

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591929

研究課題名(和文) 癌特異的微小環境による乳癌幹細胞の動態制御と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Regulation of breast cancer stem cells by tumor microenvironment and analysis of target for therapy

研究代表者

山口 ゆり (Yamaguchi, Yuri)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：80166628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織から単離した癌特異的繊維芽細胞(CAF)を中心に、乳癌特異的微小環境の機能を解析し、乳癌細胞の増殖および乳癌幹細胞のmammosphere形成を促進する活性を明らかにした。乳癌幹細胞がERを発現していることも明らかにした。さらに、生体の微小環境下でホルモン療法耐性獲得の機構を解析するため、卵巣摘出SCIDマウスにMCF-7-E10乳癌細胞を移植し、ERの発現や増殖能が異なる複数の細胞株をin vivoで樹立した。これらの細胞株の乳癌幹細胞をCD44陽性CD24陰性の幹細胞マーカーで解析した結果、ER陽性耐性細胞株の方がER陰性の細胞株よりより幹細胞が多い傾向にあることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Estrogen and various growth factors are present in the breast cancer microenvironment, but their effects on breast cancer stem cells and the sensitivity to hormonal therapy remain unclear. We first analyzed the presence or absence of estrogen receptor (ER) in breast cancer stem like-cells derived from ER-positive MCF-7-E10 breast cancer cells transfected with ERE-GFP. Breast cancer stem like-cells express ER that could be activated by estrogen. Carcinoma-associated fibroblasts obtained from breast cancer tissues stimulate mammosphere growth of breast cancer stem like-cells derived from MCF-7-E10 cells. To analyze the mechanisms of in vivo development of estrogen-depletion resistance (EDR), we established several EDR cell lines from xenografts of MCF-7-E10 cells in ovariectomized SCID mice. ER expressions are decreased in some of EDR cell lines. ER positive EDR cell lines have more breast cancer stem like-cells than ER-negative ones.

研究分野：腫瘍生物学 内分泌学

キーワード：乳癌 ホルモン療法 癌微小環境 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

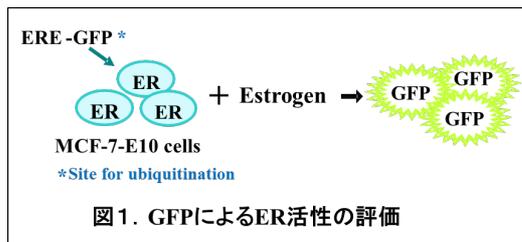
閉経後乳癌において腫瘍周辺の線維芽細胞 CAF (Carcinoma-Associated Fibroblast) はエストロゲン代謝酵素アロマターゼを発現し、局所的にエストロゲンを供給する。アロマターゼ阻害剤(AI)は閉経後乳癌に高い奏効性を示すがエストロゲン受容体(ER)陽性乳癌の1/3では奏効しない。その理由として、CAF などの間質細胞が癌微小環境で種々の因子を産生し、癌の進展、転移に影響することが指摘されているが詳細は不明である。また、近年、自己複製能と多分化能を有する乳癌幹細胞は抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示し、転移、再発の原因として報告され、治療の標的として注目されているが、ER の発現の有無、微小環境の影響などその制御は明らかではない。

2. 研究の目的

我々はCAF を中心に乳癌における微小環境の個性を明らかにし、癌微小環境の治療の標的としての重要性を報告してきた。乳癌幹細胞に対する微小環境(ニッチ)の機能については不明な点が多く、本研究では、乳癌幹細胞の ER 活性の有無、乳癌特異的かつ個々の症例に特異的な癌微小環境(ニッチ)の乳癌幹細胞に対する機能解析、ホルモン療法耐性獲得における乳癌幹細胞の機能を解析するための AI 耐性モデル乳癌細胞株の樹立を行う。

3. 研究の方法

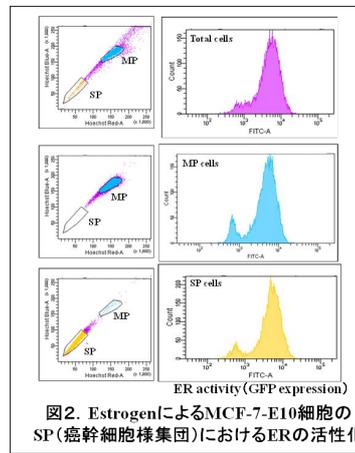
我々は、ヒト乳癌細胞株に ERE(estrogen response element)-GFP を安定導入した ER 活性のレポーター細胞株 MCF-7-E10 細胞を樹立し(図1)、CAF による ER 活性化能を定量



