

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791496
 研究課題名（和文） 乳癌の再発・転移における乳癌幹細胞および上皮間葉転換（EMT）シグナルの解析
 研究課題名（英文） Analysis of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition signals in recurrence and metastasis of breast cancer cells
 研究代表者
 有馬 好美（ARIMA YOSHIMI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：20309751

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでに、乳癌細胞株において癌抑制遺伝子産物である Rb タンパク質の発現を RNA 干渉法により抑制すると、上皮間葉転換（EMT）誘導転写因子の一つである ZEB を介して EMT が誘導されることを見出した。ZEB の発現を抑制する薬剤を探索するために阻害剤スクリーニングを行い、いくつかの ZEB 阻害剤を得ることができた。その一つはサイクリン依存性キナーゼ（CDK）に対する阻害剤であり、Rb 不活化型の乳癌細胞株に CDK インヒビターを添加すると、上皮マーカーの発現が増加し、癌細胞の増殖能および浸潤能が低下した。また、Rb 陰性乳癌細胞において、細胞内在 CDK インヒビターである p16 の発現を抑制し、乳癌幹細胞表面マーカーの発現を調べたところ、CD44+/CD24- で示される乳癌幹細胞の割合が増加した。細胞周期の進行を制御する CDK4/6-Rb-p16 経路は、EMT シグナルや癌幹細胞の性質にも関与していることがわかり、癌の再発や転移における重要な経路である可能性があり、CDK4/6 インヒビターはこれらに複合的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We determined that Rb inactivation induces epithelial-mesenchymal transition, EMT through the ZEB expression. We conducted ZEB1 inhibitor screening and identified several chemical inhibitors of the ZEB1 protein expression, which included CDK inhibitors. The treatment of CDK4/6 inhibitor increased epithelial marker expression, and suppressed breast cancer cell proliferation and cell invasiveness. We also determined that the relationship between an endogenous CDK inhibitor, p16 and breast cancer stem cell marker CD44+/CD24-. Our findings suggest that the CDK4/6-Rb-p16 pathway is associated with the regulation of EMT and cancer stem cell properties in breast cancers, and the CDK4/6 inhibitor is effective due to the combined suppression of cell cycle, EMT, and cancer stemness.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：癌

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal

Transition : EMT) は、上皮細胞が上皮としての性質を喪失し、線維芽細胞のように細胞外マトリックス産生能が高く運動能が高い

間葉系様細胞に形質変化する現象である。EMT は、1) 胚発生時の器官や組織の形成、2) 炎症や組織損傷が生じた時の創傷治癒および各種臓器の線維症、3) 癌の進展に関与する重要なシグナルである。癌においては、上皮系腫瘍の浸潤および遠隔臓器への転移のステップに EMT シグナルが関与することが示唆されている (Thiery JP, *Nat Rev Cancer* 2:442-454, 2002)。私たちはこれまでに、乳癌細胞株において癌抑制遺伝子産物である Rb タンパク質の発現を RNA 干渉法により抑制すると、EMT が誘導されることを見出した (Arima Y *et al.*, *Cancer Res* 68:5104-5112, 2008)。

また、癌組織は癌幹細胞を起点として構築され、癌幹細胞は抗癌剤や放射線などの治療に抵抗性を示し、再発の原因となることが示唆されている。近年、EMT を誘導した際の遺伝子発現パターンは癌幹細胞の遺伝子発現パターンと酷似しており、さらに上皮系癌細胞において EMT を誘導すると癌幹細胞様の形質を獲得することから (Mani SA *et al.*, *Cell* 133:704-715, 2008; Santisteban M *et al.*, *Cancer Res* 69:2887-2895, 2009)、EMT と癌幹細胞は生物学的に密接な関係があると考えられている。

2. 研究の目的

乳癌幹細胞の性質と EMT シグナルは密接な関係があることが示唆されている。そこで、Rb の不活化により誘導される EMT シグナルが、乳癌細胞の浸潤・転移および乳癌の再発に貢献するかを明らかにし、さらに EMT シグナル阻害剤の乳癌細胞に対する作用、とくに乳癌幹細胞への作用を明らかにし、治療抵抗性乳癌の分子背景を明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

