

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460458

研究課題名(和文) DNAコピー数異常からアプローチするトリプルネガティブ乳癌の新規治療法の研究

研究課題名(英文) Study of a novel therapy of the triple-negative breast cancers (TNBC) -based on DNA copy number aberration.

研究代表者

近藤 智子(古屋智子)(KONOD-FURUYA, Tomoko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30379979

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)：特異的な治療法の確立されていないトリプルネガティブ乳癌(TNBC)に対する新規治療法開発をめざし、TNBC臨床検体で特異的にコピー数減少が認められたゲノム領域にコードされているインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )に注目し、IFN- $\gamma$ がTNBCの増殖にどのような影響を与えるかを培養細胞を用いて検討した。TNBC由来培養細胞の多くでIFN- $\gamma$ による細胞増殖抑制効果が確認できたが、TNBC由来にもかかわらず細胞増殖抑制効果が確認されないものもあった。また細胞増殖が抑制される機構も複数あることが細胞周期解析によって明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Triple-negative breast cancer (TNBC) is refractory breast cancer because specific therapies are not established. We focused on interferon gamma (IFN-gamma) which is located in the genomic loss region exclusively in TNBC and investigated the effect of INF-gamma on TNBC in vitro. Several cell lines derived from TNBC were inhibited cell proliferation by IFN-gamma. However, one cell line from TNBC was not inhibited. INF-gamma altered the cell cycle and the expression levels of some cell-cycle associated proteins in TNBC cell lines. The patterns of change in the expression levels of these proteins were different in cell lines. This suggests that IFN-gamma arrest cell cycles via several pathway in TNBC.

研究分野：人体病理学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 ゲノム異常 イメージサイトメトリー 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性において部位別罹患率が第1位の悪性腫瘍である。現在、乳癌では手術、放射線療法、薬物療法を適切に組み合わせ治療が行われている。その中の薬物治療では、乳癌をホルモン受容体(エストロゲンレセプター、以下ERとプロゲステロンレセプター、以下PgR)の発現の有無、およびHER2 遺伝子の過剰発現の有無によって表1のように大きく4つに分け、それにあった治療薬が選択されている。

		ホルモン受容体陽性	ホルモン受容体陰性
HER2受容体陰性	低増殖能	Luminal A	トリプルネガティブ
	高増殖能	Luminal B (HER2陰性)	
HER2受容体陽性		Luminal B (HER2陽性)	HER2タイプ

表1 乳癌のサブタイプ分類(国立がん研究センター がん情報サービスより改変)

このうち、ホルモン受容体陰性かつHER2の過剰発現を認めないトリプルネガティブ乳癌(Triple Negative Breast Cancer, 以下TNBC)に対しては特異的な有効薬剤がなく、現時点で選択される薬剤は従来の化学療法剤であり、特異的治療法の開発が望まれている。

本研究課題に先立って、我々は外科的に切除された乳癌組織についてゲノム解析を行ってきたが、その中でTNBC 特異的に12q14領域のDNA コピー数が減少していることを突き止めた。そこで本研究課題ではこのコピー数減少がTNBCの生物学的特徴と関連があると考え、その領域にコードされている遺伝子のうち、インターフェロン(IFN-)に注目しTNBCの細胞増殖にどのような影響を与えるのかについて検討を行った。

### 2. 研究の目的

TNBC に対する特異的治療法の開発を目指して、TNBC で特異的に変化のあったゲノム領域にコードされる遺伝子、特にIFN-に注目し、TNBC 腫瘍細胞に対する直接的な細胞増殖抑制効果の有無について、さらにはそのメカニズムについてTNBC 由来および非TNBC 由来の培養細胞を用いて明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1)細胞: TNBC 由来の培養細胞5種類(MDA-MB-468、HCC1143、HCC1395、HCC1937、HCC1806)非TNBC 由来培養細胞3種類(MCF-7、HCC202、HCC1500)を使用した。細胞はATCC およびJCRB 細

