

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791510

研究課題名(和文) 乳がん間質相互作用における線維芽細胞のER活性化に着目した新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Tumor microenvironment regulated by carcinoma-associated fibroblasts with different ER-activating abilities

研究代表者

須田 哲司(SUDA, TETSUJI)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40423347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌の一部では腫瘍周囲の癌間質線維芽細胞(CAFs)が、エストロゲンを合成し、エストロゲン受容体(ER)を活性化することで増殖する。今回の解析から、CAFの癌抑制遺伝子の異常は希な現象で、ER活性化能がこれらとは独立して制御されることを明らかにした。また、ER活性化能の低いCAFは乳癌細胞株との共培養により複数の液性因子を産生し、これらが乳癌の増殖促進因子の一つであることを明らかにした。この液性因子によるリン酸化の解析から、当該カスケードは診断補助のマーカー候補となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are associated with tumor progression and metastasis, and are able to activate estrogen receptor (ER) in breast cancer. To elucidate whether the aberrant stromal cells are associated with ER-activation of tumor cells, we examined genetic aberrations of TP53 and PTEN in CAFs. Although various ER-activating abilities were detected in individual CAF, all CAFs maintained wild-type allele. These results suggest that the ER-activating ability of the cells is regulated independently of the aberration of these tumor suppressor genes. To investigate new therapeutic targets in the tumor microenvironment, we studied cytokines produced in co-culture of E10 cells and CAFs with different ER-activating abilities. Several interleukins (ILs) were detected at high-levels in the conditioned media from CAFs with low ER-activating abilities. Further understanding of significance of ILs and CAFs in breast cancer might be important to establish new therapeutic targets.

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：癌間質線維芽細胞 乳癌 相互作用

1. 研究開始当初の背景

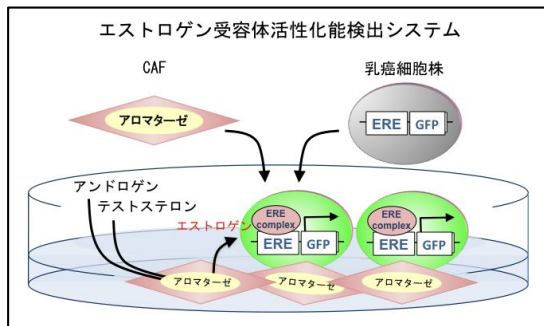
乳癌の増殖や転移には、腫瘍細胞のみならず、腫瘍周辺細胞も重要な役割を担っており、主に癌間質線維芽細胞(CAF)が腫瘍細胞と相互作用している。この癌間質相互作用には、1) CAFがエストロゲン代謝酵素アロマターゼの働きにより、腫瘍細胞を局所的にエストロゲン刺激する、2) CAF自体の遺伝子変異が、腫瘍細胞の癌抑制遺伝子の不活化を引き起こす、3) CAFから産生される増殖因子が、リン酸化を介してエストロゲン非依存的にエストロゲン受容体(ER)を活性化することなどが報告されている。しかし、CAFのアロマターゼ発現量は個体差や局在部位による違いがある他、エストロゲン受容体活性化能とは必ずしも一致していない。そのため、CAFは症例それぞれによって異なる性質を持ち、複合的に癌の進展を促進していると考えられるが、その作用機序など不明な点が多い。

2. 研究の目的

乳癌の癌間質線維芽細胞の性質を明らかにし、腫瘍細胞の増殖促進に関わる因子の同定を目的とする。CAFのエストロゲン受容体活性化能を指標として、genetic、genomicおよびnon-genomicな特徴を明らかにし、更に腫瘍細胞との共培養により相互作用の違いを解析することで、症例毎のCAFによる増殖メカニズムを同定する。これによりCAFを診断補助として利用できるのみならず、CAFが癌治療の新たな標的となり得る。

3. 研究の方法

(1) 乳癌患者より切除された乳癌組織および周辺組織を分離し、短期培養することでCAFのみを純化し、初代培養細胞とする。純化したCAFについて、TP53とPTEN遺伝子変異の有無をPCRダイレクトシーケンスにより解析する。また、同遺伝子領域のゲノム構造の変化を明らかにするため、定量PCRベースのcopy number variations assayによりヘテロ接合性の消失(LOH)の有無を解析する。これらの解析からCAF自体のgeneticな異常による影響について検討する。初代培養CAFはそのエストロゲン受容体活性化能も測定する。エストロゲン受容体活性化能は、既に確立している方法(Cancer Res, 2005, 65: 4653-4662)に従い、エストロゲン応答配列