Rb 経路の破綻によって誘導される EMT シグナルに重要な分子として同定した、転写因子 ZEB の発現を抑制する薬剤を探索するために阻害剤スクリーニングを行った。さらに、この薬剤を用いて、EMT シグナル阻害剤が乳癌細胞の浸潤・転移、乳癌の再発を抑制できるか検討を行った。

4. 研究成果

上皮性乳癌細胞株において Rb をノックダウンすると EMT が誘導された (図 1 A)。Rb の下流でどの EMT 誘導転写因子が活性化するか調べたところ、Rb ノックダウン細胞におい

て ZEB1, ZEB2 の発現が顕著に上昇することがわかった (図 1 B)。ZEB の発現を抑制すると Rb ノックダウンで誘導される EMT が抑制された (図 1 C) ことから、Rb の下流で EMT に関与する因子として ZEB が重要であると考えられた。さらに、乳癌臨床サンプルにおける ZEB1 タンパク質の発現について調べたところ、浸潤先端領域において ZEB1 陽性癌細胞が検出された (図 1 D)。

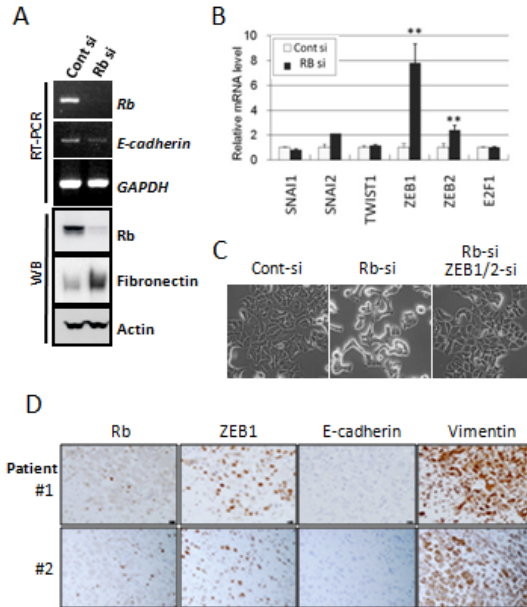


図1. Depletion of Rb induces an EMT-like phenotype through ZEB-dependent pathways in breast cancer cells

間葉系の性質を持つ乳癌細胞株において、ZEB ノックダウンにより上皮細胞マーカーの発現が亢進し、浸潤能が低下したことから、ZEB は EMT 誘導と間葉系性質の維持に重要であることが示唆された。Rb 経路の機能不全が ZEB を介して EMT シグナルを活性化することによって癌の浸潤・転移機構に影響を及ぼし、癌の悪性化に関わる可能性がある。

そこで、ZEB が治療の標的となるのではないかと考え、ZEB1 タンパクの発現を指標にしてインヒビタースクリーニングを行った。

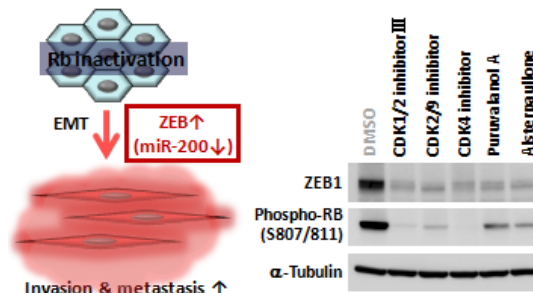


図2. ZEB1 inhibitor screening

既存の低分子薬剤ライブラリーを用いて約 300 の阻害剤について探索を行ったところ、乳癌細胞株において ZEB1 タンパク質の発現を低下させるいくつかの薬剤がヒットし、その中には、CDK (サイクリン依存性キナーゼ) に対する阻害剤が含まれていた (図 2)。これらの阻害剤の中でも CDK4 に対する阻害剤は、特異性が高く、また細胞毒性が低く、予想通り EMT 抑制効果を示すことがわかった。ファイザー社の CDK4/6 インヒビター PD0332991 はすでに安全性が確認されており、早期に臨床応用できる可能性が高いと判断し、以後の実験には PD0332991 を用いた。