するシステムを構築し、CAF の個性を報告してきた。本研究ではこの細胞を用いて乳癌幹細胞における ER の機能、CAF の培養上清(CM)による乳癌幹細胞への影響を解析する。さらに、ホルモン療法耐性のメカニズムを解析するため、卵巣摘出 SCID マウスの Xenograft から in vivo で AI 耐性を獲得したモデル細胞株を樹立する。

4. 研究成果

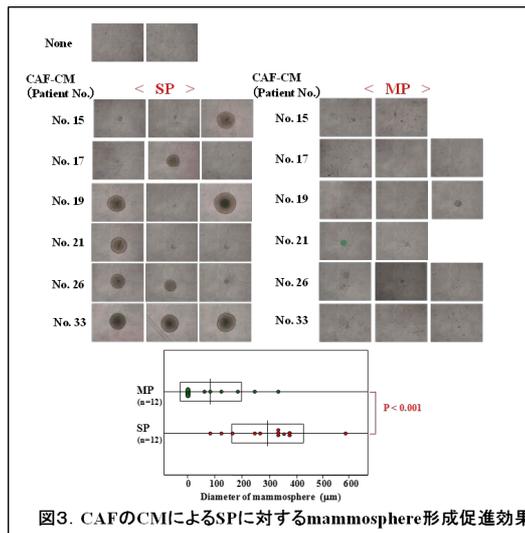
(1)はじめに、ERE-GFP を導入した ER 陽性乳癌培養細胞株 MCF7-E10 から乳癌幹細胞を単離し、ER の発現および乳癌微小環境の液性因子の効果を検討した。乳癌幹細胞は、薬剤を排出する機能が強く、Hoechst 陰性の細胞集団(side population cells; SP 細胞)とし



て同定することができることから、MCF7-E10 細胞のSP細胞集団をフローサイトメトリーで検出し、ソーティングにより単離した。SP細胞のER活性をGFPの発現で解析した

結果、正常乳腺幹細胞はERを発現しないが、MCF-7-E10 細胞由来の乳癌幹細胞は非癌幹細胞集団MPと同様のER活性を示した(図2)。ALDH1(アセトアルデヒド脱水素酵素タイプ1)をマーカーとしてMCF7-E10細胞から単離した乳癌幹細胞においても同様の結果が得られ、以上の結果から乳癌幹細胞はER陽性であることが分かった。

(2)次に乳癌幹細胞に対する微小環境の影響をCAFの培養上清を用いて解析した。SPの細胞は癌幹細胞のマーカーであるmammosphere(乳癌細胞塊)形成能を示すが、CAFの培養上清(CM)を添加したところ、細胞増殖およびmammosphere形成が促進された(図3)。ALDH1陽性細胞に対しても同様にCAFのCMはその増殖を促進した。乳癌組織由来の液性因子も同様にSPのmammosphere形成を促進した。



(3)我々はin vitroでAI耐性モデル乳癌細胞株を樹立し、複数の耐性機構があることを報告してきた。今回は、AI耐性獲得における微小環境の機能をより生体内に近い条件で解析するため、卵巣摘出SCIDマウスにMCF-7-E10細胞を移植し、耐性モデル細胞株の樹立を行った。エストロゲン供給の無い卵巣を摘出した状況下ではMCF-7-E10細胞はエストロゲンを投与しないと腫瘍は形成しな

い。しかし、移植した卵巣摘出 SCID マウスを長期飼育したところ、5ヶ月以上経過して腫瘍形成を認め、複数の細胞株が得られた

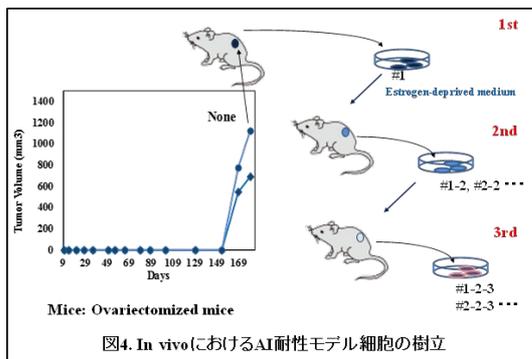


図4. In vivoにおけるAI耐性モデル細胞株の樹立

(図4) 腫瘍から単離した細胞株は invitro においてもエストロゲン非依存性に増殖した。

親株はER陽性であるが、これらのAI耐性モデル細胞株について、ER、PgR、HER2の発現を免疫染色(図5)およびWestern(図6)で解析したところ、発現レベルは細胞株によって異なり、頻度は少ないがER、PgR、HER2すべて陰性の細胞株もあることがわかった。