(ERE)-GFPを安定導入した乳癌細胞株MCF7とCAFとの共培養により可視化・数値化する。

なお、今回分離されるCAFに加え、既に研究協力者らによって分離され、エストロゲン受容体活性化能の明らかな乳癌患者由来CAF初代培養細胞も併せて解析する。

(2) 癌間質相互作用にはCAFの遺伝子不安定化以外の因子の関与も考えられる。これまでの解析から、この相互作用は乳癌細胞とCAFとが直接接触しなくても、エストロゲン受容体を活性化できるため、サイトカインや増殖因子などの液性因子によるものと考えられる。そこで、この相互作用に関わる因子を明らかにし、CAFの増殖促進シグナル経路を同定するため、(1)の解析から明らかとなるエストロゲン受容体活性化能の異なるCAFと腫瘍細胞との共培養下において発現量の異なる因子を探索する。共培養後の培養上清中の蛋白量に差の認められた因子の中から、エストロゲン受容体活性化能の低いCAFにおいて発現が亢進する因子に着目して解析する。また、当該因子について、腫瘍細胞内における増殖因子としての機能およびそのシグナル伝達経路、ホルモン療法抵抗性との関連性等について解析する。

(3) 癌細胞に対するCAFの短期的な相互作用だけでなく、長期的な作用の影響を解析する。CAFと乳癌細胞株とを直接長期共培養後、腫瘍細胞内の蛋白発現を比較し、CAFからの刺激と癌細胞の性質変化との関連性を検討する。

4. 研究成果

種々のエストロゲン受容体活性化能を示す20検体のCAFについてTP53およびPTEN遺伝子の変異を解析したが、異常は認められなかった(表1)。

表1 Mutation analysis of TP53 and PTEN in CAFs

CAF No.	GFP positive rate (%)	TP53	PTEN
1	4.6	wt	wt
2	27.3	wt	wt
3	27.5	wt	wt
4	2.8	wt	wt
5	9.3	wt	wt
6	1.0	wt	wt
7	40.5	wt	wt
8	38.8	wt	wt
9	31.0	wt	wt
10	38.2	wt	wt
11	5.0	wt	wt
12	28.5	wt	wt
13	9.3	wt	wt
14	13.1	wt	wt
15	28.5	wt	wt
16	14.5	wt	wt
17	23.7	wt	wt
18	12.5	wt	wt
19	9.3	wt	wt
20	16.2	wt	wt

wt, wild-type.

また、同遺伝子領域のLOHも解析したが、欠失は認められず、PTEN遺伝子において微増を示すもカットオフ値以下であった(図1)。この結果、これまでの報告とは異なり、CAFの癌抑制遺伝子の不活化が癌間質相互作用に関与する頻度は低かった。よって、エストロゲン受容体活性化能はこれらの遺伝子とは独立して機能することが明らかとなった。

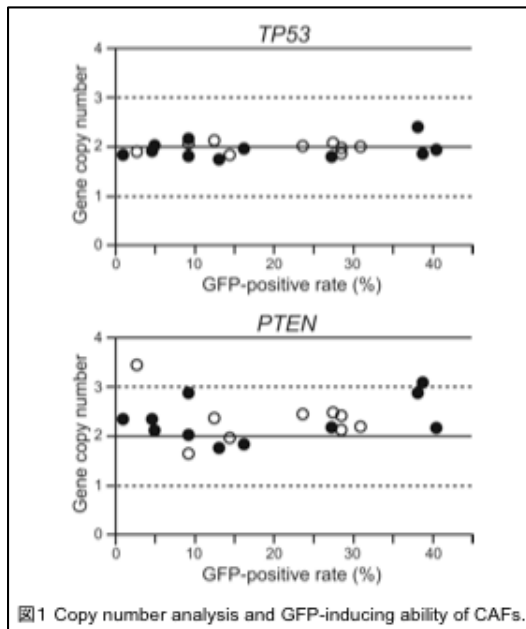


図1 Copy number analysis and GFP-inducing ability of CAFs.