CDK4/6 インヒビター処理した乳癌細胞株 MDA-MB-231 では、細胞増殖マーカー Ki67 陽性細胞が減少した (図 3 A)。さらに、xenograft における効果を調べるため、乳癌細胞をマウス乳腺に移植し、CDK4/6 インヒビターを投与したところ、腫瘍の増殖抑制がみられた (図 3 B)。CDK は細胞の増殖に重要な分子であり、それを阻害することで細胞増殖の抑制が誘導されることはすでに知られている。その作用に加えて、今回の研究により、CDK4/6 インヒビターは濃度依存的に乳癌細胞の浸潤能を抑制することがわかった (図 3 C)。これらの内容を論文にまとめ報告した (Arima Y *et al.*, *J Biol Chem.* 287:7896-906, 2012)。

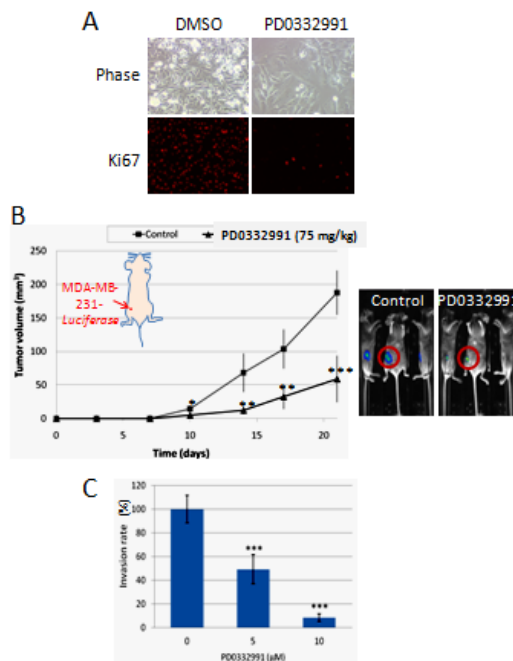


図3. The CDK4/6 inhibitor PD0332991 suppresses breast cancer cell proliferation and cell invasiveness

P16 は細胞内に存在する CDK インヒビターの一つであり、Rb 不活化のフィードバック機構によって発現が上昇することがわかって

いる。これまでの研究から、トリプルネガティブ乳癌 (ER[-]/PR[-]/HER2[-]) では、Rb の不活化と p16 の発現増加が見られることが報告されている。そこで、トリプルネガティブ乳癌臨床サンプルにおける p16 タンパク質の発現解析を行った (図 4)。P16 の発現と術前化学療法に対する反応について検討したところ、p16 陰性癌細胞を含む患者は抗癌剤抵抗性を示す傾向があることがわかった。

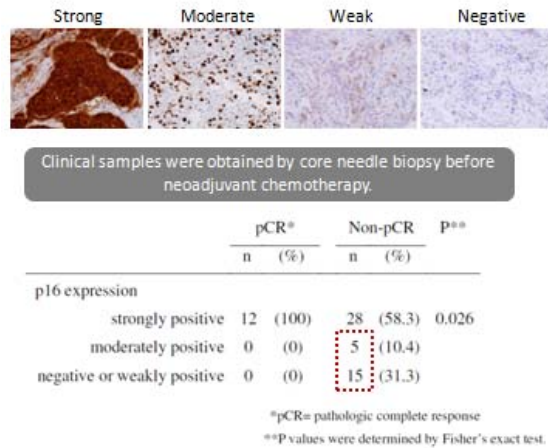


図4. Relationship between p16 expression and response to chemotherapy in TNBC patients

癌幹細胞は、放射線治療や抗癌剤治療に対して抵抗性を示すことが知られている。乳癌幹細胞の表面マーカーである CD44+/CD24- と p16 の発現について解析を行ったところ、ER 陰性乳癌細胞株において、p16 タンパク質が低発現の細胞株は CD44+/CD24- 細胞の割合が高いことがわかった (図 5)。

