

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461995

研究課題名(和文) 乳がん内における腫瘍細胞の不均一性と転移ニッチの解析

研究課題名(英文) RNA Sequencing Analysis of Distant 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

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)：他臓器への転移機構を解明することは、乳がん患者の予後改善につながると考えられる。本研究では、転移の最終ステップであるcolonizationに関わる分子機構を明らかにすることを目的とした。ヒトHER2乳がんおよびトリプルネガティブ乳がん細胞株をマウス左心室内に注入して乳がんの遠隔転移モデルを作製し、転移巣からRNAを抽出してRNA-seq解析を行った。転移巣と原発巣において、がん細胞と周辺細胞由来の双方の発現遺伝子について解析を行い、がん細胞が転移先の組織に定着するのに重要な役割を果たす因子(転移ニッチ)の同定を試みた。それらの因子は転移がんの治療の標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our understanding of the causes and treatment of primary breast cancer has advanced, however, the biological and molecular mechanisms of distant metastases have not been clearly defined and remain uncontrolled. It has recently been reported that metastasizing cancer cells interact with their microenvironments, and that the microenvironmental factors do play an important role in promoting metastasis, as niches. We have developed distant metastasis mouse models by using human triple-negative breast cancer cell lines and HER2 breast cancer cell lines, and we have performed RNA sequencing analysis to identify the genes in secondary tumor tissues, focusing on the tumor microenvironments that contribute to the completion of the metastatic process. A better understanding of the hallmark genes contributing to colonization will provide a better basis for developing new therapeutic strategies and improving the prognosis for breast cancer patients.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん

1. 研究開始当初の背景

上皮性がんの転移は大きく分けて、1) 原発巣からの腫瘍細胞の離脱と周辺組織・脈管系への浸潤 (invasion)、2) 全身散布細胞 (circulating tumor cell または disseminated tumor cell) の生存の維持、3) 二次腫瘍巣の形成 (colonization)、という3つのステップから成る。メカニズムという見地からは、1) には上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与し、2) には細胞の生存を担保するいわゆる survival signal の活性化が必要であり、3) にはがん周辺の環境との相互作用によって少数のがん細胞が腫瘍を形成する能力 (tumor initiating activity) が必須である。

他臓器への転移機構を解明することは、とくにトリプルネガティブ乳がんおよび HER2 陽性乳がん患者の予後改善につながると考えられる。がん転移プロセスの最終段階である colonization には、がん細胞側の intrinsic な能力のみならず、がん周辺の宿主側の微小環境との複雑な相互作用が関与することがわかってきており、がんの浸潤・転移機構の解明には in vitro でがん細胞の挙動を分子レベルで解明するだけでは必ずしも臨床像を反映するものではなく、個体レベルでがん細胞とその周辺宿主細胞との相互作用を明確にし、がん細胞と転移先組織の双方の特性を踏まえて解析することが重要である。

2. 研究の目的

転移の最終段階である colonization は、がん細胞の生存能力や微小環境に大きく依存している。転移機構を解明するためには、個体レベルでがん細胞と周辺細胞との相互作用を明確にし、がん細胞の生存維持のための要因や特有の臓器に好んで定着するメカニズムをより立体的に解析することが重要である。本研究では、ヒト乳がん細胞株をマウス左心室内に注入することによって構築した遠隔臓器転移モデルから RNA を採取し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法により解析を行い、colonization に関わる分子機構 (転移ニッチ) を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

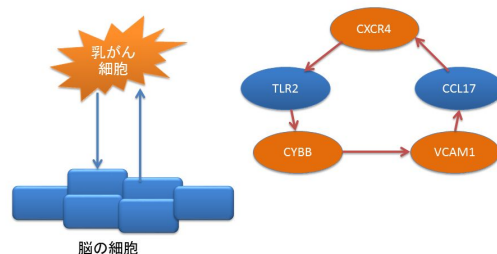
ヒト乳がん細胞株 (トリプルネガティブ乳がんおよび HER2 陽性乳がん) あるいはコントロールとして PBS を免疫不全マウス左心室に注入し、転移巣が形成されたことについてルシフェラーゼを用いたイメージングにより確認した。移植したがん細胞が生着した骨髄および脳組織から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを利用して RNA 配列を解析し、腫瘍細胞定着の有無による RNA 発現の定量・定