本解析に用いた検体の臨床病理学的解析から、腫瘍のエストロゲン受容体発現と CAFのエストロゲン受容体活性化能、およびアロマターゼの発現とは必ずしも一致しないことが明らかとなった。このことから、アロマターゼを介したエストロゲン受容体の活性化とは異なるエストロゲン受容体活性化経路やエストロゲン受容体以外の増殖促進機構の存在が示され、治療効果の得られにくい乳癌の原因の一つと考えられる。そこで、これらの乳癌の癌間質相互作用に関わる因子を明らかにするため、エストロゲン受容体活性化能の異なるCAFと乳癌細胞株とを共培養し、その培養上清中において蛋白量の異なる因子を、約 80 の増殖因子およびサイトカインから探索した(図2)。

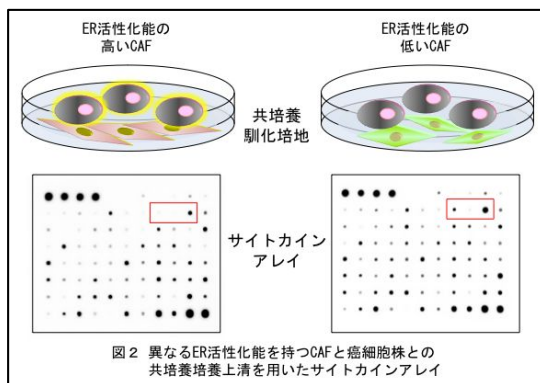


図2 異なるER活性化能を持つCAFと癌細胞株との共培養培養上清を用いたサイトカインアレイ

その結果、エストロゲン受容体活性化能の低いCAFとの共培養下で複数のインターロイキン(ILs)の産生量が多かった。このうち2つのILsの培養上清中濃度について、検体数を増やして測定した結果エストロゲン受容体活性化能の低い検体では、ILs濃度が高い傾向を示した(図3)。

さらに、これらのILsは乳癌細胞株から発現しているのか、CAFから発現しているのかを明らかにするため、それぞれの細胞中の

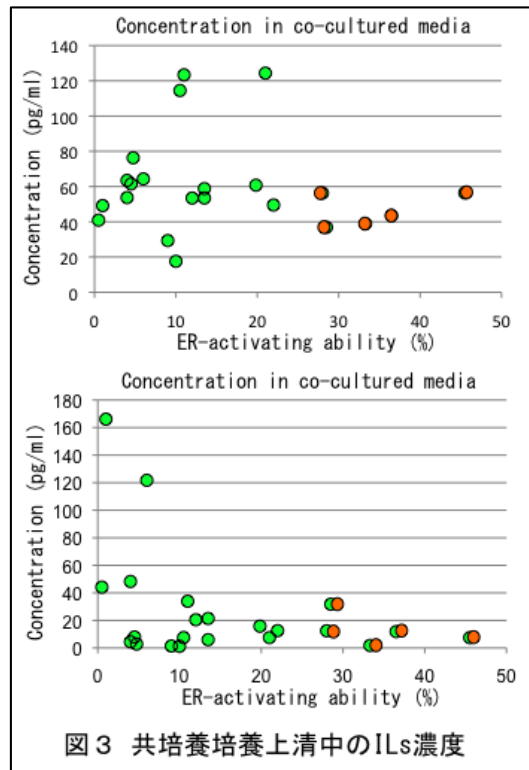


図3 共培養培養上清中のILs濃度

RNA量を解析した結果、主にCAFから発現していることが確認された。次に、これらのILsが腫瘍細胞の増殖に関与しているのかを明らかにするため、乳癌細胞株にILs組換え蛋白を添加培養し、増殖能を解析した。その結果、乳癌細胞株5株中2株において、増殖促進が確認

され、エストロゲン受容体陽性乳癌細胞株のみならず、陰性株においても増殖促進することが判明した。これにより、今回同定されたILsは乳癌の増殖促進因子の一つであることが明らかとなった。このエストロゲン受容体陽性・陰性乳癌細胞株それぞれに対し、ILsの一つを添加した結果、エストロゲン受容体陰性乳癌細胞株において Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)カスケード蛋白が活性化した。さらに、抗エストロゲン剤の添加によって、この活性化は増強することが確認された。この結果により、当該カスケードは診断補助マーカー候補となり得ることが示唆され、臨床検体を用いた解析へと展開できる。一方、これ以外のILsのシグナルカスケードの解析が今後の課題として残された。

