

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591441

研究課題名（和文） 乳癌幹細胞を標的とした薬物療法効果判定システムの構築

研究課題名（英文） The establishment of drug sensitivity systems targeting breast cancer stem cells

研究代表者

柏葉 匡寛（KASHIWABA MASAHIRO）

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：80326660

研究成果の概要（和文）：

今回の研究では乳癌原発巣、および転移巣や微小転移巣としての骨髄での乳癌幹細胞の採取とそれを用いた感受性試験の構築を目的とした。先ず我々は理論的裏付けのため、原発巣における乳癌幹細胞性の確認を免疫染色による抗 ALDH1 抗体を用いて行い、原発巣-リンパ節転移巣の違いを検証した。幹細胞性は原発巣より転移リンパ節で高頻度に観察されることが判明、原発-転移巣間でどのような因子が発現の増強がみられるかを検討したところ、EMT（Epithelial-Mesenchymal transition）に関連する TWIST や SNAIL といった因子が原発、及びリンパ節転移巣で特異的に発現していることが観察された。そこで乳癌原発巣とくに EMT の 1 つの発現型と予想された脈管侵襲陽性症例に絞って幹細胞性と EMT（Epithelial-Mesenchymal transition）に関連する種々の因子（TWIST, SNAIL, Vimentin, E-cadherin, -catenin,）を免疫染色で検討、これら ALDH1 と EMT 関連因子が腫瘍の中心より辺縁で高発現していること、それらの症例が予後不良であることが判明した。EMT の本質は間質化による細胞移動能の亢進ではあるが、同時に間質化により分化型上皮に感受性が高い従来の殺細胞性抗癌剤に対する感受性の変化とも考えられる点で、当初の目的である抗癌剤の効果判定システムの緒に着いたといえた。これらはいくつかの国内学会で発表され、1 編の投稿論文もすでに Revise の段階にある。

研究成果の概要（英文）：

At first, we planned to investigate the chemotherapy-sensitivity test using primary breast cancers, metastatic lymph node and bone marrow. Then primary samples and metastatic lymph nodes were investigated using immunohistochemistry to confirm the differences between these about stemness as ALDH1 positivity. After this experiments, we found that stemness and also EMT (Epithelial-Mesenchymal transition) related proteins, i.e. TWIST, SNAIL, Vimentin, E-cadherin, -catenin were identified in metastatic lymph node than primary tumors. Therefore, we proceeded these focusing on primary tumor with lymph vascular invasion as a suspected phenotype which has EMT features. After all, we identified EMT markers were frequently located in tumor boundary than center, and EMT marker positive patients tend to be worse prognosis than negative. The core functions of EMT should be cell mobility, and also it might be change of sensitivity of cytotoxic drugs in which were developed for differentiated cancers. These hypotheses are met to initial aims to clarify the new system about cytotoxic drugs sensitivity test. These initial, but very important findings were presented in several meeting, and a manuscript is under the review and revise.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1690,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：外科学一般

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：癌幹細胞、細胞・組織、薬物反応性

1. 研究開始当初の背景

再発乳癌は化学療法、ホルモン療法、HER2に対する分子標的治療も著効するにも関わらず、既存の転移巣の再増殖、さらに新規転移巣の形成を繰り返し90%以上の患者を失う。また特にホルモン感受性乳癌では4-5年以降の再発ハザード比は不変であり、10年のフォローアップ後の再発も臨床的に珍しくはない。これは従来遺伝子的薬剤感受性の変化の蓄積、**tumor dormancy**と考えられてきたが、50%程度の多剤耐性分子MDR1の発現や細胞周期の一時的休止理論ではその理解に限界があり、分化・HER2やホルモン受容体の有無等薬剤感受性獲得を含めた乳癌内**Heterogeneity**の存在が原因と考えられている。その有望な仮説として乳癌が大多数の増殖能の高い分化した癌と、少数の増殖休止期にあり薬物感受性に乏しい乳癌幹細胞から構成されているという癌幹細胞説が注目され乳癌特異的な問題を解決するのではと期待されている。実際、術前化学療法の試験では通常抗癌剤を用いた増殖能の高い分化型の癌は減少するが乳癌幹細胞CD44+CD24-の比率は上昇、一方で分子標的薬抗HER2チロシンリン酸化阻害剤の投与後低下するという報告もみられる。これは乳癌の真の根絶には乳癌幹細胞への分子標的療法や分化抑制を目指した治療と、分化した高増殖能細胞を標的とした抗癌剤治療の併用が必要と示唆している。しかし前述の様なフローサイトでの乳癌幹細胞研究は(1)mRNAや細胞内Signal研究、migration研究が可能(2)マウスへ移植実験が可能だったが①生標本採取の病理診断への影響、②CD24-の