胞バンクより入手した。

(2)細胞培養およびIFN- 濃度の決定: それぞれの培養細胞は10%仔牛血清を加えた推奨培地で培養した。IFN- の濃度はTNBC 由来培養細胞であるMDA-MB-468細胞による検討で、最終濃度5ng/mlに決定した。

(3)細胞増殖曲線: それぞれの細胞はIFN- 添加したものと非添加のものについて、Day0、Day1、Day2、Day3、Day4の5時点で細胞数を計測し細胞増殖曲線を得た。

(4)細胞周期解析: 細胞数を計測し終えた細胞はPBS(-)で洗浄し、オートスマアでスライドグラス上に張り付けた後、100%エタノール、常温10分で固定後、風乾した。このスライドグラスを室温で15分間RNase(1mg/ml)処理し、50µg/mlのpropidium iodide(以下PI)でDNA染色を行った。染色後、カバーグラスをかけ透明マニキュアで周囲に封をし、イメージサイトメーター(RS100、オリンパス)で各細胞の核DNA量を測定した。DNAヒストグラムを作成し、各細胞周期(G1期、S期、G2/M期)にある細胞数の割合を算出した。

(5)細胞内タンパク質発現解析: サイクリンB1、リン酸化ヒストンH3(Ser10)、Ki-67などについて蛍光免疫染色(間接法)を行い、イメージサイトメーターで細胞におけるそれぞれのタンパク質の発現強度を測定し、陽性率を算出した。

(6)BrdUによる細胞増殖解析: IFN- 添加後4日目(Day4)の培養細胞においてBrdUを最終濃度10µMになるように培地に添加し、30分後に細胞を回収し、オートスマアでスライドグラスに張り付けたのち100%エタノールで固定した。固定後はHCl、ホウ酸緩衝液(pH6.0)で処理後、1次抗体に抗BrdU抗体、二次抗体にAlexa Fluor 488標識の抗マウスIgG抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その後RNase処理およびPIで核染色を行った。BrdU陽性細胞の割合をイメージサイトメーターにて計測した。

### 4. 研究成果

(1)IFN- の細胞増殖抑制効果について TNBC 由来培養細胞のうち、MDA-MB-468、HCC1395、HCC1937において、非TNBC 由来培養細胞のうちHCC202においてIFN- による細胞増殖抑制効果がみられた。一方非TNBC 由来培養細胞である、MCF-7、HCC1500およびTNBC 由来培養細胞であるHCC1806ではIFN- による細胞増殖抑制効果は認められなかった。図1に例としてHCC1395の細胞増殖曲線を示す。

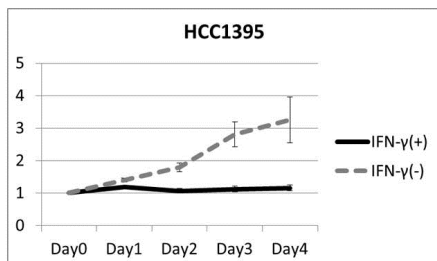


図1 HCC1395の細胞増殖曲線。Day0を1とし各計測時点での細胞数との比をグラフに示した。IFN $\gamma$ を添加した細胞では細胞増殖が抑制された。

当初、IFN $\gamma$  は TNBC に対して細胞増殖抑制効果が期待できると考えていた。実際 TNBC 由来培養細胞の多くで IFN $\gamma$  により細胞増殖が抑制されたが、抑制されない細胞もあった。一方、非 TNBC 由来の培養細胞でも IFN $\gamma$  により細胞増殖が抑制されたものもあり、TNBC であること以外の IFN $\gamma$  により細胞増殖が抑制される細胞とそうでない細胞との間にどのような違いがあるのかは今後の検討課題である。

