

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461940

研究課題名(和文) 多種の細胞外マトリックスの複合的な関与による乳癌の多様性の形成

研究課題名(英文) Correlation of Extra cellular matrix as niche to chemo-resistance in breast cancer patients

研究代表者

榭原 雅裕 (SAKAKIBARA, Masahiro)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70375632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリックス9因子の解析において、テネイシンCとフィブロネクチンの増加と治療抵抗性の間に有意な相関を認めた。ALDH1陽性例における複合解析ではテネイシンCおよびフィブロネクチンの関与が示唆され、テネイシンCとフィブロネクチンの共陽性例では、テネイシンC単独陽性例に比しても化学療法抵抗性の増強が確認された。免疫染色を用いた検証において、Invasive head領域におけるALDH1陽性細胞群とテネイシンC陽性の間質との間に結合が確認された。テネイシンCはフィブロネクチンと複合体を形成し、ニッチとしてALDH1陽性細胞群と結合することで、治療抵抗性に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nine extra cellular matrix (ECM) were evaluated as a relative factor of resistance to chemotherapy. Increase of tenascin C and fibronectin were significantly correlated to resistance of chemotherapy. In patients with ALDH1-positive cell, tenascin C and fibronectin were correlated to resistance of chemotherapy. Double positive of tenascin C and fibronectin showed more correlation to chemo-resistance than that of single positive of tenascin C. In IHC analysis, assembly of ALDH1-positive cancer cells in invasive head lesion and Tenascin C-positive stromal tissue was confirmed. Furthermore, in stromal tissue just closed to invasive head, assembly of tenascin C and fibronectin was confirmed. These data suggest that tenascin C connects to fibronectin in stromal tissue just closed to invasive head, forms complex, combines to ALDH1-positive cancer cells as niche and correlated to chemo-resistance. We hope a new therapy targeting to niche to decrease chemo-resistance.

研究分野：乳癌

キーワード：細胞外マトリックス 治療抵抗性 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

従来、癌の発症は分化細胞への多段階な遺伝子変異の蓄積のモデルが考えられてきたが、今日では、幹細胞、前駆細胞そして分化細胞の何れも遺伝子変異の導入により増殖中心細胞となり得ることが推測されているどのヒエラルキーの細胞に遺伝子変異が導入されるか、あるいは変異導入された細胞がどのレベルのヒエラルキーになるのかが発生した癌の基礎となる。これまで自己複製能や不均一分裂能を有する癌幹細胞が注目されてきたが、現在では癌の増殖中心細胞は幹細胞レベル、前駆細胞レベル、あるいはそれ以下と、腫瘍ごと多様性を持つことが推測されている。種々の固形癌において幹細胞レベルのヒエラルキーを持つ癌幹細胞の検出が報告され、乳癌では CD44 陽性 CD24 陰性細胞群あるいは ALDH1 陽性細胞群の中にそれらが含まれることが示されている。またこれらの癌の増殖中心細胞はニッチとの相互作用によって増殖や治療抵抗の多様性を形成すると考えられている。我々は過去に、ALDH1 陽性乳癌細胞と化学療法抵抗性を臨床的に解析した。乳癌の術前化学療法症例の加療前および加療後の主病巣とリンパ節転移巣において、ALDH1 陽性乳癌細胞と ALDH1 陰性乳癌細胞を識別すると、予測したように加療後の ALDH1 陽性乳癌細胞の残存が予後に強く相関した。一方、極めて興味深いことに加療前に ALDH1 陽性乳癌細胞が腫瘍内に存在する症例であっても、化学療法にて残存する症例と消失する症例があり、乳癌の化学療法抵抗性には他因子(ニッチ)の関与が強く示唆された。今後あらゆる癌治療において、腫瘍内にどのレベルの増殖中心細胞が存在するのか、特に癌幹細胞レベルのものが存在するのか存在しないのか、またこれらの細胞とニッチの相互作用の結

果どのような治療抵抗性を形成しているのか、という診断が不可欠となるだろう。特に癌幹細胞などの増殖中心細胞のヒエラルキーとニッチとの相互作用によって形成される化学療法や放射線抵抗性の診断が鍵である。もしもこれらの治療抵抗性が可視化できるのであれば、癌治療の概念そのものが変わる可能性がある。つまり、『局所治療と全身治療』という現在の考え方は、『抵抗性腫瘍への治療と非抵抗性治療への治療』という新しい考え方に変貌し、外科治療の概念を大きく変化させることが予測される。癌の増殖や転移を司る腫瘍内の癌幹細胞は、腫瘍ごとに異なるヒエラルキーを持ち、ニッチとの相互作用によって増殖や治療抵抗の多様性を形成すると考えられている。

