

令和元年6月17日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10082

研究課題名(和文) 乳癌ホルモン療法の耐性獲得における癌幹細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of acquired aromatase-resistance mechanisms in breast cancer

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)・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：80166628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：閉経後に発症するエストロゲン受容体(ER)陽性乳癌のホルモン療法ではエストロゲン代謝酵素アロマトラーゼの阻害剤が奏効するが、3分の1では耐性を獲得することが課題となっている。本研究では治療と同様にエストロゲンレベルを低下させるため、卵巣を摘出した免疫不全SCIDマウスにER陽性ヒト乳癌細胞株MCF-7を移植し、長期飼育後in vivoで生じた腫瘍からAI耐性モデル細胞14株を樹立した。ERの発現は3株では陰性化し、11株では高発現を認め、遺伝子発現やmiRNA発現の網羅的な解析および乳癌幹細胞マーカーの発現解析からAI耐性機序は一様でないことを明らかにした。次治療の選択への鍵となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は女性罹患率第一位であり、現在も増加傾向にある。乳癌の3分の2はエストロゲン受容体(ER)陽性でホルモン療法が有効であるが、その3分の1で治療耐性を獲得し、再発となる症例が少なくない。本研究は閉経後乳癌におけるアロマトラーゼ阻害剤(AI)によるホルモン療法に注目し、その耐性機序を解明するため、卵巣を除去した免疫不全SCIDマウスに乳癌細胞を移植し、生体内に近い環境下でin vivoでモデル細胞株を樹立して解析した。耐性機序は一様ではないことが判明した。個々の症例について耐性機序を診断することは多様化して来ている次治療薬の選択に重要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanisms of resistance to hormonal therapy using aromatase inhibitor in postmenopausal breast cancer, we established several estrogen-deprivation-resistant cell lines from xenograft of estrogen receptor-positive human MCF-7 cells transplanted into ovariectomized SCID mice by reflecting clinical microenvironment of estrogen-depleted therapy. Several AI cell lines were isolated from each palpable tumor detected at more than 150 days after transplantation. Most of these cell lines overexpressed ER and some lost ER expression. They showed different expressions of breast cancer stem cell markers and sensitivities to signal cascade inhibitors, suggesting that AI resistant mechanisms might be different for each case.

研究分野：細胞腫瘍学

キーワード：乳癌 ホルモン療法耐性 エストロゲン アロマトラーゼ miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は estrogen receptor (ER) や HER2 (ERbB2) の発現、増殖能によって 5 つの subtype に分類され、それぞれの治療法が推奨されている。乳癌の 2/3 を占める ER 陽性乳癌ではホルモン療法が中心となり、閉経後乳癌では乳腺局所におけるエストロゲンの供給を断つため、エストロゲン代謝酵素 Aromatase の阻害剤 (Aromatase Inhibitor, AI) が広く用いられるが、耐性を獲得し再発する例も少なくなく課題となっている。ホルモン療法でエストロゲンシグナルが断たれた乳癌細胞は PI3K/Akt-mTOR 経路や MAPK 経路のシグナルに依存して増殖することや乳癌幹細胞性が影響することが示唆されているが詳細は不明である。われわれは、AI 耐性獲得メカニズム解明のため、エストロゲン枯渇培地で ER 陽性ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を長期培養してエストロゲンシグナル非依存性に増殖する AI 耐性モデル細胞株を複数 *in vitro* で樹立し、耐性機序は一様でないことを報告してきた。一方、生体内における癌の増殖にはその微小環境が大きく影響することが報告され、乳癌においても癌細胞を取り囲む繊維芽細胞がアロマターゼを発現し、閉経後もエストロゲンを供給する他、増殖因子を産生するなど、乳癌特異的微小環境の機能が報告されてきた。そこで、AI 耐性獲得機序をより生体内に近い環境下で解析するため、卵巣摘出したマウスに MCF-7 細胞を移植し、AI による治療と同様、エストロゲンレベルを低下させた環境下で耐性のモデル細胞株を樹立し耐性機序を解析した。乳癌における治療薬の開発の進歩は目覚ましく、ホルモン療法の耐性機序を明らかにすることは次治療の選択、耐性克服に向けて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト ER 陽性乳癌細胞株の xenograft からより生体内に近い微小環境下で樹立した AI 耐性モデル細胞株を用いて耐性機序を解明する。卵巣摘出免疫不全マウスにヒト ER 陽性乳癌細胞株を移植しても、エストロゲンペレットの皮下移植等によってエストロゲン供給がない場合、乳癌の形成は認められないが、長期間飼育したところ複数の腫瘍が観察され、それぞれからエストロゲン非依存性に増殖する AI 耐性モデル乳癌細胞株を樹立することができた。これらの細胞株について増殖シグナルカスケード、乳癌幹細胞の動態などを中心に耐性獲得機序を解析し、耐性克服への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) AI によるホルモン療法中の体内を模して卵巣摘出によりエストロゲンレベルを低下させた 4-5 週令の SCID マウスの皮下にヒト ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 細胞を移植し、約 150 日以上の長期飼育後に形成された腫瘍をコラゲナーゼ処理した後、乳癌細胞のみを単離し、エストロゲン枯渇培地で増殖する AI 耐性モデル細胞株を複数樹立した。これらの AI 耐性モデル細胞株を再び卵巣摘出マウスの皮下または乳腺の fat pad へ同所性に移植し、エストロゲン依存性の腫瘍形成能 (tumorigenicity) を解析した。