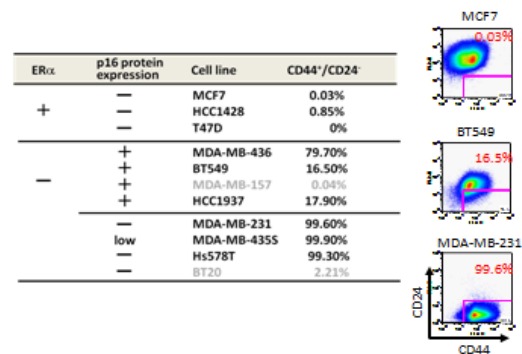


図5. Relationship between p16 and CD44/CD24 expression in various human breast cancer cell lines

P16 陽性乳癌細胞を、CD24 の発現によって Low と High に分け、それぞれの画分における p16 タンパク質の発現を解析すると、CD24-Low/- で p16 の発現が低いことがわかり (図 6 A)、また、p16 ノックダウンを行ったところ、CD24 の発現が低下し、CD44+/CD24-

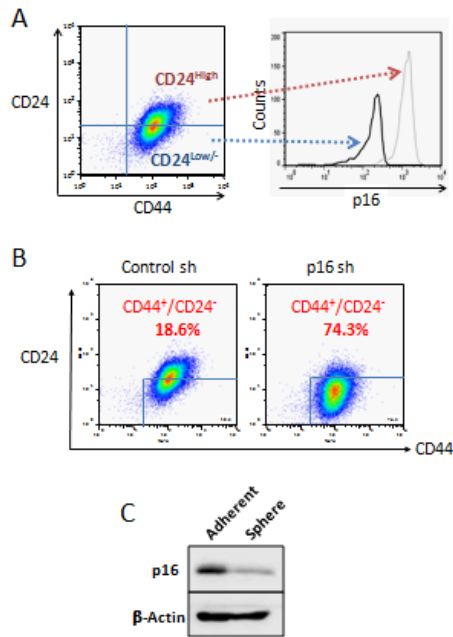


図6. Relationship between p16 and CD44/CD24 expression

細胞が 18.6%から 74.3%に増加した(図 6 B)。さらに、幹細胞としての性質をみるために、sphere を形成させ、p16 タンパク質の発現を解析したところ、接着培養時と比較して p16 の発現減少がみられた(図 6 C)。

このように、Rb-p16 経路は乳癌において幹細胞様の性質と関与し、抗癌剤に対する抵抗性と密接な関係があると考えられた。これらの内容は、論文にまとめ報告した(Arima Y *et al.*, *Int J Cancer*, 130:2568-79, 2012)。

CDK4 インヒビターおよび PD0332991 は、sphere 形成能を抑制することがわかり(図 7)、これらの薬剤は、細胞周期停止による癌細胞の増殖抑制だけでなく、EMT や癌幹細胞の性質を阻害できる可能性があると考えられた。しかし、乳癌幹細胞に対しては高濃度の薬剤が必要であり、またその作用メカニズムはまだ解明できていない。EMT シグナルを標的とした治療法の考案と、その作用機構の解明を目指してさらに研究を進めたいと考えている。

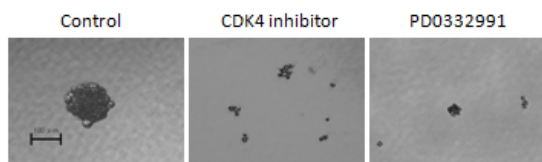


図7. CDK4 inhibitors suppress the tumorsphere formation

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 2 件)

1. Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagama H, Taya Y, Saya H: Induction of ZEB Proteins by Inactivation of RB Protein Is Key Determinant of Mesenchymal Phenotype of Breast Cancer. *J Biol Chem.* 287:7896-906, 2012 査読有り
2. Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Abe E, Yoshida A, Mikami S, Nakamura S, and Saya H: Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* 130:2568-79, 2012 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. Arima Y and Saya H
The role of CDK4/6 in cancer cells and the potential therapeutic effects of CDK4/6 inhibitors.
The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop
Nov. 30-Dec. 2, 2012 (Busan, Korea)
2. Arima Y, Hosonaga M, Sugihara E and Saya H
The role of CDK4/6 in cancer cells and the potential therapeutic effects of CDK4/6 inhibitors.
2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology
Dec. 15-19, 2012 (San Francisco, CA, USA)

[その他]

ホームページ

慶應義塾大学・医学部・先端研遺伝子制御
<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 好美 (ARIMA YOSHIMI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20309751