## (2) 細胞周期解析および細胞周期関連タンパク発現レベルについて

IFN $\gamma$  により細胞増殖が抑制された TNBC 由来培養細胞のうち HCC1395、HCC1937、HCC1143 について IFN $\gamma$  添加群と非添加群とで比較した。

### DNA 量測定による細胞周期解析と BrdU による DNA 合成期細胞の割合の変化

細胞集団における各期の割合は核 DNA 量を測定して求めることができる。HCC1395、HCC1143 では G1 期細胞の割合が若干減少し、G2/M 期の細胞がその分増加していた。HCC1937 では G1 期細胞が若干減少し、S 期細胞がその分増加し、G2/M 期細胞はほとんど変化がなかった。次に BrdU 陽性細胞、つまり DNA 合成が行われている細胞（真の意味で S 期にある細胞）の割合を比較したところ、いずれの培養細胞でも IFN $\gamma$  添加により S 期細胞の割合が減少しており、中でも HCC1937 は IFN $\gamma$  非添加群と比べて3分の1程度に減少していた。この結果は HCC1937 で S 期細胞が増加したことに一見矛盾するように思えるが、S 期から G2/M 期への移行の間に細胞周期に抑制がかかっていると考えると Day4 の時点では DNA を合成している細胞は減ってくる、つまり BrdU 陽性細胞は減少するが G2 期に進めず S 期にとどまっている細胞がたまるため DNA 量的に S 期にある細胞の数が増えてくると考えれば矛盾しない。HCC1395 や HCC1143 では細胞分裂の時点で細胞周期が停止していると考えれば G2/M 期の細胞が増え、G1 期の細胞が減少することが説明できる。

### 細胞周期関連タンパクの発現レベルの変化

細胞周期関連タンパクのうちサイクリン B1、リン酸化ヒストン H3(Ser10)、Ki-67 の陽性率を IFN $\gamma$  添加群と非添加群とで比較した。サイクリン B1 は G2 期に発現し、リ

ン酸化ヒストン H3 (Ser10) は M 期に発現するタンパク質である。Ki-67 は機能面では不明な点が多いが細胞周期に入っている細胞の核に陽性になり、細胞増殖能を反映している。HCC1937 は細胞周期解析からは S 期から G2/M 期への移行の間に細胞周期に抑制がかかっていると考えられたが、IFN $\gamma$  添加群でサイクリン B1 およびリン酸化ヒストン H3(Ser10)の発現が減少しておりこの予想を

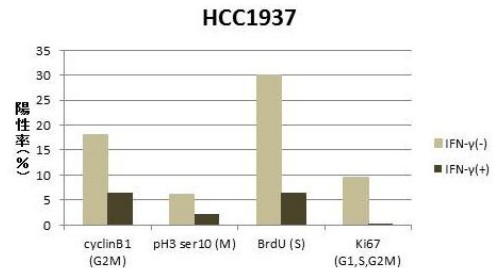


図2 HCC1937 (における細胞周期関連タンパクの発現解析)

支持するものであった(図2)。HCC1395、HCC 1143 ではサイクリン B1 の発現が上昇し、リン酸化ヒストン H3(Ser10)の発現が低下していた(図3)。これは細胞分裂の時点で細胞周期が停止していると予想した細胞周期解析の結果に矛盾しない。

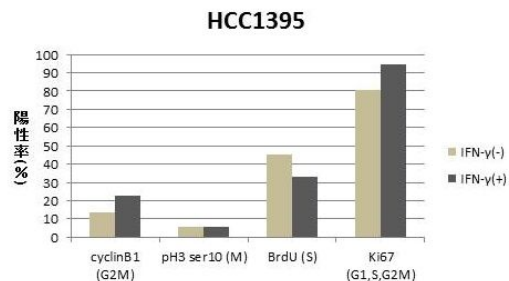


図3 HCC1395 (における細胞周期関連タンパクの発現解析)