(2) 増殖因子のシグナルカスケードの阻害剤や抗エストロゲン剤を用いて AI 耐性モデル細胞株の増殖機構を検討した。

(3) 耐性モデル細胞株について各種乳癌幹細胞マーカーをフローサイトメトリーにより、遊走性を Body chamber assay により解析した。

(4) 耐性モデル細胞株における遺伝子発現を RT2 qPCR Primer Assays (QIAGEN 社) を用いて解析した。

(5) 耐性モデル細胞株の miRNA の発現は Agilent 社製 SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ 8x60K を用いて GeneSpring Ver.13.1 により解析した。

(6) HER3, HER4 のリガンドである heregulin-1beta (HRG) は乳癌幹細胞を制御することが知られている。親株や AI 耐性モデル細胞株の増殖や乳癌幹細胞性について HRG の作用機構を検討した。

4. 研究成果

(1) AI 耐性モデル細胞株の tumorigenicity の解析

卵巣摘出によりエストロゲンレベルを低下させたマウスに ER 陽性乳癌細胞 MCF-7 を移植し、AI 耐性モデル細胞株 14 株を樹立した。卵巣摘出したマウスでは ER 陽性乳癌形成されないが、5 ヶ月以上長期飼育すると複数の腫瘍が形成され、それぞれからエストロゲン枯渇培地中で増殖する AI 耐性モデル細胞株を樹立することができた (図 1A)。耐性細胞株は細胞認証テストにより親株の MCF-7 由来であることを確認している。耐性細胞株のうち 3 株は ER が陰性化し、11 株では高発現が認められた。これらの細胞株を再び卵巣摘出マウスの皮下または fat pad の同所性に移植すると、短期間に腫瘍を形成し、強い tumorigenicity を認めた (図 1B)。in vivo 継代後も ER の発現レベルや強い tumorigenicity は維持されていた。