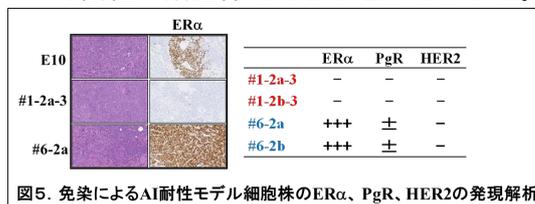


図5. 免疫によるAI耐性モデル細胞株のERα、PgR、HER2の発現解析

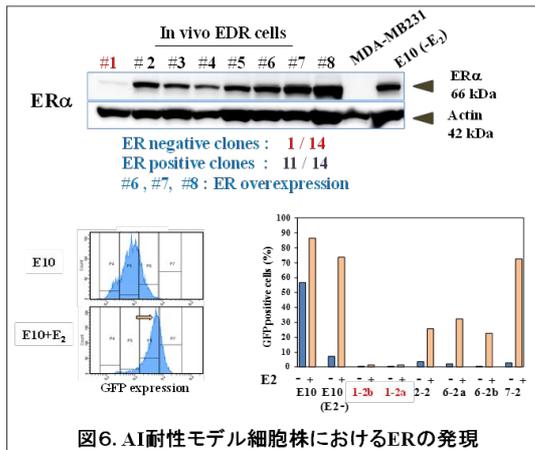


図6. AI耐性モデル細胞株におけるERの発現

それぞれの細胞株を再度卵巣摘出 SCID マウスに移植しても(図4)これらの特性が変化することはなかった。ER陽性の耐性細胞株はエストロゲン非依存性に増殖し、ERがエストロゲン非依存的に活性化されていることが示唆された。これらの細胞株ではエストロゲンを添加すればERの活性は増加し(図6)ER阻害剤Fluvestrantで阻害された。一方、AI耐性モデル細胞株について、CD44陽性CD24陰性の幹細胞マーカーで乳癌幹細胞を解析した結果、ER陽性の耐性モデル細胞株の方がER陰性の細胞株よりより幹細胞が多い傾向にあることが判明した。

以上、本研究により、乳癌幹細胞は正常乳腺幹細胞とは異なり、ERを発現し、活性化され

ること、CAFが産生する因子をはじめとし、乳癌微小環境中の因子が乳癌幹細胞の増殖を促進することが示唆された。また、invivoの微小環境下で、耐性機構の異なる複数のAI耐性モデル細胞株を樹立することができた。今後はこれらの細胞株を用いて、耐性獲得機構を解析する。

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)

[雑誌論文](計5件)

Hanamura T, Niwa T, Gohn T, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism pathways in hormone responsive primary breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 査読あり, 2014,143:69-80. DOI: 10.1007/s10549-013-2788-3

Fujiki N, Konno H, Kaneko Y, Gohn T, Hanamura T, Imami K, Ishihama Y, Nakanishi K, Niwa T, Seino Y, Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen response element-GFP (ERE-GFP) introduced MCF-7 cells demonstrated the coexistence of multiple estrogen-deprivation resistant mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読あり, 2014, 139:61-72. DOI: 10.1016/j.jsmb.2013.08.012

Yamaguchi Y, Seino Y, Takei H, Kurosumi M, Hayashi S. Detection of estrogen-independent growth-stimulating activity in breast cancer tissues: implication for tumor aggressiveness. *Cancer Microenvironment*. 査読あり, 2014, 7:23-31. DOI: 10.1007/s12307-013-0139-x

Hanamura T, Niwa T, Nishikawa S, Konno H, Gohn T, Tazawa C, Kobayashi Y, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. *Breast Cancer Res Treat*. 査読あり, 2013,139:731-740. DOI: 10.1007/s10549-013-2595-x

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*. 査読あり, 2012, 428:259-263. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.035

[学会発表](計20件)

Kimura M, Hanamura T, Kaneko Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Endo I, Hayashi S: Efficacy

of everolimus and development of its resistance in various types of long-term-estrogen-depletion resistant MCF-7 in vitro and in vivo. The 37 San Antonio Breast Cancer Symposium, December 9-13, 2014, San Antonio, TX, USA.