HCC1937、HCC1143、HCC1395 はいずれも IFN $\gamma$  によって細胞増殖が抑制されたが、DNA 量や BrdU による細胞周期解析や細胞周期関連タンパクの発現レベルの解析から HCC1937 と HCC1143 および HCC1395 ではそのメカニズムに差があることが示唆され、具体的にどの分子に IFN $\gamma$  作用し細胞周期が抑制されるのか、今回検討できなかった細胞周期関連タンパクや IFN $\gamma$  のシグナル伝達にかかわる分子の発現レベルの IFN $\gamma$  添加による影響を検討する必要があると考えている。

### (3) まとめ

本研究課題では IFN $\gamma$  がいくつかの乳癌由来の培養細胞について細胞増殖抑制効果を示した、IFN $\gamma$  による細胞増殖抑制のメカニズムには複数の経路が存在することが示唆される、という2点が明らかにされた。ただ、当初の目的であった TNBC 特異的治療の開発を目指すことについては TNBC 由来

でありながら細胞増殖抑制が見られなかった細胞が存在したことより IFN- は TNBC 特異的治療に用いることは難しいと考えられる。しかしながら非 TNBC 由来培養細胞でも IFN- による細胞増殖抑制が認められるものもあり、IFN- による細胞増殖が抑制される細胞とそうでない細胞には何かしら遺伝型あるいは発現型に差があるはずで、今後 IFN- による細胞増殖抑制のメカニズムを解明するとともに、IFN- での治療が見込める癌細胞のマーカーの発見（検索）を行っていく予定である。

#### 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6件)

北風裕教、重本昌也、古屋智子、松野浩嗣  
がん細胞のタンパク質情報を考慮に入れた、  
SVM による病理診断システムの可能性 産  
業応用工学会論文誌 第3巻 2015  
56-64 (査読有)

Ito H, Oga A, Ikemoto K, Furuya T,  
Maeda N, Yamamoto S, Kawauchi S, Itoh  
H, Oka M, Sasaki K. Analysis of  
centromere signal patterns in breast  
cancer cells with chromosomal instability  
using image cytometry combined with  
centromere fluorescence in situ  
hybridization. Cytometry A, vol 85, 2014,  
809-916

DOI: 10.1002/cyto.a.22502 (査読有)

Amakawa G, Ikemoto K, Ito H, Furuya T,  
Sasaki K. Quantitative analysis of  
centromeric FISH spots during the cell  
cycle by image cytometry. J Histochem  
Cytochem. Vol 61, 2013, 699-705.

DOI: 10.1369/0022155413498754(査読有)

##### [学会発表](計5件)

古屋智子 病理組織の分子遺伝学的解析  
によるゲノム変化と臨床病態との関連につ  
いて 第105回日本病理学会 2016年5  
月12日~5月14日 仙台国際センター(宮  
城県・仙台市)

古屋智子、伊藤秀明、北風裕教、小賀厚徳、  
佐々木功典、伊藤浩史 イメージサイトメ  
ーターを用いたインターフェロンの細胞  
増殖抑制効果に関する研究 第25回日本  
サイトメトリー学会学術集会 2015年7月  
11日~7月12日 ソラシティカンファレン  
スセンター(東京都・千代田区)

近藤(古屋)智子、原田美沙、伊藤秀明、  
帖地康世、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功  
典、伊藤浩史 インターフェロンガンマの  
乳癌由来培養細胞への影響についての細胞  
周期的解析 第104回日本病理学会総会  
2014年4月30日~5月2日 名古屋国際  
会議場(愛知県・名古屋市)

伊藤秀明、小賀厚徳、古屋智子、池本健三、  
帖地康世、佐々木功典、河内茂人 イメ  
ージサイトメトリーを用いた染色体不安定性  
の解析 第103回日本病学会総会 2013  
年6月7日 ロイトン札幌 札幌芸文館 北  
海道・札幌市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

近藤 智子(古屋 智子)

(KONDOU-FURUYA, Tomoko)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30379979

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

なし