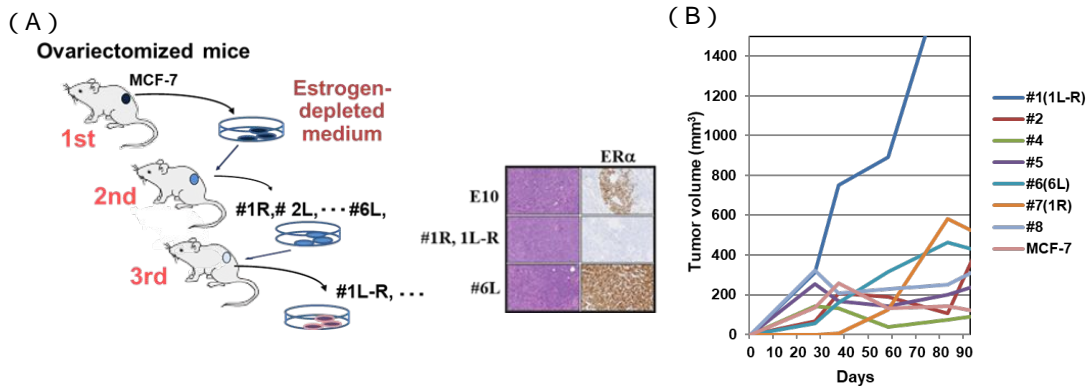


図1 乳癌 xenograft 由来のAI 耐性モデル細胞株の樹立と tumorigenicity

(2) AI 耐性モデル細胞株の増殖機構の解析

ER 高発現の耐性細胞の増殖は抗エストロゲン剤 fulvestrant により阻害されたが ER 陰性耐性細胞は影響されず、前者はエストロゲン非依存性ではあるが ER 依存性に増殖することが示唆された。一方、MAPK 経路、PI3K/Akt 経路の阻害剤を検討したところ、PI3K 阻害剤 LY294002、mTOR 阻害剤 rapamycin、MEK 阻害剤 U0126 により耐性細胞の増殖は阻害されたが ER 高発現の耐性細胞の方が高い感受性を示した (図2)。AI 耐性細胞株は HER2, HER3, HER4 の発現が増加し、増殖因子のシグナル経路への依存が示唆された (図3)。

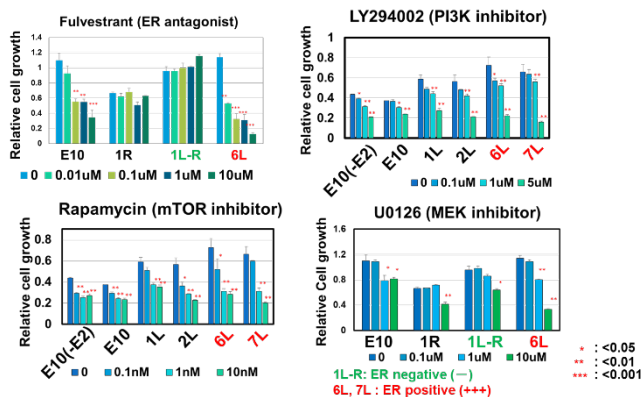


図2 . 抗エストロゲン剤とシグナルカスケード阻害剤の作用

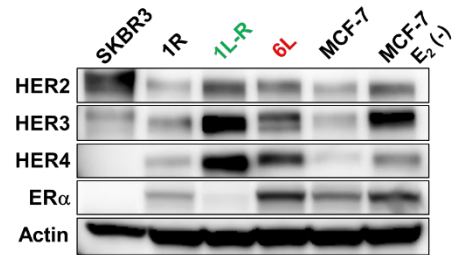


図3 . HER ファミリーの発現

(3) AI 耐性モデル細胞株における遺伝子発現解析

PCR Arrayにより耐性細胞株が発現する遺伝子を親株と比較解析した結果、ER 陰性細胞株では、ALDH1A1 を含む癌幹細胞関連遺伝子4個、JUN を含む乳癌関連遺伝子7個の増加が認められた。ER 高発現耐性細胞株では大きな変動はなかった。

(4) AI 耐性モデル細胞株の miRNA 発現解析

ホルモン療法耐性に伴い変動する miRNA の報告は多いが AI 耐性獲得に関連する miRNA は未だ確定していない。AI 耐性モデル細胞株における miRNA の発現を miRNA アレイを用