Negative selectionは腫瘍組織内の局在や分布の検討が困難な点であった。しかしアルデヒドデヒドロゲナーゼ1(以下ALDH1)陽性細胞が乳癌幹細胞と確認され、ホルマリン固定標本を用いた免疫染色で検証することが可能となった。この方法論の進歩により乳癌幹細胞の研究が大きく進むことが予想され、術前化学療法のアウトカムの矛盾を解明できる可能性が出てきた。今までは化学療法の効果判定予測として術前化学療法が期待され、原発巣での組織学的消失pCRをendpointとして長期成績のsurrogate markerとしてきた。しかし、pCR獲得後にも10%前後の患者が再発することが報告され、乳癌の治療効果は既に原発巣の評価では十分でないことを示唆する。その矛盾の理解にはDTC(Disseminated tumor cell)と呼ばれる骨髄niche内での乳癌幹細胞の生存が予想されており、StageII-IIIの癌でも30%前後陽性との報告が多い。骨髄を転移部位として捉えるのではなく、全身薬物療法下における乳癌幹細胞のHoming、低酸素・低血流状態で高薬剤排泄能を発揮し薬剤耐性、生存の場として機能している可能性が高い。

我々の施設は以前より術前化学療法を臨床試験、実臨床でも約5年以上の追跡、200例以上の術前後の検体を保存しており、検体保存と臨床効果/長期成績はデータベース化されている。また分子標的治療のGlobal試験にも参加しASCO等のTranslational researchから様々な情報が早期にフィードバックされる環境の中で、術前療法におけるサブタイプ毎の感受性予測と、血清CA15-3やHER2可溶性抗原を用いた乳癌分化について独自に発表に至っており、先進的臨床と乳癌幹細胞の研究を繋ぐ十分な知識と研究施設

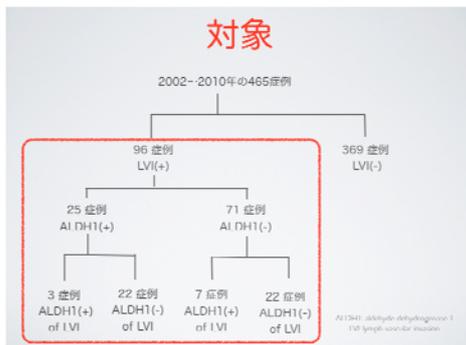
設を有していると自負している。

2. 研究の目的

がん治療の中で特に乳癌から発信すべき特徴は奏効を繰り返す再発治療（耐性獲得の機序）と長期間の無再発後の再発であり全身病といわれる所以である。近年台頭してきた分子標的治療と分子生物学的 heterogeneity により理解が進んでいる。従来の抗癌剤治療では如何に原発で pCR を得たとしても 10% 近くが再発する為、乳癌を原発、転移巣、骨髄の細胞内から乳癌幹細胞を検出し、文字通り全身病としての乳癌の生物学的振る舞いの検証を試みる。分子標的療法を含め治療前後の比率の変化や存在部位を追跡・モニター、さらに分離乳癌幹細胞の In vitro での基礎的実験を加え、乳癌幹細胞をターゲットとした新たな治療体系の確立を試みる。

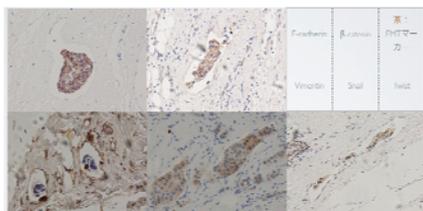
3. 研究の方法

まず原発乳癌患者 465 例のデータからリンパ管侵襲のある 96 例を抽出、それらの臨床病理学的事項をまとめ、ALDH1 および EMT マーカー (E-cadherin、 β -catenin、Vimentin、Snail、Twist) の免疫染色を実施した。