2. 研究の目的

我々は過去の研究から、癌のニッチの本体は複数の細胞外マトリックスのグループであると推測し、癌幹細胞はそのヒエラルキーによってある程度パターン化された細胞外マトリックスのグループと複合体を形成するという仮説を立てた。

3. 研究の方法

複数の細胞外マトリックスによる乳癌の治療抵抗性の形成を解明することを目的としている。我々は以下の9種類の細胞外マトリックスをその候補(基底膜を構成する4因子: 型コラーゲン、ラミニン、パールカン、ナイトジェンとそれ以外の5因子: フィブロネクチン、ヒアルロン酸、型コラーゲン、型コラーゲン、テネイシンC)とし、乳癌の治療抵抗性へのその複合的なニッチとしての関与を検討した。乳癌の3種類の手術検体: 化学療法抵抗病変、放射線抵抗病変、乳癌幹細胞陽性病変

を用いて、RT-PCR 法、マルチプレックス法の手法により多種の細胞外マトリックスの増減を検出し、クラスター解析によって治療抵抗性や乳癌幹細胞に關与する細胞外マトリックスのグループの検出を予定した。

4. 研究成果

(1) 乳癌の化学療法および放射線抵抗性への細胞外マトリックスの關与

化学療法抵抗病変を用いて RT-PCR およびマルチプレックスの手技において、細胞外マトリックス 9 因子の解析を行ったところ、テネイシン C とフィブロネクチンの増加と化学療法抵抗性との間に有意な相関を認めた。他の 7 因子は有意な相関を認めなかった。同様に、放射線抵抗性においては、テネイシン C の増加のみが有意に相関する結果となり、他の 8 因子の相関は認められなかった。化学療法および放射線抵抗性の検体を用いて、免疫染色によりテネイシン C とフィブロネクチンの発現を検証したところ、化学療法および放射線抵抗性例における癌の間質浸潤部 (Invasive head) に接するようにテネイシン C およびフィブロネクチンは発現が確認された。これらの結果からテネイシン C とフィブロネクチンの 2 因子を化学療法 (放射線) 抵抗性因子に關与するニッチ候補と考えた。

(2) ALDH1 陽性乳癌の化学療法抵抗性におけるテネイシン C とフィブロネクチンの複合的な關与

化学療法や放射線抵抗性への關与が示唆される ALDH1 陽性細胞を含有する乳癌患者における解析では、単独因子としてはテネイシン C の増加のみに相関が認められ、テネイシン C 単独陽性例では高い化学療法抵抗性が認められた。ただし複合解析ではテネ

イシン C およびフィブロネクチンの關与が示唆され、フィブロネクチン単独陽性例では化学療法抵抗性の上昇は認められなかったが、テネイシン C とフィブロネクチンの共陽性例では、テネイシン C 単独陽性例に比しても化学療法抵抗性の増強が確認された。免疫染色を用いた検証において、Invasive head 領域における ALDH1 陽性細胞群とテネイシン C 陽性の間質との間に結合が確認された。さらに Invasive head の間質部においてフィブロネクチンとテネイシン C の結合が確認された。

以上の結果からテネイシン C は Invasive head 間質部においてフィブロネクチンと複合体を形成し、ニッチとして Invasive head 癌部の ALDH1 陽性細胞群と結合することで、化学療法 (放射線) 抵抗性に關与することが示唆された。これらのニッチは、乳癌患者の化学療法抵抗性を低減する治療標的として期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 榊原雅裕、長嶋健、三階貴史、藤本浩司、椎名伸充、藤咲薫、榊原淳太、岩瀬俊明、羽山晶子、石神恵美、宮崎勝 進行性乳癌患者における細胞外マトリックス・テネイシン C の予後と化学療法抵抗性への相関

癌免疫外科研究会

平成 27 年 5 月 14 日 奄美観光ホテル (鹿児島県・奄美市)

2. 榊原雅裕、長嶋健、三階貴史、榊原淳太、岩瀬俊明、石神恵美、羽山晶子、升田貴仁、中川綾子、宮崎勝 乳癌における細胞極性

タンパク PKC 発現量と化学療法抵抗性
日本癌治療学会
平成 27 年 10 月 30 日 京都国際会議場（京都府・京都市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 雅裕 (SAKAKIBARA, Masahiro)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70375632

(2) 研究分担者

長嶋 健 (NAGASHIMA, Takeshi)
千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60292710

(3) 研究分担者

三階 貴史 (SANGAI, Takafumi)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00375685

(4) 研究分担者

藤本 浩司 (FUJIMOTO, Hiroshi)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：60456027

(5) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI, Masaru)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号：70166156