性を行った。また、免疫不全マウス乳腺に移植した原発腫瘍組織の RNA 発現と比較した。さらに、ヒトおよびマウス遺伝子配列データベースと照合し、腫瘍細胞が転移先の組織に定着するのに重要な役割を果たす腫瘍細胞側および周辺細胞側の因子 (転移ニッチ) について検討した。

4. 研究成果

ヒト乳がん細胞株 (トリプルネガティブ乳がんおよび HER2 陽性乳がん) を免疫不全マウス左心室に注入し、乳がん細胞が生着した骨髄および脳組織 (転移巣) から RNA を抽出した。PBS を左心室に注入したマウスの骨髄および脳組織をコントロールとし、RNA を抽出した。さらに、ヒト乳がん細胞株を免疫不全マウス乳腺に移植することで形成された腫瘍 (原発巣) から RNA を抽出した。抽出されたこれらの RNA は質的にも量的にも解析に十分であったので、次世代シーケンサーを用いて RNA 配列を解析した。

得られた配列データをマッピングして、ヒト由来とマウス由来とに分けた。予測された通り、コントロール骨髄および脳組織においてヒト遺伝子としてマッピングされたのは1%以下であった。また、原発巣において検出された配列のうち、ほとんどはヒト遺伝子であったが約2割がマウス遺伝子としてマッピングされた。転移巣においては、マウスの遺伝子とヒトの遺伝子が混合して検出され、1割程度がヒト遺伝子としてマッピングされた。原発巣におけるヒト遺伝子の発現と転移巣におけるヒト遺伝子の発現を比較することで、転移によるがん細胞の変化をとらえることができた。また、コントロール組織と転移巣におけるマウス由来の遺伝子発現を比較することで、がん周辺細胞の変化をとらえることができた。これらの遺伝子発現を総合的にとらえ、転移成立時のがん細胞と周辺細胞との関連モデルを下図のように考察した。



転移先である脳組織において、乳がん細胞と脳細胞 (がん周辺細胞) は相互作用し、乳がんの転移機構とくに遠隔臓器への colonization に関わる分子機構 (転移ニッチ) を形成していると考えられる。得られた成果については、現在、論文を作成中である。乳がん細胞と脳細胞の間で伝達されるシグナルを今後さらに詳しく解析し、それら

を抑制する阻害剤を見出すことができれば、がん細胞と周辺細胞との相互作用を破たんさせることができ、転移乳がんに対する治療薬の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Moriyama K, Niimura M, Saya H, Kosaki K: The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: a validation study. *Genet Test Mol Biomarkers* 18(11):722-35, 2014. doi: 10.1089/gtmb.2014.0109. 査読有り
2. Hosonaga M, Arima Y*, Sugihara E, Kohno N, Saya H: Expression of CD24 is associated with HER2 expression and supports HER2-Akt signaling in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Science* 105(7):779-87, 2014. doi: 10.1111/cas.12427. *corresponding author 査読有り
3. Kai K, Iwamoto T, Kobayashi T, Arima Y, Takamoto Y, Ohnishi N, Bartholomeusz C, Horii R, Akiyama F, Hortobagyi GN, Pusztai L, Saya H and Ueno NT: *Ink4a/Arf* $-/-$ and *HRAS(G12V)* transform mouse mammary cells into triple-negative breast cancer containing tumorigenic CD49f $^{-}$ quiescent cells. *Oncogene* 33(4):440-8, 2014. doi: 10.1038/onc.2012.609. 査読有り
4. Goto TM, Arima Y, Nagano O, Saya H: Lysyl Oxidase Is Induced by Cell Density-Mediated Cell Cycle Suppression via RB-E2F1-HIF-1 Axis. *Cell Struct Funct.* 38:9-14, 2013. https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/38/1/38_12023/_article 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Arima Y, Semba T, Kasuga A, Harigai R and Saya H
The Cancer Promoting Mechanism Driven by Intra-tumor Heterogeneity (ポスタ

