

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：35303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461964
研究課題名(和文) 乳癌内分泌療法抵抗性発生のメカニズムの解明とその克服：乳癌幹細胞の役割を中心に

研究課題名(英文) Action mechanisms responsible for the development of resistance to endocrine therapy in breast cancer and overcoming the resistance: focusing on a role of breast cancer stem cells

研究代表者
紅林 淳一 (Junichi, Kurebayashi)
川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10248255
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)：多くの乳癌は、エストロゲン依存性があり、内分泌療法が有効である。しかし、治療中に内分泌療法抵抗性を獲得し、治療が効かなくなる。内分泌療法抵抗性を獲得するメカニズムとして、乳癌幹細胞の役割に注目した。そこで我々は、エストロゲンによる乳癌幹細胞の制御機構を基礎的に検討した。その結果、エストロゲンがエストロゲン受容体及びヘッジホッグシグナル伝達経路を介して乳癌幹細胞の制御を行っていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Most breast cancers are estrogen-dependent and sensitive to endocrine therapy. However, resistance to endocrine therapy occurs and makes endocrine therapy ineffective. We focused on a role of breast cancer stem cells in the development of the resistance. Regulatory mechanisms of estrogen on breast cancer stem cells were investigated in vitro. We found that estrogen regulates breast cancer stem cells through estrogen receptor and hedgehog signaling pathway.

研究分野：乳癌外科

キーワード：乳癌 癌幹細胞 エストロゲン ヘッジホッグシグナル 内分泌療法抵抗性 GANT61 抗エストロゲン薬 細胞増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

乳癌はホルモン依存性癌の一つに分類され、エストロゲンが乳癌の発生や進展に重要な役割を果たしている。乳癌のエストロゲン依存性を逆手にとったのが乳癌内分泌療法であり、発生予防から再発治療に至るまで広く一般臨床に用いられている。しかし、内分泌療法導入当初からに抵抗性を示す primary resistance や内分泌療法施行中に抵抗性を獲得する acquired resistance が存在し、臨床の場において大きな問題となっている。

乳癌は mRNA expression profile により少なくとも5つの異なるサブタイプに分類されている。そのうちホルモン感受性が認められるサブタイプは、乳癌全体の約70%を占める luminal A と luminal B である。Luminal A サブタイプは、エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) のシグナル伝達が活性化しており、内分泌療法の有効性が高い。一方、luminal B サブタイプは、ER シグナル伝達以外にも、増殖因子等のシグナル伝達が活性化している。Luminal B サブタイプ乳癌は、内分泌療法に反応するものの、早期に内分泌療法抵抗性を獲得することが示されている。

過去10年余り、乳癌を含めた多くの固形癌においても CSC が存在し、その発生、進展において重要な役割を果たしていることが示されている。CSC は、抗癌化学療法や放射線療法に対し抵抗性を示し、癌の再発・転移の温床となる可能性がある。しかし、乳癌内分泌療法抵抗性獲得における CSC の役割に関する研究は少ない。

最近の研究では、ER 陽性乳癌において、

- 1) CSC の比率が他のサブタイプに比べ低い、
- 2) エストロゲンは ER 陽性の non-CSC を介して ER 陰性の CSC の比率を増加させる、
- 3) non-CSC は、fibroblast growth factor receptor (FGFR), epidermal growth factor receptor (EGFR), Notch 経路などを介した

パラクリン機構を利用して、CSC 比率の増加に寄与している、などが示されている。さらに、EGFR や Notch シグナルの活性化は、luminal サブタイプ乳癌の内分泌療法抵抗性の獲得に寄与し、これらのシグナル伝達の阻害は、内分泌療法抵抗性の克服につながるということが基礎的に示されてきている。

我々はこれまで、内分泌療法低感受性乳癌細胞では、1) CSC 比率が感受性細胞に比べ高い、2) エストロゲンの増殖促進効果ばかりでなく CSC 比率増加作用も減弱している、3) 抗エストロゲン薬の増殖抑制効果や CSC 比率低下作用も減弱していることを見出している。また、エストロゲンにより促進される non-CSC を介したパラクリン機構の仲介因子を解明するため、CSC と non-CSC をフローサイトメトリーにより分離し、mRNA expression array による遺伝子発現プロファイル解析を開始している。