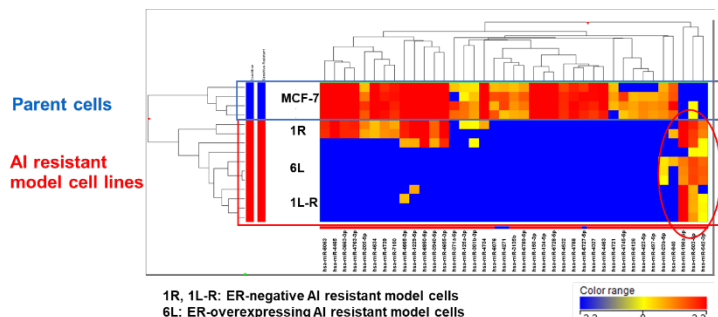


図4 . AI 耐性モデル細胞株の miRNA 発現解析

いて網羅的に解析したところ、親株と耐性細胞株は異なる発現パターンを示し、耐性に伴い14個のmiRNAが増加し、76個が減少することが判明した(図4)。標的遺伝子の解析を進めている。

(5) AI 耐性モデル細胞株に対する HRG の作用

われわれは HER3、HER4 のリガンド Heregulin-1beta(HRG)が ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 や T47D の ER の発現を抑制し、HER family の発現を増加させることを明らかにしている。AI 耐性細胞株に HRG の作用を解析したところ、MAPK と Akt、p70S6K のリン酸化が亢進し、ER 陰性細胞株では HER3 のリン酸化が顕著に認められた(図5)。HRG は ER、PgR、HER2 が陰性のトリプルネガティブ乳癌細胞で発現が高いことが知られているが、ER 陰性耐性細胞株でも HRG の発現を認めた。ER が陰性化して AI 耐性となった乳癌細胞が HRG を産生し、ER 陽性乳癌細胞の ER 陰性化を誘導する可能性が示唆された。また、HRG は耐性細胞株の乳癌幹細胞の割合を増加させ、遊走能も促進した。乳癌の進展、再発における HRG の機能解析が今後の課題である。

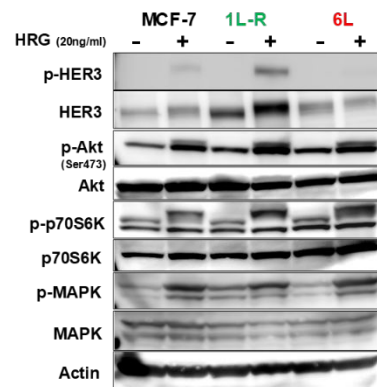


図5 . HRG のシグナル解析

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Saito-Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi S. Differences in stemness properties associated with the heterogeneity of luminal-type breast cancer. Clin Breast Cancer. 査読有, 2015, 15:e93-e103. doi:10.1016/j.clbc.2014.11.002.

Higuchi T, Endo M, Hanamura T, Gohno T, Niwa T, Yamaguchi Y, Horiguchi J, Hayashi S. Contribution of estrone sulfate to cell proliferation in aromatase inhibitor (AI) -resistant, hormone receptor-positive breast cancer. PLOS ONE. 査読有, 2016, 11:e0155844. doi:10.1371/journal.pone.015584.

Tsuboi K, Kaneko Y, Nagatomo T, Fujii R, Hanamura T, Gohno T, Yamaguchi Y, Niwa T, Hayashi S. Different epigenetic mechanisms of ER implicated in the fate of fulvestrant-resistant breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有, 2017, 167:115-125. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.11.017.

Kurozumi S, Yamaguchi Y, Kurosumi M, Ohira M, Matsumoto H, Horiguchi J. Recent trends in microRNA research into breast cancer with particular focus on the associations between microRNAs and intrinsic subtypes. J Human Genetics. 査読有, 2017, 62:15-24. doi: 10.1038/jhg.2016.89.

Tsuboi K, Nagatomo T, Gohno T, Higuchi T, Sasaki S, Fujiki N, Kurosumi M, Takei, H, Yamaguchi Y, Niwa T, Hayashi S. Single CpG site methylation controls estrogen receptor gene transcription and correlates with hormone therapy resistance. J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有, 2017, 171:209-217. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.04.001.