単染色・二重免疫染色(Avidin-Biotin complex法)

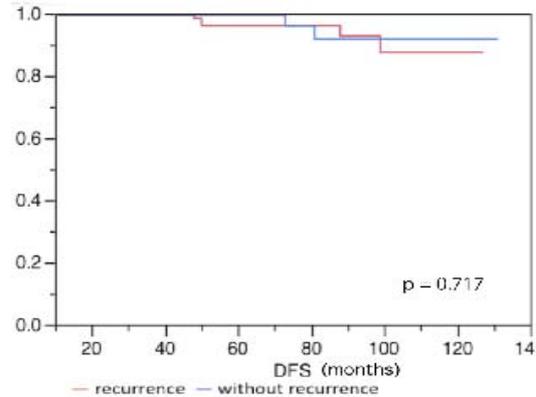
統計: ²検定、log-rank検定を用い、p<0.05を有意差ありと判定



4. 研究成果

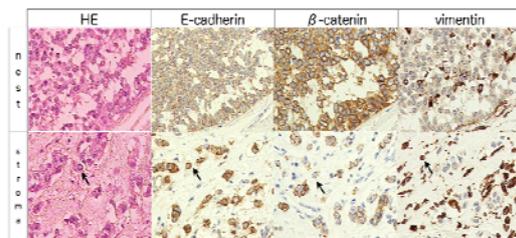
ALDH1 (乳癌幹細胞マーカー) 陽性率は 26% であり、予想通り 10% のリンパ管侵襲陽性症

例のリンパ管内に ALDH1 陽性細胞を認めた。しかし諸家の報告の様に予後には差がみられなかった。

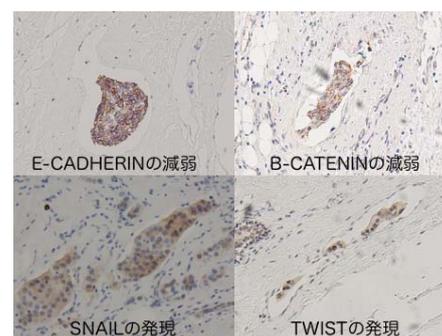


その一方、腫瘍の中心 (nest)・辺縁(Stroma)での EMT 関連蛋白の発現を検証したところ、辺縁領域での EMT 陽性関連の因子

(E-cadherin、 β -catenin の減弱、Vimentin の増強) の発現が中心より高い傾向がみられた。



さらに、リンパ管侵襲を起こしている腫瘍のリンパ管内の細胞で EMT 関連蛋白が強く発現しているのが観察された。



これらのことから、(1)乳癌幹細胞性 ALDH1 は 26% の細胞に認められたが予後との相関はなく、(2)腫瘍内の中心と辺縁で EMT 関連蛋白の発現が異なり、特に辺縁、リンパ管内では EMT 現象を示唆する発現形式が多く観察された、(3)乳癌幹細胞と EMT マーカーは近

接あるいは同一の細胞で陽性の事が多く観察されたことから、浸潤や脈管侵襲に EMT および癌細胞性の発現型が寄与している可能性が示された。

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 1 件)

Breast Cancer 投稿・査読終了、リバイス
中 川岸涼子、柏葉匡寛ら

[学会発表] (計 3 件)

柏葉匡寛ら：「リンパ管侵襲陽性細胞における癌幹細胞性およびEMTマーカーによる乳癌転移気の解明」第49回日本癌治療学会学術集会：2011.10.28
名古屋

柏葉匡寛ら：「T1腫瘍における幹細胞マーカーの発現とリンパ節転移との相関についての検討」第19回日本乳癌治療学会学術集会：2011.9.2 仙台

Kashiwaba M et al. “Exploratory study about detection of breast cancer stem/progenitor cells by ALDH1 (Aldehyde dehydrogenase 1)/ pan-cytokeratin/ TWIST in sentinel lymph nodes” INTERNATIONAL SURGICAL WEEK / ISW 2011 2011.8.31
Yokohama

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏葉 匡寛 (KASHIWABA MASAHIRO)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：80326660

(2)研究分担者

上杉 憲幸 (UESUGI NORIYUKI)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：10291618

若林 剛 (WAKABAYASHI GOU)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：50175064

稲葉 亨 (INABA TOORU)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：60405800

(3)連携研究者

()

研究者番号：