以上の学術的背景を勘案し、ホルモン依存性乳癌における CSC の制御機構、その破綻による内分泌療法抵抗性発生のメカニズムを解明するため、以下の研究計画を立てた。

- 1) 内分泌療法感受性細胞及び低感受性細胞における non-CSC と CSC 間に存在するパラクリン機構の差異を mRNA expression array を用い網羅的に分析する。
- 2) 上記パラクリン機構の要となるシグナル伝達を同定し、その経路の異常が内分泌療法抵抗性の発生に寄与していることを基礎的に検証する。
- 3) 乳癌標本において、要となるシグナル伝達経路の関連因子の発現プロファイル (総蛋白及び活性化蛋白発現量を系統的に調べる) を検討する。
- 4) 以上の結果を総合的に評価し、治療の標的としてふさわしいシグナル伝達経路が同定されれば、その経路を阻害する薬剤を用い、*in vitro*, *in vivo* の実験モデルにおいて、内分泌療法抵抗性の克服が可能かどうかを検討

する。

2. 研究の目的

内分泌療法感受性細胞におけるエストロゲン処理による遺伝子発現プロファイルの変化を CSC と non-CSC に分離した上で検討した研究報告はなく、きわめてユニークな研究結果が期待される。さらに、内分泌療法低感受性細胞においても同様な検討を加えるため、ホルモン感受性の違いによる CSC 制御の分子機構の変化が明確になる。

これまでに報告された CSC 制御に関わるパラクリン機構としては、エストロゲン依存性の FGFs/FGFRs/Tbx3 経路、EGFR ligands/EGFR/ERK 経路、DLL/Jag/Notch/PEA 経路や間質系細胞との相互作用が推測されている CXCL7/CXCR2/Akt 経路、IL-6/IL-6R/gp-130/STAT3 経路、IL-8/CXCR1/Akt 経路が候補として挙げられている。エストロゲン処理による遺伝子発現プロファイル解析により、CSC では特定の受容体の発現促進、non-CSC ではその ligands の発現促進がみられることが予想される。上記経路以外のパラクリン経路の関与も考えられ、大変興味深い。さらに、内分泌療法低感受性細胞において、感受性細胞とは異なるパラクリン経路が存在するとすれば、内分泌療法抵抗性発生の原因となっている可能性があり、そのパラクリン経路は内分泌療法抵抗性克服を目指した治療の標的となる。

現在、創薬技術の進歩により、様々なシグナル伝達経路を特異的に制御する薬剤が開発されてきている。上記検索により CSC 制御に関わる主要なパラクリン機構が解明されれば、ホルモン感受性のある乳癌において、細胞増殖ばかりでなく、CSC 制御にも有効な特異的シグナル伝達阻害薬の選択や開発に役立つ可能性がある。

CSC 制御に関わるパラクリン経路の原発

乳癌組織における免疫組織化学的検討は、これまでに前例がない。とりわけ、パラクリン経路に関連した蛋白質は、CSC と non-CSC で異なる発現・活性化状態であると予想され、腫瘍組織内における CSC の局在や分布の解明の一助となる可能性がある。

3. 研究の方法

内分泌療法高感受性細胞 (MCF-7, T-47D) のエストロゲン処理による遺伝子発現プロファイルの変化を Agilent platform を用いた網羅的 microarray で解析する。この時、CD44/CD24/EpCAM の細胞表面抗原を利用したフローサイトメトリーにより sorting し、CSC と non-CSC に分離した上で mircoarray 解析を行う。この検討により、CSC と non-CSC 間に存在するパラクリン機構を司る遺伝子が複数同定される。Microarray で同定された CSC 制御関連パラクリン経路の遺伝子発現を定量 PCR で再確認する。さらに、内分泌療法低感受性細胞 (KPL-1, KPL-3C) においても同様の実験を行い、パラクリン機構の反応に差異があるかどうかを分析する。

上記遺伝子発現プロファイル解析で同定された CSC 制御関連パラクリン経路の機能を確認するため、その経路を阻害 (siRNA や特異的なシグナル伝達阻害薬を投与) し、エストロゲンによる CSC 比率の増加を阻止できるかどうかを検討する。さらに、expression vector やシグナル伝達促進薬を用い、このパラクリン経路の活性化が、エストロゲンによる細胞増殖促進効果や内分泌療法薬による増殖抑制効果に与える影響を検索する。これらの検討により、エストロゲンによる CSC のパラクリン経路を介した制御機構が明確となる。また、この経路の活性化により CSC の制御機構が破綻することと内分泌療法抵抗性発生の関連が判明する。