Kimura M, Hanamura T, Tsuboi K, Kaneko Y, Yamaguchi Y, Niwa T, Narui K, Endo I, Hayashi S. Acquired resistance to everolimus in aromatase inhibitor-resistant breast cancer. Oncotarget. 査読有, 2018, 9:21468-21477. doi:10.18632/oncotarget.25133.

Uchiuni K, Sato N, Ito T, Hirakawa H, Tsuboi K, Niwa T, Yamaguchi Y, Hayashi S. Cancer stem-like properties of hormonal therapy-resistant breast cancer cells. Breast Cancer. 査読有, 2019, in press. doi:10.1007/s12282-018-00944-1.

Tsuboi K, Uematsu C, Yamaguchi Y, Niwa T, Hayashi S. Tumor microenvironmental growth factors induce long-term estrogen deprivation resistance in breast cancer. Breast Cancer. 査読有, 2019, in press. doi:10.1007/s12282-019-00978-z.

〔学会発表〕(計 25 件)

山口 ゆり、他 4 名、アロマターゼ阻害剤耐性を獲得した Luminal 乳癌の血清 miRNA signature. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日-29 日. 大阪国際会議場 (大阪)
坪井 洸樹、山口ゆり、他 3 名、乳癌微小環境依存性アロマターゼ阻害剤耐性モデルによる耐性メカニズム解析. 第 26 回日本乳癌学会学術総会 2018 年 5 月 16 日-18 日 京都国際会館 (京都)

山口 ゆり、他 3 名、Xenograft から樹立したアロマターゼ阻害剤耐性乳癌モデル細胞における耐性獲得機序の多様性. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 28 日-30 日. パシフィコ横浜 (横浜)

山口 ゆり、他 4 名、In vivo で樹立した AI 耐性モデル乳癌細胞株の特性と Heregulin による増殖促進作用. 第 25 回日本乳癌学会学術総会 2017 年 7 月 13 日-15 日. 福岡マリメッセ (福岡)

坪井 洸樹、山口ゆり、他 3 名、微小環境依存性の新たなアロマターゼ阻害剤耐性株の樹立と耐性機序解析. 第 25 回日本乳癌学会学術総会 2017 年 7 月 13 日-15 日. 福岡マリメッセ (福岡)

山口ゆり、他 3 名、卵巣摘出マウスで樹立したホルモン療法耐性乳癌モデル細胞における耐性機序の多様性. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日-8 日. パシフィコ横浜 (横浜)

山口 ゆり、他 1 名、乳癌における癌特異的微小環境の多様性. 第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016 年 6 月 16 日-18 日. 東京ビックサイト (東京)

福井布美代、山口ゆり、他 2 名、ヘレグリンによるエストロゲン受容体、HER ファミリーの発現と癌幹細胞、シグナル伝達制御機構. 第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016 年 6 月 16 日-18 日. 東京ビックサイト (東京)

山口 ゆり、他 1 名、乳癌微小環境の CAF とアロマターゼ. 第 23 回ステロイドホルモン学会 2016 年 1 月 15 日. 倉敷市芸文館 (倉敷)

福井布美代、山口ゆり、他 2 名、Establishment of characterization of heregulin1-1-dependent MCF-7 breast cancer cell lines. 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 (名古屋)

木村万里子、山口ゆり、他 5 名、AI 耐性かつ mTOR 阻害剤エベロリムス耐性を示す乳癌細胞株に対する次治療としての薬物療法の検討. 第 23 回日本乳癌学会学術総会 2015 年 7 月 2 日-4 日. 東京国際フォーラム (東京)

内海加奈美、山口ゆり、他 8 名、ホルモン療法耐性乳癌細胞における癌幹細胞性及び耐性の起源. 第 23 回日本乳癌学会学術総会 2015 年 7 月 2 日-4 日. 東京国際フォーラム (東京)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。