CAFの持つエストロゲン受容体活性化能は株化・樹立し、長期間培養後もその性質が概ね維持されている。本解析から明らかとなった乳癌細胞株とCAFとの共培養により産生される液性因子は短期培養における変化を解析した結果であり、実際の腫瘍組織においては長期に渡り持続的に相互作用していると考えられる。そこで、癌細胞に対するCAFの長期的な相互作用の影響を明らかにするため、CAFをstimulatorとして乳癌細胞株とCAFとを長期培養した。その後、乳癌細胞株の蛋白発現を Phospho Antibody Array によ

り網羅的に探索し、癌化に伴い活性化されるシグナル蛋白を同定した。その結果、短期培養実験により明らかになった IL 下流のシグナル蛋白のみならず、細胞の遊走や浸潤に関わる蛋白も活性化されていることが明らかになった。これらの結果は、癌細胞の性質が癌間質相互作用を伴う微小環境によって変化すると考えられる。しかし、実際に浸潤能が増しているのか、どの CAF においても遊走・浸潤に関わる蛋白が活性化されるのかは明らかになっておらず、検体数を増やした解析によりメカニズムの解明へと展開する必要がある。

今回、乳癌患者由来 CAF のエストロゲン受容体活性化能を指標とした癌間質相互作用の解析から、CAF の遺伝子異常は認められずエストロゲン受容体活性化能とも相関しないことが明らかになった。また、エストロゲン受容体活性化能の低い CAF において発現量の多い、乳癌細胞株の増殖を促進する液性因子を同定した。今後は、この液性因子について、患者検体を用いた解析から診断補助としての有用性を検証すると共に、その増殖メカニズムの解明や治療標的としての有用性を検討していく。

#### 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)

Suda T, Oba H, Takei H, Kurosumi M, Hayashi S, Yamaguchi Y. ER-activating ability of breast cancer stromal fibroblasts is regulated independently of alteration of TP53 and PTEN tumor suppressor genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 428: 259-63, 2012. 査読有。

##### [学会発表](計7件)

山口ゆり、須田哲司、武井寛幸、黒住献、黒住昌史、林慎一：乳癌の微小環境におけるエストロゲン非依存性の増殖促進因子。第72回日本癌学会学術総会。2013.10.5, 横浜。

Yuri Yamaguchi, Hanako Oba, Kenichi Inboue, Tetsuji Suda, Yuko Seino, Hiroyuki Takei, Masafumi Kurosumi, Atsushi Mizokami, Shin-ichi Hayashi: Estrogen signal-related heterogeneity of carcinoma-associated fibroblasts in breast cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormon & Cancer. 2012.11.16, Kanazawa. Tetsuji Suda, Yuko Seino, Sasagu Kurosumi, Hiroyuki Takei, Masafumi Kurosumi, Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi: Tumor microenvironment regulated by carcinoma-associated fibroblasts with different

ER-activating abilities. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormon & Cancer. 2012.11.16, Kanazawa.

山口ゆり、須田哲司、黒住献、武井寛幸、黒住昌史、林慎一：乳癌幹細胞に対する癌微小環境の解析。第71回日本癌学会学術総会。2012.9.20, 札幌。

須田哲司、清野祐子、黒住献、武井寛幸、黒住昌史、林慎一、山口ゆり：ER活性化能の異なる乳癌間質線維芽細胞が構築する癌微小環境の解析。第71回日本癌学会学術総会。2012.9.19, 札幌。

須田哲司、清野祐子、大庭華子、武井寛幸、黒住昌史、林慎一、山口ゆり：ER活性化能の異なる乳癌間質線維芽細胞が構築する癌微小環境の解析。第70回日本癌学会学術総会。2011.10.4, 名古屋。

山口ゆり、井上賢一、清野祐子、須田哲司、武井寛幸、田部井敏夫、黒住昌史、林慎一：アロマターゼ阻害剤の乳癌術前ホルモン療法におけるエストロゲンシグナルの変化。第70回日本癌学会学術総会。2011.10.3, 名古屋。

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

須田 哲司 (SUDA Tetsuji)  
琉球大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40423347