以上の実験結果から得られた研究仮説をさらに検証するため、

- 1) CSC を制御するパラクリン経路を阻害できる薬剤を検索・入手し、*in vitro* 及び *in vivo* (ヌードマウス移植モデル)において、その阻害薬が内分泌療法感受性細胞ならびに低感受性細胞の細胞増殖や CSC 比率に与える影響を検討する。また、内分泌療法低感受性細胞において、このパラクリン経路の破綻が内分泌療法抵抗性に寄与しているとするれば、内分泌療法薬とこの阻害薬の併用により、相乗的な抗腫瘍効果や CSC 比率の変化がみられる。
- 2) 原発乳癌標本(川崎医科大学乳腺甲状腺外科で手術が行われた症例)を用い、免疫組織化学的手法により、パラクリン経路に関連する蛋白質の発現(総発現量とともに活性化を受けたリン酸化蛋白質の発現量)を半定量的に検討する。これらの結果と臨床・病理学的情報(進行度、サブタイプ、ER、PgR、Ki-67 標識率、予後など)との相関を統計学的に検討し、本経路の生物学的・臨床的な意義を検索する。とりわけ、パラクリン経路の活性化と術後補助内分泌療法の治療効果(再発・癌死の有無)との関連に興味を持たれる。

4. 研究成果

乳癌内分泌療法抵抗性の発生は、臨床の場において大きな問題となっている。しかし、内分泌療法抵抗性発生のメカニズムは、不明な点が多い。我々は、「エストロゲンによる CSC の制御機構の破綻」が、内分泌療法抵抗性発生の一因となっているとの仮説を立てた。まず、エストロゲン抗感受性細胞株及び抵抗性細胞株を用い、エストロゲン添加により発現が亢進する遺伝子及び低下する遺伝子を網羅的に mRNA 発現マイクロアレイで解析し、パラクリン機構を介して CSC の制御に関わることが予想される複数の遺伝子

を同定した。候補遺伝子として、amphiregulin、betacellulin 及び CXCL-12 が抽出された。しかし、これら 3 候補遺伝子は、エストロゲンによる発現の増加や細胞増殖促進効果と相関したが、CSC の制御とは全く相関しなかった。そこで、「幹細胞制御機構の要となる Hedgehog シグナル伝達経路の effector である Gli1 が、エストロゲン依存性乳癌細胞のエストロゲンによる CSC 制御において重要な役割を果たしている」との別のグループから報告された研究結果を検証することとした。

新規抗腫瘍薬として注目されている non-canonical Hedgehog シグナル伝達阻害薬 GANT61 を入手し、本薬剤の内分泌療法抵抗性乳癌細胞に対する抗腫瘍効果や CSC 制御作用を検討した。その結果、エストロゲン→ER と結合→Gli1 mRNA を増加→Gli1 による SOX2 などの活性化→CSC 比率の増加が検証され、さらに、GANT61 によりこの経路が阻害され、CSC 比率の増加を阻止することが示された。また、抗エストロゲン薬との併用により相加的な抗腫瘍効果を示すことが確認された。これらの研究結果は、論文としてまとめられ Cancer Science に掲載された。

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4件)

1. Junichi Kurebayashi, Naoki Kanomata, Tetsumasa Yamashita, Toshiro Shimo, and Takuya Moriya: Antitumor and anti-cancer stem cell activities of eribulin mesylate and antiestrogens in breast cancer cells. Breast Cancer. 2016 May;23(3):425-36. doi: 10.1007/s12282-014-0580-9.
2. Junichi Kurebayashi, Yoshikazu Koike, Yusuke Ohta, Wataru Saitoh,

