP1 which are reported to be associated with the host's immune responses. We found the lower levels of FAS/FasL in breast cancer cells compared with other cancer cells, indicating that breast cancer cells tend to avoid the host's immune responses. Because the cases with higher expression of LCP1 were reported to be associated with poor prognosis in breast cancer, LCP1 can be the novel marker of breast cancer cells resistant to anti-tumor therapies. Meanwhile, we sorted the subpopulations expressing mesenchymal/endothelial stem cell (MSC/ESC) markers from primary-cultured fibroblasts derived from cancer tissues including colonic/pancreatic cancers and analyzed their biological functions. As the result, we found that CD10+ cancer-associated fibroblasts markedly enhanced invasiveness, metastasis, and tumor formation. These novel CSC/ESC specific molecules may be the promising diagnostic and therapeutic targets in breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：乳腺外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科学、乳癌、間質細胞

1. 研究開始当初の背景

現在我が国において、乳癌は女性における罹患率第1位の癌腫である。乳癌の診断・治療法はこれまで世界中で研究され発展してきたが、依然として再発・転移に対する治療は困難なままである。このような治療抵抗性の乳癌に対する新たな治療法および診断法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が非常に高い。また、腫瘍性病変がヘテロな細胞集団であることは当然認識されているが、従来の癌研究では癌組織中の大部分を占める細胞の特性が即ち組織全体の特性とされてきた。しかし、このような細胞集団を標的とした治療は効果が一時的で治療抵抗性が出現し、予後改善効果は乏しい。

乳腺組織は豊富な間質構造を有するため、癌間質相互作用が乳癌の高い浸潤能、転移能、治療抵抗性に強く影響を与える。また近年、癌組織中にある特定の微量細胞集団だけが腫瘍形成能を持つとする癌幹細胞の概念が提唱され、特異的細胞標的治療の対象として注目を浴びている。乳癌においては CD44+ CD24-/low ESA+細胞が癌幹細胞であると提唱されており、これらの細胞集団は抗癌剤耐性や放射線耐性を有していることが示唆されている。さらに、癌幹細胞を周囲微小環境で支持する間質細胞（ニッチ）の存在も推測され、その相互作用が今後の新たな治療標的になると大きく期待される。しかしながら間質細胞には様々な phenotype が存在しその機能は一様ではなく、一部の特定の間質細胞だけがニッチの働きを担っているものと考えられ、そこに着目した研究は世界でまだ例を見ない。

2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、乳癌の進展に影響を与える特定の間質細胞（乳癌由来線維芽細胞）を prospective に同定し、その生物学的特徴を明らかにすることである（prospective isolation and phenotyping）。さらに、同定した間質細胞、あるいはその特定の間質細胞と癌

幹細胞との相互作用を標的として、これまでにないアプローチによる新規治療法を開発する。

ニッチとして癌の進展に強く影響する間質細胞の同定ならびにその機能解析は、同時に転移や再発のメカニズムの解明にも寄与する。本研究の第2の目的は、新たに特定されたニッチあるいは幹細胞間相互作用に特異的な分子を乳癌の早期診断、再発診断に応用することである。

3. 研究の方法

(1) セル・ソーティングによる乳癌幹細胞の選択的純化と癌幹細胞の治療抵抗性や転移・浸潤・EMT (epithelial to mesenchymal transition)・代謝への関与の検討。

- A) 多色の蛍光抗体（CD133、CD24、CD44、EpCAM、CXCR4、c-Met、ESA）を用いて、切除組織および乳癌細胞株におけるそれぞれの陽性・陰性集団の有無を検討する。
- B) セル・ソーターを用いて、上記マーカーの陽性・陰性細胞集団を選択的に純化する。
- C) それぞれの陽性・陰性細胞集団における、治療抵抗性や転移、浸潤、EMT などに関与する分子（mRNA、microRNA、蛋白など）の発現を解析する。また、他の癌腫の細胞株を含めて、それらの発現パターンについて検討する。
- D) *in vitro* および *in vivo* における抗癌剤および放射線治療抵抗性や、転移・浸潤・EMT などへの関与を検討する。

(2) 癌間質相互作用を誘導する間質細胞表面抗原の同定。

- A) CD10、CD34、CD44、CD54、CD105、CD133、CD308、CD309 などの間質細胞や内皮性幹細胞のマーカーを用いて、切除組織より樹立した乳癌由来線維芽細胞におけるそれぞれの陽性集団の有無を検討する。
- B) セル・ソーターを用いて、有意な間質細胞集団を分取する。
- C) 間質幹細胞や癌間質相互作用に関与する

分子 (mRNA、microRNA、蛋白など) の発現を解析する。他の癌腫由来の間質細胞との発現レベルの違いについても検討する。

### (3) 癌細胞の増殖・浸潤・EMT へ関与する間質細胞の選択的分取とその機能の解明。

A) 純化した間質細胞集団を癌細胞と共培養し、特定の間質細胞による癌細胞の増殖・浸潤・EMT への関与を検討する。

B) 癌の浸潤・転移・治療抵抗性に影響する責任分子を同定する。

### (4) 選択的に分取した特定の間質細胞と癌細胞の相互作用 (ニッチとしての機能) の解明。

A) 純化した間質細胞集団を癌細胞と共に NOG マウスなどの免疫不全マウスに共移植し、腫瘍形成性や転移の形成を検討する。

B) *in vitro* 共培養モデルあるいは *in vivo* 共移植モデルにおいて、抗癌剤や放射線治療に対する治療抵抗性を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞株における癌幹細胞マーカー発現

