

## 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 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790520

研究課題名（和文） 乳癌幹細胞サブタイプによる乳癌個別化と新規マーカー探索

研究課題名（英文） The individualization of breast cancer by stem cell properties and search of new marker for classification

研究代表者

伊藤 貴子（ITO TAKAKO）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10375173

研究成果の概要（和文）：本研究では約 200 例の原発乳癌組織からスフェロイド培養を行い、癌幹細胞性と臨床病理学的因子との関連を検討した。Luminal 型乳癌は癌幹細胞関連遺伝子発現パターンにより 2 つに分類可能であり、NANOG 優位型においてスフェロイド形成能や乳癌幹細胞マーカー陽性細胞含有率が高く、悪性度が高い傾向を示した。この分類は臨床的に用いられている Intrinsic subtype とは異なる分類であり、スフェロイドにおける癌幹細胞性の評価が Luminal 型乳癌の新たな個別化の指標となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the relation between stemness properties of spheroids prepared from primary breast cancers and clinicopathological findings was investigated. Luminal breast cancer could be separated into two subclasses by stemness-related gene expression, and NANGO-high type was predicted to be high stemness properties and high grade tumors. This classification could be useful and a novel criterion for subclassification of luminal breast cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学，乳癌，幹細胞，個別化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍組織において、自己複製能と分化能、造腫瘍能を持つ癌幹細胞が存在し、この癌幹細胞が腫瘍形成の源であるという考え方が受け入れられるようになってきた。癌幹細胞は薬剤排出ポンプの機能亢進により抗癌剤へ抵抗性を持つとされており、転移、

再発は抗癌剤で叩ききれなかった癌幹細胞が関与していると考えてられている。特に乳癌において再発後の予後は極めて悪く、乳癌術前化学療法あるいは術後の補助療法終了時に乳癌の芽となっている癌幹細胞を検出し治療効果判定することが予後改善にも重要である。

癌幹細胞の存在の証明は急性骨髄性白血

病において FACS を用いて分離、同定されたことから始まり (Lapidot, T. et al. : Nature, 367 : 645-648, 1994), その後、脳腫瘍、肺癌、前立腺癌などの固形腫瘍においても報告されている。乳癌においては CD44+CD24-Lin<sup>-</sup> の表現型を持つ細胞が乳癌幹細胞として報告された (Al-Hajj, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 3983-3988, 2003)。さらに ALDH1 が乳癌幹細胞のマーカーであるとの報告もあり (Ginestier, C. et al. : Cell Stem Cell, 1 : 555-567, 2007) 混沌としている状態である。

また乳癌幹細胞が正常乳腺細胞の発達段階のどの細胞から派生するのか、1 種類なのかあるいは多種類から派生するのかの詳細についても不明である。さらにホルモン療法で標的となるエストロゲン受容体 (ER) の有無は乳癌幹細胞から維持されるのか、増殖の過程で性質を獲得するかについても不明である。

乳癌の分類は近年、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析に基づく乳癌の病型分類である Intrinsic subtype が用いられ、臨床的には免疫染色を用いた ER, HER2, Ki-67 発現評価により Luminal A, Luminal B, HER2, トリプルネガティブに分類されている。しかし乳癌幹細胞性という評価からの分類は十分に検討されていない。特に乳癌の 7 割を占める Luminal 型乳癌においては ER 陽性にもかかわらず、約 30% の症例においてホルモン療法耐性を示すと報告がされており、薬剤感受性が高いとされる乳癌幹細胞性との関連が注目されている。

癌の進展、再発、転移薬剤感受性は乳癌幹細胞性に依存すると考えられ、乳癌組織の乳癌幹細胞性の評価が重要な指標となる可能性が高いが、乳癌幹細胞性と病態や評価方法についての検討が待たれている。

## 2. 研究の目的

腫瘍の芽と考えられている乳癌幹細胞は癌の進展、再発、転移、薬剤感受性に関与していると考えられる。本研究では原発乳癌患者の組織検体より乳癌幹細胞の培養および検出を試み、原発乳癌組織の乳癌幹細胞性の評価を行うこととする。さらに病態との関連を検討し、乳癌幹細胞性を評価できるマーカーについて探索することを目的とした。

特に乳癌の 7 割を占める Luminal 型乳癌においてはホルモン療法感受性の違いから Heterogeneity が指摘されており、乳癌幹細胞性による Luminal 型乳癌の新たな分類を試み、Intrinsic subtype 分類との相違について比較検討を加えた。

## 3. 研究の方法

(1) 患者乳癌組織からの乳癌幹細胞の培養  
同意を得た原発乳癌患者から採取した乳癌組織を用いてスフェロイド培養を行う。この培養方法は乳癌幹細胞が濃縮される培養方法である。組織をはさみで細切後、コラゲナーゼ処理をおこない、メッシュを通して細胞を分散させたのち低接着 96 ウェルプレートに各ウェルに 20000 個の割合で生細胞播種し、培養した。培地はスフェロイド形成に適した無血清培地を用いた。一定期間培養後、光学顕微鏡下にて各ウェルについてスフェロイドの観察とカウントをおこない、スフェロイド形成能を評価した。

(2) 乳癌幹細胞マーカー染色 (蛍光多重染色)  
乳癌幹細胞を検出するために、Hoechst33342, CD44, CD24 の蛍光多重染色を行った。培養で形成されたスフェロイドに Hoechst33342 を添加し 37°C で染色後、FITC 標識抗 CD44 抗体、PE 標識抗 CD24 抗体を添加し 4°C で 30 分間染色を行った。染色したスフェロイドをスライドガラスにマウントし封入後、蛍光顕微鏡下で染色像を観察・記録した。さらに乳癌幹細胞マーカーとしてすでに報告されている CD44+/CD24<sup>-</sup> に加えて高い薬剤排出能群を示す Hoechst<sup>-</sup> を組み合わせさせた CD44+/CD24<sup>-</sup>/Hoechst<sup>-</sup> 細胞含有率をカウントし、乳癌幹細胞の指標とした。

(3) 乳癌幹細胞関連遺伝子発現の検討  
すでに様々な腫瘍において高発現が報告されている乳癌幹細胞関連遺伝子 NANOG, OCT4, KLF4 について検討した。低接着 96 ウェルプレートにコラゲナーゼ処理分散細胞を 20000 細胞/ウェルになるように播種し、一定期間スフェロイド培養を行った。その後ウェル全細胞から mRNA を抽出し RT-PCR をおこない cDNA を合成した。遺伝子発現は Real-time PCR 法にて解析した。また各遺伝子の発現は ribosomal protein L13a (RPL13A) を用いて補正した。

(4) スフェロイドの ER 発現と ERE 活性  
形成されたスフェロイドにおける ER 発現は蛍光免疫染色で検出した。  
ERE 活性は ERE プロモーター GFP を組み込んだアデノウイルスベクターを用いておこなった。形成スフェロイドにベクターを添加し 3 日間培養後、蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞を観察した。またエストロゲンの反応性を検討するために同時にエストロゲンを添加し反応性を検討した。

(5) 形成されたスフェロイドの乳癌幹細胞性と病態との関連の検討  
解析で得られた結果をもとに乳癌幹細胞性の観点からの分類を試み、分類による病態と

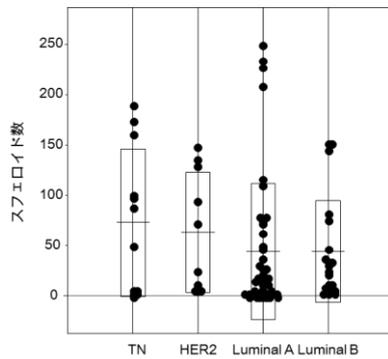
の関連を検討した。またこの分類と現在乳癌分類に用いられている Intrinsic subtype 部分類との関連も合わせて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 患者乳癌組織からの乳癌幹細胞の培養

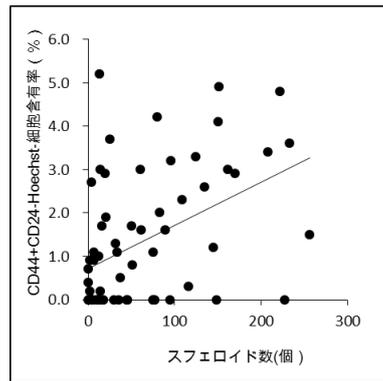
平成 22 年度から平成 24 年度まで約 200 例の患者由来原発乳癌組織のスフェロイド培養をおこなった。ほとんどの症例にてスフェロイドの長期培養は困難であったが長期培養可能例では 1 か月程度の維持が可能であった。また一部の症例では分化傾向を示し、管腔構造を示した。

さらにスフェロイド形成能を定量的に評価するためにスフェロイドのカウントを行った。細胞凝集を防ぐために 1%メチルセルロース添加培地を用いて、培養後 7 日目一定細胞数播種したウェル中の 50 $\mu$  以上のスフェロイドをカウントすることでスフェロイド形成能の定量的評価を可能とした。スフェロイド培養可能だった症例のスフェロイド形成数は 0~249 であり、癌細胞性が高いと考えられているトリプルネガティブ型で高い傾向を示したが、Luminal 型乳癌でも高いスフェロイド形成能を示す症例が存在した。



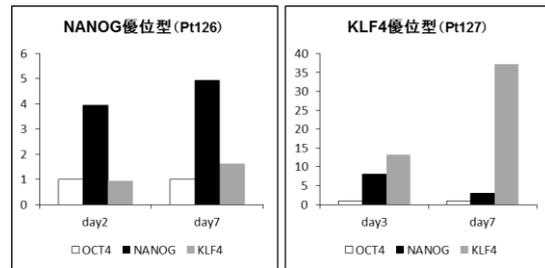
##### (2) 癌幹細胞マーカー染色

乳癌組織由来スフェロイドの Hoechst33342, CD44, CD24 の染色性は heterogeneous であり、スフェロイド構成細胞の全てが同一の染色性を示すわけではなかった。また同一組織から形成されたスフェロイドであっても、染色性が異なる場合があり、スフェロイドを形成する癌幹細胞は均一ではない可能性が示唆された。また CD44+/CD24-/Hoechst-細胞含有率は 0%から 5%と低い値を示した。また含有率はスフェロイド形成数と正相関を示し、スフェロイド形成数とともに癌幹細胞性の指標となり得ると考えられた。



##### (3) 癌幹細胞性遺伝子発現

原発乳癌組織よりスフェロイド培養をおこない、癌幹細胞性遺伝子 NANOG, OCT4, KLF4 の発現を検討したところ、NANOG と OCT4 は正相関を示したのに対し、NANOG と KLF4 は逆相関を示した。NANOG と KLF4 の発現が逆相関を示したことから、これらの遺伝子発現に着目したところ、遺伝子発現パターンが NANOG 優位型と KLF4 優位型に分類可能であった。



subtype 別にみると、トリプルネガティブ型、HER2 型では NANOG 優位型を示したが、Luminal 型では NANOG 優位型と KLF4 優位型を示す症例とが混在しており、Luminal 型が癌幹細胞性関連遺伝子発現パターンにより 2 つに分類可能であった。

##### (4) ER 発現と ERE 活性

スフェロイドにおける ER 発現を蛍光免疫染色にて検討したところ、ER 陽性乳癌のスフェロイドにおいても ER 発現が認められた症例があった。しかし ER 発現は一様でなく、同一スフェロイド内で陽性細胞と陰性細胞の混在が観察された。

同様に ERE 活性について検討をおこなったところ、スフェロイドにおいてエストロゲン添加により GFP 陽性細胞が認められた症例があり、ERE 活性が維持されている細胞を含有していることが判明した。しかしスフェロイド構成細胞の全ての細胞で ERE 活性を示さず、GFP 陽性細胞が培養過程で癌幹細胞から派生した細胞である可能性もある。一方、組織免疫染色で ER+ の Luminal 型にもかかわらず ER

発現が陰性で、ERE 活性も検出されない症例が存在しことから、Luminal 型乳癌において癌幹細胞の性質が一様でないことが示唆され、癌幹細胞性の評価が重要であると考えられた。

#### (5) 形成されたスフェロイドの癌幹細胞性と病態との関連の検討

Luminal 型乳癌において KLF4 優位型と NANOG 優位型の 2 つの癌幹細胞関連遺伝子発現パターンが存在したことから、Luminal 型乳癌における癌幹細胞関連遺伝子発現パターンと臨床病理学的因子の関連について検討したところ、NANOG 優位型スフェロイドを形成した症例群ではスフェア形成能や癌幹細胞マーカー陽性細胞含有率が高く、癌幹細胞性が高い傾向を示した。また臨床病理学的因子においても組織学的悪性度が高く、Ki-67、Topo II  $\alpha$  も高発現を示し、悪性度が高い傾向を示した。Intrinsic subtype 分類では Ki-67 発現 14%以上を Luminal A とし、Luminal B と区別している。癌幹細胞関連遺伝子発現パターンによる分類での Ki-67 発現は NANOG 優位型で高い傾向を示したものの、Ki-67 発現の低い症例も含まれていた。これは Ki-67 発現が必ずしも癌幹細胞性を反映するものでない可能性を示唆するとともに、スフェロイドの癌細胞関連遺伝子発現パターンによる分類が新たな分類方法であることが示唆された。

本研究において、原発乳癌組織由来癌細胞を用いてのスフェロイド培養が可能であることを示し、スフェロイド形成能、癌幹細胞含有率、癌幹細胞関連遺伝子発現の解析により癌細胞性の評価が可能であることを示した。特に乳癌の 7 割を占める Luminal 型乳癌においては、本解析により Heterogeneity の存在が示唆され、さらに癌幹細胞性関連遺伝子発現パターンでは 2 つに分類可能であった。この分類は臨床で用いられている Intrinsic subtype とは異なる分類であり、Luminal 型乳癌の新たな個別化の指標となり得る可能性が示唆された。

腫瘍の源と考えられている癌幹細胞は癌の進展、再発、転移、薬剤感受性に関与すると考えられており、癌幹細胞性の評価を加えることでさらに適切な治療選択や病態の把握が可能になると考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 伊藤貴子, Heterogeneity of Luminal-type Breast Cancer and Cancer

Stemness. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2012 年 11 月 16 日, 金沢

- ② 伊藤貴子, 乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討, 第 71 回癌学会総会, 2012 年 9 月 9 日, 札幌
- ③ 伊藤貴子, 癌幹細胞性による Luminal 型乳癌の新たな個別化, 第 20 回日本乳癌学会学術総会, 2012 年 06 月 28 日, 熊本
- ④ 伊藤貴子, 乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討と intrinsic subtype との相関, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 4 日, 名古屋
- ⑤ 伊藤貴子, 乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討と臨床病理学的因子との相関, 第 19 回日本乳癌学会, 2011 年 9 月 3 日, 宮城
- ⑥ 伊藤貴子, 乳癌原発腫瘍における癌幹細胞の解析, 第 69 回日本癌学会総会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪
- ⑦ 伊藤貴子, 乳癌組織からの癌幹細胞の同定・培養の試みと臨床病理学的因子との相関, 第 18 回日本乳癌学会, 2010 年 6 月 24 日, 札幌

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 貴子 (ITO TAKAKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10375173