- Tetsumasa Yamashita, Naoki Kanomata, Takuya Moriya: Anti-cancer stem cell activity of a non-canonical hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2017 Feb 17. doi: 10.1111/cas.13205. [Epub ahead of print]
3. Yoshikazu Koike, Yusuke Ohta, Wataru Saitoh, Tetsumasa Yamashita, Naoki Kanomata, Takuya Moriya, Junichi Kurebayashi: Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activities of the non-canonical hedgehog inhibitor GANT61 in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer.* 2017 Jan 31. doi: 10.1007/s12282-017-0757-0. [Epub ahead of print]
 4. Kim SJ, Masuda N, Tsukamoto F, Inaji H, Akiyama F, Sonoo H, Kurebayashi J, Yoshidome K, Tsujimoto M, Takei H, Masuda S, Nakamura S, Noguchi S: The cell cycle profiling - risk score based on CDK1 and 2 predicts early recurrence in node-negative, hormone receptor-positive breast cancer treated with endocrine therapy. *Cancer Lett.* 353: 217-223, 2014 DOI 10.1016/j.canlet.2014.08.042.
- [学会発表](計 12 件)
1. 紅林淳一、小池良和、太田祐介、山下哲正、齋藤互、鹿股直樹、森谷卓也：ヘッジホッグシグナル伝達阻害薬GANT61のホルモン感受性乳癌細胞に対する抗腫瘍効果及び癌幹細胞制御に関する基礎的研究．第24回日本乳癌学会学術総会、2016/6/17、東京ビッグサイト（東京）
 2. 紅林 淳一、小池 良和、太田 祐介、齋藤 互、鹿股 直樹：ヘッジホッグシグナル伝達阻害薬GANT61及び抗エストロゲン薬のホルモン感受性乳癌細胞に対する抗腫瘍効果及び癌幹細胞制御作用．第25回乳癌基礎研究会、2016/7/23、奈良市立病院（奈良）
 3. Junichi Kurebayashi, Yoshikazu Koike, Yusuke Ohta, Wataru Saitoh, Tetsumasa Yamashita, Naoki Kanomata, Takuya Moriya: Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activities of the non-canonical hedgehog inhibitor GANT61 and antiestrogens in estrogen receptor-positive breast cancer cells. The 14th Breast Cancer Frontier Meeting, 2016/11/19, ホテル椿山荘東京（東京）
 4. Junichi Kurebayashi, Yoshikazu Koike, Yusuke Ohta, Wataru Saitoh, Tetsumasa Yamashita, Naoki Kanomata, Takuya Moriya: Anti-cancer stem cell activity of the hedgehog inhibitor GANT61 in ER-positive breast cancer cells. The 15th St. Gallen International Breast Cancer Conference, 2017/3/16、ウィーン（オーストリア）
 5. Yoshikazu Koike, Yusuke Ohta, Wataru Saitoh, Tetsumasa Yamashita, Naoki Kanomata, Takuya Moriya, Junichi Kurebayashi: Anti-cancer stem cell activity of the hedgehog inhibitor GANT61 in triple-negative breast cancer cells. The 15th St. Gallen International Breast Cancer Conference, 2017/3/16、ウィーン（オーストリア）
 6. 紅林淳一、鹿股直樹、山下哲正、下登志朗、野村長久、森谷卓也：エストロゲン感受性乳癌細胞におけるエストロゲンの癌幹細胞制御機構．第15回ホルモンと癌

- 研究会WS-4、2014/7/4、東北大学医学部
 良陵会館（仙台）
7. 紅林淳一、鹿股直樹、山下哲正、下登志朗、森谷卓也：エリブリンと内分泌療法薬の同時併用効果に関する基礎的検討．第23回乳癌基礎研究会一般演題2、2014/7/26、筑波山ホテル青木屋（筑波）
 8. J. Kurebayashi, N. Kanomata, T. Yamashita, T. Shimo, T. Moriya: Anti-tumor and anti-cancer stem cell activities of eribulin and anti-estrogens in breast cancer cells. 第14回ザンクトガレン国際乳癌会議、2015/3/19、ウィーン（オーストリア）
 9. 紅林淳一、鹿股直樹、下登志朗、山下哲正、小池良和、太田裕介、森谷卓也：乳癌治療薬による癌幹細胞の制御機構に関する基礎的研究.第23回日本乳癌学会学術総会シンポジウム12「トランスレーションリサーチの進め方」、2015/7/3、東京国際フォーラム（東京）
 10. 紅林淳一、小池良和、太田裕介、山下哲正、鹿股直樹：エストロゲンによる乳癌幹細胞の制御と内分泌療法抵抗性に関する基礎的研究.第16回ホルモンと癌研究会WS-4、2015/7/10、朝日大学村上記念病院（岐阜）
 11. 紅林淳一、鹿股直樹、下登志朗、山下哲正：乳癌内分泌療法抵抗性発生のメカニズムの解明とその克服を目指した基礎研究．第6回川崎医科大学学術集会セッション4、2015/8/1、川崎医科大学（倉敷）
 12. 紅林淳一：乳癌治療におけるアロマターゼ阻害薬の役割．第23回日本ステロイドホルモン学会学術集会 シンポジウム：アロマターゼの基礎と臨床、2016/1/15、倉敷芸文館（倉敷）

〔図書〕(計2件)

1. 紅林淳一：術後薬物療法における分子標

的薬．オンコロジークリニカルガイド乳癌薬物療法改訂2版、pp. 327-338、南山堂、東京、2016年

2. 紅林淳一：トリプルネガティブ乳癌の治療：新しい薬剤の有用性を含めて．これからの乳癌診療 2014-2015、pp. 64-71、金原出版、東京、2014

〔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

1. 川崎医科大学ホームページ教員情報
<http://kwweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kw-mhp/KgApp?section=13&kyoinId=ymk-iyoooggo>

6．研究組織

(1)研究代表者

紅林 淳一（KUREBAYASHI JUNICHI）
 川崎医科大学・医学部・教授
 研究者番号：10248255

(2)研究分担者

森谷 卓也（MORIYA TAKUYA）
 川崎医科大学・医学部・教授
 研究者番号：00230160

鹿股 直樹（KANOMATA NAOKI）
 川崎医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60263373

(3)連携研究者
 なし

(4)研究協力者
 なし