ー発表)

Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics
February 16-20, 2016 (Maui, HI, USA)

2. 有馬 好美, 針谷 律子, サンペトラ オルテア, 廣瀬 盟子, 佐谷 秀行
NF1-MPNST 細胞株に対するトラニラストの効果
The Effect of Tranilast on the NF1-associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (NF1-MPNST) Cells (口頭発表)
第7回日本レックリングハウゼン病学会 学術大会 2015年11月29日 慶應義塾大学三田キャンパス(東京都港区)
3. 有馬好美
トリプルネガティブ乳がんにおける intratumor heterogeneity
Intratumor Heterogeneity in Triple-Negative Breast Cancer (腫瘍別シンポジウム: 乳がん研究と治療の最先端)
第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日~10日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
4. 有馬好美
トリプルネガティブ乳がんにおける intra-tumor heterogeneity (シンポジウム 21: Heterogeneity)
第23回日本乳癌学会 2015年7月2日~4日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
5. Arima Y, Kosaki K, Hirose C and Saya H
Additional mutations in genes relevant to the Ras signaling pathway promote the malignant characteristics of NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumor (NF1-MPNST) cells. (ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015
April 18 - 22, 2015 (Philadelphia, PA, USA)
6. Takamoto Y, Arima Y and Saya H
The development of malignant phyllodes tumor models. (ポスター発表)
The 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium

December 9-13, 2014 (San Antonio, TX, USA)

7. Hosonaga M, Arima Y and Saya H
Effect of HER2 overexpression on cancer stem-like characteristics of triple-negative breast cancer cells.
(ポスター発表)
European Society for Medical Oncology (ESMO) 2014 Congress
September 26-30, 2014 (Madrid, Spain)
8. Arima Y, Hosonaga M, Saya H
CD24 の発現は HER2 陽性乳がんにおいて HER2-Akt シグナル経路をサポートする
Expression of CD24 Supports HER2-Akt Signaling in HER2-Positive Breast Cancer Cells (English Oral Session 発表)
第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 ~ 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
9. Arima Y, Hosonaga M and Saya H
CD24 promotes HER2 signaling pathway and CD24 inhibition sensitizes anti-HER2 therapy in breast cancer.
(ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014
April 5-9, 2014 (San Diego, CA, USA)
10. Arima Y, Hosonaga M and Saya H
Significance of RB-ZEB axis in EMT phenotype of breast cancer and inhibition of ZEB by CDK4/6 inhibitor.
(ポスター発表)
The 2013 San Antonio Breast Cancer Symposium
December 10-14, 2013 (San Antonio, TX, USA)
11. 有馬好美、廣瀬盟子、佐谷秀行
神経線維腫症 1 型 (NF1, レックリングハウゼン病) に生じる神経線維腫モデルの作製
The Development of NF1-associated Neurofibroma Model (ポスター発表)
第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
12. 有馬好美、佐谷秀行
がん細胞における CDK4/6 の役割と CDK4/6 阻害剤の抗がん剤としての可能性について (シンポジウム口頭発表)

第 17 回日本がん分子標的治療学会
2013 年 6 月 12 日 ~ 14 日 国立京都国際会館 (京都府京都市)

13. Arima Y, Hosonaga M and Saya H
The epithelial-mesenchymal transition-related transcription factor ZEB suppresses *Claudin* expression in breast cancer cells.
(ポスター発表)
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013
April 6-10, 2013 (Washington DC, USA)

[図書](計 1 件)

(雑誌)

1. 細永真理、有馬好美、佐谷秀行: 乳がん幹細胞 ~ HER2 シグナルに関する新たな知見 ~ p281-287
科学評論社 腫瘍内科
第 14 巻第 3 号 (2014 年 9 月発行)
特集 HER2 による乳がん治療戦略の方向性 総ページ数 (p197-303)
<http://www.kahyo.com/item/ON201409-143>

[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

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