CD133, CD44, EpCAM, CXCR4, c-MET を用いて乳癌細胞株から癌幹細胞の候補となる細胞集団の有無を検討した。その結果、EpCAM 以外の表面マーカーを用いた場合、それぞれ陽性細胞集団および陰性細胞集団を認めた。

### (2) Notch ligands

Notch signal pathway は、胎生期における細胞分化や組織形成、更には癌幹細胞の分化にも関与することが報告されている。また、我々は膀胱癌細胞と膀胱間質細胞との直接接触による相互作用に Notch signal pathway が大きく影響することを報告している (Fujita et al. *Cancer Sci*, 2009)。すなわち癌細胞ニッチ間の相互作用において重要な因子であると言える。我々は乳癌細胞における Notch ligands mRNA の発現を解析し、他の癌腫における発現と比較した。その結果、JAG1 や JAG2, DLL4 は他癌腫と比較して低発現であったが、DLL1 は高発現していた。DLL1 抑制による Notch signal pathway の制御が、乳癌幹細胞を標的とした新たな治療標的と成り得る。

### (3) FAS/Fas ligand

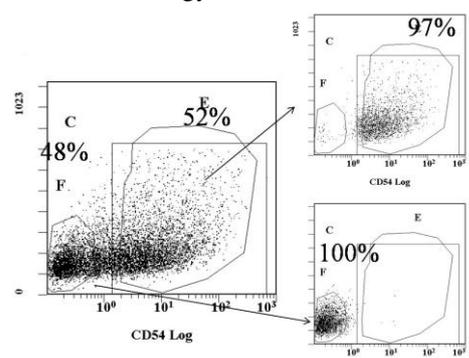
FAS および Fas ligand (FasL) の発現により、腫瘍免疫応答に関する免疫寛容が誘導されることが報告されている。我々は乳癌細胞におけるそれぞれの発現を解析した。その結果、FAS および FasL の発現は他の癌腫や間質細胞よりも低い発現を呈していた。乳癌細胞では、宿主の免疫応答を受けにくく、免疫寛容が誘導されやすいと考えられる。

### (4) LCP1/L-plastin

LCP1 (lymphocyte cytosolic protein-1) は主に単球系やリンパ球系の免疫細胞のマーカーであり、その発現もまた宿主の免疫応答の指標となる。LCP1 を間質に高発現する乳癌症例は予後不良とされている (Finak et al. *Nat Med*, 2008)。我々の解析の結果、乳癌細胞株や一部の膀胱癌細胞においても LCP1 を高発現するものがあり、間質増生が強い癌腫においては有用なマーカーとなることが示唆された。

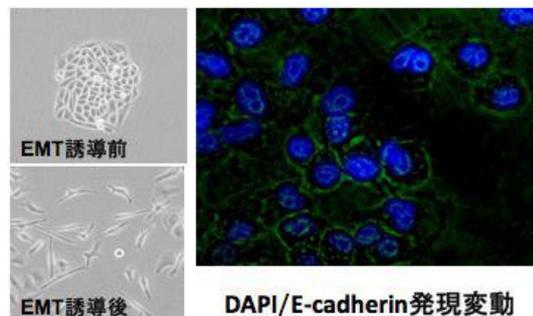
### (5) 特異的間質細胞集団の同定と機能解析

CD10, CD34, CD44, CD54, CD105, CD133 などの間葉系幹細胞や内皮系幹細胞のマーカーを用いて、乳癌や大腸癌、膀胱癌などの癌組織由来間質細胞におけるそれぞれの陽性・陰性細胞集団の有無を解析した。その結果、それぞれの癌腫における発現レベルの違いを見出している。更に、それぞれのマーカーを用いて特異的な間質細胞を分取し、特に CD10 発現間質細胞集団が、癌細胞の浸潤や転移、腫瘍形成を強く促進することを明らかにした (Cui et al. *PLoS ONE*, 2010; Ikenaga et al. *Gastroenterology*, 2010)。



### (6) EMT marker

乳癌や膀胱癌など間質増生が強い癌腫においては、局所の低酸素状態が惹起されると報告されている。癌幹細胞の特徴を明らかにするため低酸素状態における各種マーカーおよ



び microRNA の発現変動も検討し、EMT に関わる分子群の発現変化 (vimentin 上昇、E-cadherin 低下など) を認めた。

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 3 件)

1. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Miyoshi K, Moriyama T, Cui L, Yu J, Zhao M, Manabe T, Tanaka M. Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Science*, 100: 2309-17, 2009
2. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Kayashima T, Morimatsu K, Moriyama T, Nakata K, Fujita H, Tanaka M. CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 139: 1041-51, 2010
3. Cui L, Ohuchida K, Mizumoto K, Moriyama T, Onimaru M, Nakata K, Nabae T, Ueki T, Sato N, Tominaga Y, Tanaka M. Prospectively isolated cancer-associated CD10(+) fibroblasts have stronger interactions with CD133(+) colon cancer cells than with CD133(-) cancer cells. *PLoS ONE*, 12: e12121, 2010

[学会発表] (計 1 件)

1. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. CD10 positive pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. 40<sup>th</sup> Anniversary Meeting of the American Pancreatic Association and Japan Pancreas Association, 2009, Hawaii

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白羽根 健吾 (SHIRAHANE KENGO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10529803

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし