

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501268

研究課題名(和文)腫瘍細胞の休眠化機構を特徴づけるマイクロRNAの同定と機能解析

研究課題名(英文) Screening and Functional Analyses of the MicroRNAs Involved in Cancer Cell Dormancy

研究代表者

下野 洋平 (SHIMONO, YOHEI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90594630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんでは、寛解後10年以上してからがんの転移性再発がみられることがある。このような再発には、転移先の臓器で細胞周期が停止した休眠状態を維持して潜在するがん細胞が関与するとされる。本研究では、ヒト乳がん組織を直接移植したヒト乳がん異種移植マウスのがん細胞の多くが細胞周期の停止したG0期にあること、がん細胞の細胞周期の停止と一次繊毛の有無には関連がないこと、およびケモカインレセプターCXCR4の発現低下が細胞周期の停止と関連することを解明した。さらに、ヒト乳がん異種移植マウスのがん細胞に特徴的な発現を示す一連のマイクロRNAを同定し、それらが制御する遺伝子およびシグナル伝達系の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：Metastatic cancer may emerge more than 10 years after complete remission in human breast cancers. It is considered that these very late relapses are caused by the latent tumor cells that remain dormant in the organs of metastases. In this research, we revealed that the cancer cells in the patient-derived xenografts of human breast cancers are mostly in a G0 phase; the presence of primary cilia is not associated with the cell-cycle arrest; and the downregulation of the chemokine receptor CXCR4 is associated with the cell-cycle arrest. Furthermore, we identified the microRNAs that are preferentially expressed in the cancer cells in the patient-derived xenografts of human breast cancers and revealed a part of the genes and signaling pathways regulated by these microRNAs.

研究分野：がん細胞生物学

キーワード：がん休眠 乳がん マイクロRNA CXCR4 がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんや前立腺がんでは、治療後 10 年以上の寛解期を経てがんの転移性再発がみられることがある。このような再発の原因となるがん細胞は、長期間増殖も細胞死も起こさないうまま、あるいは増殖と細胞死がバランスをとったまま、転移先の組織で存在していたと考えられる。特に血液系腫瘍を中心とした研究から、休眠状態の維持とその破綻には、増殖因子による刺激、血管新生因子の働き、免疫監視機構の変化、炎症による細胞間基質の変化などが関与すると考えられてきた (Aguirre-Ghiso JA, Nature Reviews Cancer, 2007)。また、動物モデルによる検討では、抗 1 インテグリン抗体による乳がん細胞の表現型の正常化や (Weaver VM et al. Journal of Cell Biology, 1997) がん遺伝子 Myc を発現する肝細胞がんでは Myc の発現抑制により肝がん細胞の分化誘導および休眠化がおこることが報告されてきた (Shachaf CM et al. Nature, 2004)。

がん幹細胞は、がん組織中に存在する自己再生能と高い腫瘍原性をもつがん細胞であり、化学療法や放射線療法により高い抵抗性をもつ。多くの腫瘍ではがん幹細胞は比較的少数しか存在しないが、治療後も長期間にわたり休眠状態を維持したまま潜伏できるがん細胞は、がん幹細胞ではないかと推測されてきた (Hermann PC et al. Cell Stem Cell, 2007)。

マイクロ RNA は 21 塩基前後からなるタンパクをコードしない RNA であり、ヒトでは 1000 種以上が存在すると推測されている。私は、ヒトの固形がんにおけるがん幹細胞の存在を初めて報告した米国スタンフォード大学の Michael Clarke 教授の研究室において、ヒト乳がん組織由来がん幹細胞に特徴的な 37 種のマイクロ RNA からなるプロファイルを同定した。その中でも特に miR-200c は、自己再生能に関わるポリコム遺伝子 BMI1 の発現を抑制してヒト乳がん幹細胞の幹細胞性を抑制することを解明した (Shimono Y et al. Cell, 2009)。マイクロ RNA は、細胞増殖、細胞死、代謝、分化の制御など多彩な機能をもつ。したがって、マイクロ RNA が、が

ん細胞の休眠状態の維持機構に關与する可能性は十分に考えられるが、細胞の休眠化に關わるマイクロ RNA は解明されていない。本研究では、ヒト乳がんの病態をより忠実に反映できるヒト乳がん異種移植マウスの解析を通じて、休眠状態にあるヒト乳がん細胞とがん幹細胞に特徴的に発現するマイクロ RNA を同定し、マイクロ RNA を中心とした分子機構の解析をすすめる。

## 2. 研究の目的

ヒトの乳がんの長期寛解後の再発に關わることがん細胞をより忠実に解析するモデルとして、ヒト乳がんの組織を直接移植したヒト乳がん異種移植マウスを作製する。次に、原発巣および転移巣のヒト乳がん細胞の解析を通じて、休眠状態にあるがん細胞やがん幹細胞を特徴づけるマイクロ RNA および遺伝子の発現を解明する。これらの解析を通じて、ヒト乳がん細胞の休眠状態の制御に關わる分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

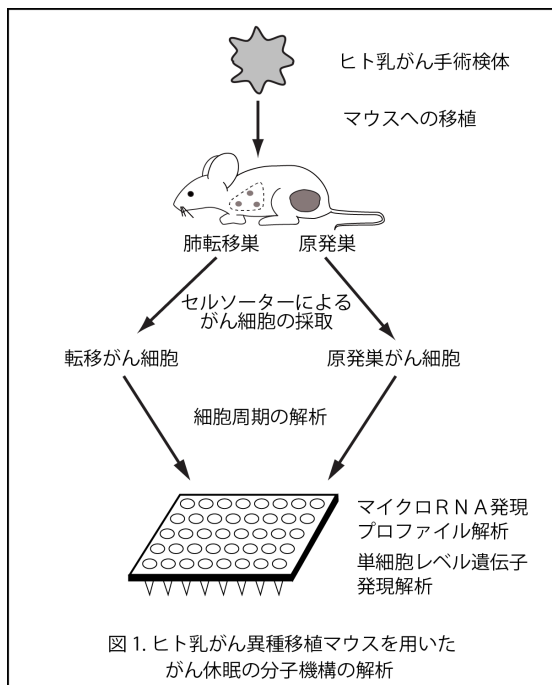
ヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍またはその肺転移巣から、休眠状態にあるがん細胞またはがん幹細胞をセルソーターで分離し、がん細胞の休眠状態と關連するマイクロ RNA や遺伝子の発現を網羅的に解析した。また、マイクロ RNA が標的とする遺伝子候補やシグナル伝達系の解析を通じて、休眠状態の制御に關わる分子機構を解析した。さらに、同定されたマイクロ RNA をヒト乳がん細胞に導入して、マイクロ RNA がヒト乳がん組織のがん細胞の休眠状態に与える影響を検討した。

### (1) ヒト乳がん異種移植マウスの樹立と転移巣の検索

ヒト乳がん検体を直接移植したヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍は、ヒト腫瘍を構成するがん細胞の多様性および組織像をより忠実に反映することが可能である。私たちは以前、ヒト乳がん異種移植マウスの解析を通じて、その一部に肺転移巣の形成がみられることを明らかにした (Liu H et al. PNAS, 2010)。また、マウスにおけるがん細胞の転移の有無は元となった患者の予後を反映することも

報告されている (DeRose YS et al. Nature Medicine, 2011)。

本研究では、ヒト乳がんの異種移植マウスモデルを作成するため、神戸大学病院腫瘍・血液内科および乳腺内分泌外科より、倫理委員会の承認に基づいた同意の得られた乳がん患者の手術検体を収集し、それらをマウスの乳腺領域に移植してヒト乳がん異種移植マウスを作製する (図1)。移植に使用する免疫不全マウスは、NOD/SCID マウスまたはより免疫不全度の高いNOG マウスを使用する。樹立されたヒト乳がん異種移植マウスの原発巣および肺の組織標本を作製して、がん細胞の有無を蛍光免疫染色法により検索する。さらに、セルソーターを用いてより効率的にがん細胞を分離するために、GFP 発現レンチウイルスを用いてヒト乳がん腫瘍を標識する。



## (2) ヒト乳がん異種移植マウスのがん細胞の細胞周期制御の分子機構の解析

臨床でみられる長期寛解後の再発により近いモデルとして、ヒト乳がん異種移植マウスの肺転移巣で休眠状態にあるがん細胞に着目して解析する。まず、Hoechst 3342 や Pyronin Y などの染色および細胞周期に関わるタンパク質の発現を指標に、原発巣および肺転移巣のがん細胞の細胞周期をフローサイトメーターにて解析する (図1)。つぎに、ヒト乳がん細胞の細胞周期の制御に関わる分子機構を解明するため、細胞増殖、細胞周

期、細胞死、転移などの制御に関わる遺伝子に着目してそれらの発現を単細胞レベルで解析する (図1)。さらに、細胞周期の停止との関連が示されてきた一次繊毛の有無と、がん細胞の細胞周期との関連を、ヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍を用いた蛍光免疫組織学的解析により明らかにする。

## (3) 原発巣および転移巣のヒト乳がん細胞に特徴的なマイクロRNAの解析

ヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍および肺転移巣に存在するがん細胞およびがん幹細胞を、セルソーターを用いて収集する。得られたがん細胞からRNAを分離し、マイクロRNA発現量を定量的PCR法にて網羅的に解析する。これらの解析を通じて、休眠状態にあるヒト乳がん細胞に特徴的に発現するマイクロRNAを同定する (図1)。つぎに、これらのマイクロRNAを発現するヒト乳がん細胞をマウスに移植して、マイクロRNAががん細胞の休眠状態の維持におよぼす影響を解析する。

## (4) ヒト乳がん幹細胞に特徴的に発現するマイクロRNAによる細胞増殖制御の分子機構

がん幹細胞に特徴的な発現のみられるマイクロRNAの標的遺伝子の候補から、細胞増殖、細胞周期、細胞死、幹細胞性などに関連のある候補遺伝子を選び、実際にマイクロRNAにより遺伝子発現が制御されるかを検討して、細胞増殖の制御および休眠状態の維持に関わる分子機構の解明をすすめる。

## 4. 研究成果

本研究では、ヒト乳がん手術検体を直接移植したヒト乳がん異種移植マウスを作製し、その原発巣と肺転移巣には休眠状態にあるがん細胞が高率に存在することを解明した。さらに、細胞周期の停止が一次繊毛の有無とは関連がないこと、ケモカインレセプターCXCR4の発現低下が原発巣および肺転移巣のがん休眠と関わること、およびがん細胞で特徴的な発現がみられるマイクロRNAによる細胞周期制御の分子機構を解明した。

## (1) ヒト乳がん異種移植マウスの樹立と転移巣の検索

ヒト乳がん異種移植マウスの樹立

同意の得られた乳がん患者の手術検体を 118 症例収集し、マウスに移植した。luminal A/B、basal-like、HER2 タイプなど各種の組織型からなるヒト乳がん異種移植マウスを樹立した。

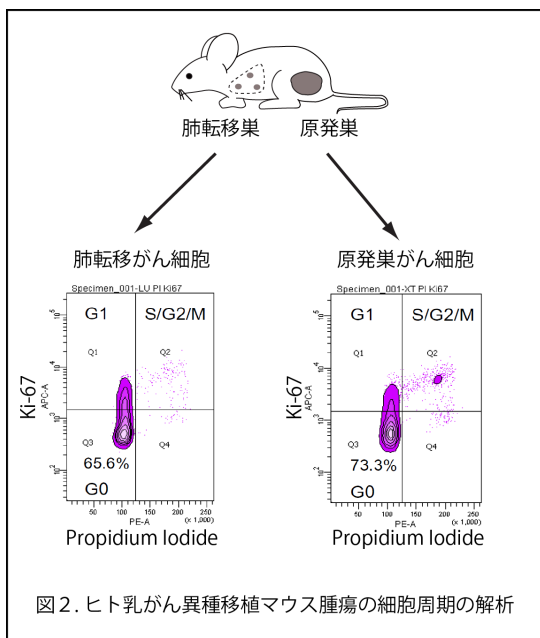
#### 転移巣の検索とがん細胞の標識

樹立したヒト乳がん異種移植マウスの各臓器の組織標本を作製して、がん転移巣の有無を検索した。さらに、セルソーターを用いてより正確にがん細胞を分取するため、転移巣が観察されたヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍細胞を GFP 発現レンチウイルスにより標識した。

### (2) ヒト乳がん異種移植マウスのがん細胞の細胞周期制御の分子機構の解析

#### 原発巣および肺転移巣の細胞周期解析

樹立されたヒト乳がん異種移植マウスの原発巣および転移巣よりがん細胞を分離し、がん細胞の細胞周期を解析した。解析したヒト乳がん異種移植マウスの原発巣と肺転移巣のがん細胞ではそれぞれ 73%と 65%が細胞周期が停止した G0 期にあることを解明した (Nobutani K et al. Genes Cells, 2013) (図 2)。



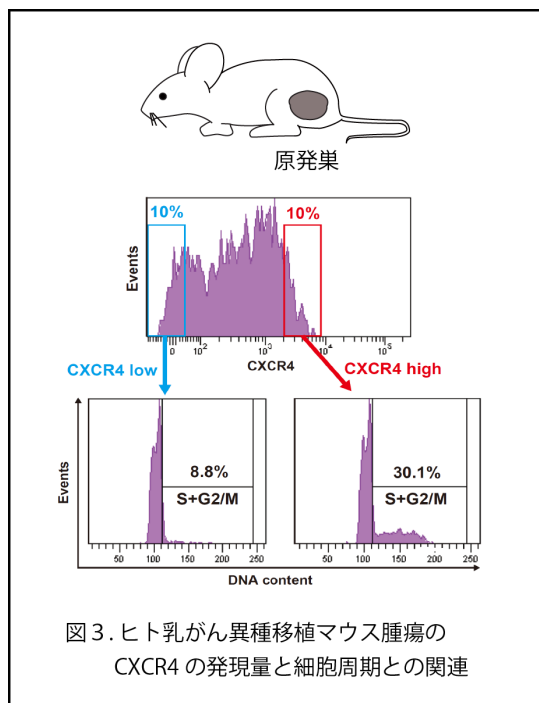
#### 一次繊毛に依存しないヒト乳がん細胞の細胞周期制御

一次繊毛は、ほとんどの哺乳類細胞の細胞表面にみられ、細胞分化やシグナル伝達に関わる。特に培養細胞を用いた検討などから、一次繊毛が細胞周期の停止と関連するという

報告がされてきた。本研究では、ヒト乳がん異種移植マウスの原発巣および転移臓器を免疫組織学的に解析し、ヒト乳がん細胞の一次繊毛の有無を解析した。この解析からは、がん細胞の細胞周期の停止と一次繊毛の有無には関連が見られなかった。したがって、ヒト乳がん組織においては、一次繊毛は、がん細胞の細胞周期の停止や休眠とは関連が乏しいと考えられた (Nobutani K et al. Genes Cells, 2013)。

#### ヒト乳がん細胞の休眠に関わる分子機構の単細胞レベル解析

ヒト乳がん組織において単細胞レベルでがん細胞の細胞周期に影響を与える遺伝子を明らかにするため、セルソーターを用いてヒト乳がん異種移植マウスの原発巣および肺転移巣のがん細胞を単細胞レベルで分離した。原発巣および肺転移巣のがん細胞の両者において、細胞周期の進行に関わる MKI67 遺伝子の発現低下とケモカインレセプター CXCR4 の発現低下に単細胞レベルで強い相関を認めた。また、ヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍において CXCR4 の発現量は細胞周期の進行との関連を認めた (Nobutani K et al. PLoSOne, 2015, in press) (図 3)。



#### CXCR4 の阻害によるがん休眠の誘導

CXCR4 の阻害分子である AMD3100 を投与したヒト腫瘍異種移植マウスの原発巣および肺

転移巣では、Ki-67 陽性細胞が減少し、がん細胞の休眠状態がより強く誘導された (Nobutani K et al. PLoSOne, 2015, in press)。したがって、CXCR4 を介したシグナル伝達系は、ヒト乳がんの原発巣および転移巣において、ともにヒト乳がん細胞の細胞周期の制御に特に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

### (3) 原発巣および転移巣のヒト乳がん細胞に特徴的なマイクロ RNA の解析

ヒト乳がん細胞を特徴づけるマイクロ RNA の解析

ヒト乳がん異種移植マウスのがん細胞の多くが休眠状態にあることを踏まえ、セルソーターにより分離したがん細胞およびがん幹細胞に発現するマイクロ RNA を定量的 PCR 法にて網羅的に解析した。これらのがん細胞で特徴的な発現の変化が認められる一連のマイクロ RNA を同定し、さらにマイクロ RNA の標的となる、細胞増殖、細胞周期、細胞死、幹細胞性の制御に関わる遺伝子候補を解明した。

マウス移植モデルを用いた休眠関連マイクロ RNA の機能解析

レンチウイルスを用いて、同定された一連のマイクロ RNA を発現するヒト乳がん幹細胞を作製した。これらのがん幹細胞をマウスに移植して、マイクロ RNA ががん細胞の休眠維持におよぼす影響の解析をすすめている。

### (4) ヒト乳がん幹細胞に特徴的に発現するマイクロ RNA による細胞増殖制御の分子機構

miR-142 による WNT シグナル伝達系制御  
古典的 WNT シグナル伝達系は、特に乳がん幹細胞の維持および細胞増殖に重要な役割をもつ。本研究では、ヒト乳がん幹細胞に特徴的に発現が上昇している miR-142 が、古典的 WNT シグナル伝達系の構成タンパク質である APC を標的として、古典的 WNT シグナル伝達系を増強し細胞増殖を促進することを解明した (Isobe T et al. eLife, 2014)。さらに、miR-142 は、乳がん幹細胞で特徴的に発現が上昇しており、乳がん細胞の増殖促進作用をもつ miR-150 の発現を古典的 WNT シグナル依存的に転写誘導して、細胞増殖を促進することを解明した。

miR-199 と miR-214 を介した ErbB2/ErbB3 シグナルの制御

ヒト乳がん幹細胞では miR-199 および miR-214 の発現が上昇している。miR-214 はがん抑制遺伝子として知られる細胞表面タンパク質 Nectin-2 を直接標的としてその発現を抑制した。一方、miR-199a は、糖鎖修飾酵素 ST6GAL1 の発現抑制を介して間接的に Nectin-2 の発現を抑制した (Minami A et al. J. Biol. Chem. 2013; Momose K et al. Genes Cells 2013)。さらに miR-214 と miR-199a はともに、Nectin-2 の発現を抑制することで、ErbB2/ErbB3 シグナル伝達系を活性化した。したがって、miR-214 と miR-199a は、異なる機構で細胞増殖、細胞運動や細胞死の制御に関わることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 22 件)

Isobe T, Hisamori S, Hogan DJ, Zabala M, Hendrickson DG, Dalerba P, Cai S, Scheeren F, Lam JS, Qian D, Dirbas FM, Somlo G, Lao KQ, Brown PO, Clarke MF, Shimono Y. miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway. eLife, 査読有, 3: e01977, 2014. doi: 10.7554/eLife.01977.

Nobutani K, Shimono Y, Yoshida M, Mizutani K, Minami A, Kono S, Mukohara T, Yamasaki T, Itoh T, Takao S, Minami H, Azuma T, Takai Y. Absence of primary cilia in cell cycle-arrested human breast cancer cells. Genes Cells, 査読有, 19:141-52, 2014. doi: 10.1111/gtc.12122.

Minami A, Shimono Y, Mizutani K, Nobutani K, Momose K, Azuma T, Takai Y. Reduction of the ST6 -galactosamide -2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1)-catalyzed sialylation of nectin-like molecule 2/cell adhesion molecule 1 and enhancement of ErbB2/ErbB3 signaling by microRNA-199a. J Biol Chem, 査読有,



288:11845-53, 2013. doi:  
10.1074/jbc.M112.405993.

Momose K, Minami A, Shimono Y, Mizutani K, Nobutani K, Azuma T, Takai Y. miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling. *Genes Cells*, 査読有, 18:195-202, 2013. doi: 10.1111/gtc.12027.

Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, Rajendran PS, Rothenberg ME, Leyrat AA, Sim S, Okamoto J, Johnston DM, Qian D, Zabala M, Bueno J, Neff NF, Wang J, Shelton AA, Visser B, Hisamori S, Shimono Y, van de Wetering M, Clevers H, Clarke MF, Quake SR. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nature Biotechnology*, 査読有, 29: 1120-1127, 2011. doi: 10.1038/nbt.2038.

〔学会発表〕(計 29 件)

下野 洋平. がん幹細胞特異的マイクロRNAによるWNTシグナル伝達系制御機構、日本癌学会シンポジウム / 共同利用・共同研究拠点シンポジウム、2015.1.21.-22. 石川県立音楽堂交流ホール(石川)

Yohei Shimono, MicroRNA-mediated regulation of the human cancer stem cells. The 33rd Sapporo International Cancer Symposium. 2014. 6.26.-28. ロイトン札幌(北海道)

Yohei Shimono, Taichi Isobe, Michael F. Clarke. Regulation of the Wnt signaling pathway by microRNA-142 upregulated in human breast cancer stem cells. Keystone Symposia Stem Cells and Cancer, 2014. 2.2.~7. Banff (Canada)

信谷健太郎、下野 洋平、向原 徹、南博信、東 健、高井 義美. Primary cilia are depleted in human breast cancer cell line, tissue, and human-mouse xenograft tumor、第 71 回日本癌学会学術総会、2012.9.19~21. ロイトン札幌他(北海

道)

下野 洋平. 遺伝子発現解析からみたヒトがん幹細胞の幹細胞性、平成 23 年度文科省がん支援活動・厚生省対がん 10 年研究合同公開シンポジウム、2012.1.30. 学術総合センター 一橋記念講堂(東京)  
下野 洋平. がん幹細胞研究：現状と将来展望、第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会教育講演、2011.8.31. 仙台国際センター他(宮城)

〔図書〕(計 3 件)

Shimono Y, Rikitake Y, Mandai K, Mori M, Takai Y. Springer New York, Sub-cellular biochemistry: Immunoglobulin superfamily receptors and adherens junctions. 2012, 60: 137-170. doi: 10.1007/978-94-007-4186-7\_7.

信谷 健太郎、下野 洋平、高井 義美、南山堂、*がんの浸潤・転移、序論 がんの浸潤・転移研究*、第 15 章 がん休眠、2011、1-8, 141-149.

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下野 洋平 (SHIMONO, Yohei)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 90594630