山口ゆり、木村万里子、内海加奈美、林 慎一： 卵巣摘出マウスにおけるホルモン療法耐性乳癌の Xenograft モデル. 第 73 回日本癌学会学術総会、9.25、2014、横浜. 内海 加奈美、佐藤 望、伊藤 貴子、平川 久、山口ゆり、林 慎一： 乳癌細胞における癌幹細胞性とホルモン療法耐性の関係. 第 73 回日本癌学会学術総会. 9.25、2014、横浜.

木村万里子、藤木 夏、丹羽俊文、山口ゆり、遠藤 格、林 慎一： エストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株における mTOR 阻害剤耐性メカニズムの検討. 第 73 回日本癌学会学術総会. 9.25、2014、横浜.

福井布美代、内海加奈美、山口ゆり、林 慎一： ヘレグリンによるエストロゲン受容体、ErbB 受容体ファミリーの変化と癌幹細胞との関連. 第 73 回日本癌学会学術総会 9.25-27、2014、横浜.

内海 加奈美、佐藤 望、山口ゆり、林 慎一： 乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 . 7.10-12、2014、大阪 .

花村 徹、丹羽俊文、遠藤 恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤 研一、林 慎一： ホルモン感受性乳癌における Aromatase 非依存的 Steroid 代謝経路の役割. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 . 7. 10-12、2014、大阪 .

木村万里子、金子陽介、藤木 夏、丹羽俊文、山口ゆり、遠藤 格、林 慎一： ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 におけるエストロゲン枯渇耐性割 mTOR 阻害剤耐性の分子生物学的特徴. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 . 7. 10-12、2014、大阪 .

Kimura M, Hanamura T, Niwa T, Yamaguchi Y, Endo I, Hayashi S: Molecular characterization of everolimus resistant cell lines established from estrogen depletion- resistant MCF-7. AACR Annual Meeting 2014, April 5-9, 2014, San Diego, CA, USA.

山口ゆり、須田哲司、武井寛幸、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. 10.3-5、2013、横浜.

内海 加奈美、佐藤 望、伊藤 貴子、田中美穂、田澤 智香、山口ゆり、林 慎一： 乳癌細胞における癌幹細胞性とホルモン療法耐性の関係. 第 72 回日本癌学会学術総会. 10.3-5、2013、横浜.

花村 徹、丹羽俊文、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤 研一、林 慎一： 閉経後ホルモン感受性乳癌における Androgen 代謝による Aromatase 非依存的 ER 活性化機構と新規治療の可能性. 第 21 回乳癌学会学術総会 .6.27-29.2013、浜松 .

山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤 研一、林 慎一： 閉経後ホルモン感受性乳癌における Androgen 代謝による Aromatase 非依存的 ER 活性化機構と新規治療の可能性. 第 21 回乳癌学会学術総会 .6.27-29.2013、浜松 . Hanamura T, Niwa T, Nishikawa S, Konno H, Gohn T, Tazawa C, Kobayashi Y, Kurosuni M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S: The androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor positive cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. AACR Annual Meeting 2013, April 6-10, 2013, Washington, DC, USA Hanamura T, Niwa T, Nishikawa S, Konno H, Gohn T, Kobayashi Y, Kurosuni M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S: The androgen metabolite- dependent growth in hormone receptor positive breast cancer as a novel aromatase inhibitor-resistance mechanism. The 2012 CTSC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, December 4-8, 2012, San Antonio, TX, USA.

Suda T, Seino Y, Kurozumi S, Takei H, Kurosuni M, Hayashi S, Yamaguchi Y: Tumor microenvironment regulated by carcinoma-associated fibroblasts with different ER- activating abilities. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormon & Cancer, November 15-17, 2012, Kanazawa, Japan.

Yamaguchi Y, Oba H, Inoue K, Suda T, Seino Y, Takei H, Kurosuni M, Mizokami A, Hayashi S: Estrogen signal-related heterogeneity of carcinoma-associated fibroblasts in breast cancer. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormone & Cancer, November 15-17, 2012, Kanazawa, Japan.

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 . 9.19-21、2012、札幌

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微小環境の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 . 9.19-21、2012、札幌

花村 徹、丹羽俊文、遠藤 恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤 研一、林 慎一： Androgen シグナル抑制による AI 剤耐性機構. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 . 6.28-30、2012、熊本 .

ホームページ等

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所
<http://www.pref.saitama.lg.jp/saitama-cc/kenkyujo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 ゆり (YAMAGUCHI YURI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究
所・主幹

研究者番号：80166628