

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290036

研究課題名(和文) 悪性乳癌における癌幹細胞の維持機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of maintenance of cancer stem cells in malignant breast cancers

研究代表者

井上 純一郎 (Inoue, Jun-ichiro)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70176428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞株で見出したNF- $\kappa$ B-JAG1-NOTCH経路の癌幹細胞維持における関与が手術検体でも確認することができた。これは本経路が癌治療の標的をなりうることを示している。さらに乳癌細胞株において上皮系と間葉系細胞集団が相互作用して双方向転換を制御しながら共存していることを明らかにした。手術検体の解析から同様の相互作用が実際の腫瘍においても癌転移や癌幹細胞維持に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Involvement of the NF- $\kappa$ B-JAG1-NOTCH pathway in the maintenance of cancer stem cells, which was demonstrated using cultured breast cancer cell lines, is shown to be happened in breast cancer cells prepared from specimens. These results suggest that the NF- $\kappa$ B-JAG1-NOTCH pathway could be a target for therapy. In basal-like breast cancer cell lines, epithelial and mesenchymal cell populations are demonstrated to co-exist at a constant ratio due to the mutual interactions that regulate both epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition. Similar analyses of breast cancer specimens reveal involvement of such mutual interactions in tumor metastasis and cancer stem cell maintenance in vivo.

研究分野：分子生物学、腫瘍生物学

キーワード：癌 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

わが国において、乳癌罹患者は増加の一途を辿っており 2005 年には総女性がん罹患者の 18% を占め第一位となっている。乳癌は特に 40 代女性罹患者の 40% 以上にのぼり QOL の低下も問題となっているが、ライフスタイルの欧米化に伴って今後の更なる乳癌患者の増加が懸念されている。乳癌は Luminal-like、ERBB2 過剰発現、Basal-like、Claudin-low のタイプ (病型) に分類される。各々の乳癌は上皮細胞の異なる分化段階の細胞を起源としていることが報告されており、同じ乳癌でありながら病型によって癌細胞の性質がかなり異なっている。Luminal タイプはホルモン依存性 (エストロゲン、プロゲステロン受容体陽性: ER<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>) でホルモン療法が効果的であり、ERBB2 過剰発現タイプは抗 ERBB2 抗体トラスツズマブが効果を奏している。しかし、Basal-like と Claudin-low タイプは ER<sup>-</sup>PR<sup>-</sup>ERBB2<sup>-</sup>で triple negative 乳癌 (以下、TN 乳癌と記載) と呼ばれ効果的な治療法が見つかっていない。TN 乳癌は高転移性で再発率が高いことから新規治療標的の発見が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究開始以前に、悪性度が高く有効な治療法の無い Basal-like タイプ乳癌の特徴として高いレベルの転写因子 NF-κB の恒常的活性化を見出していた。さらにこの NF-κB の恒常的活性化が非癌幹細胞において NOTCH リガンドである JAG1 を発現誘導させ、その JAG1 が癌幹細胞の NOTCH を活性化することで幹細胞としての性質を維持させていることを報告した。この結果から非癌幹細胞が幹細胞維持の腫瘍内ニッチを形成するモデルを提唱した。また、この NF-κB と NOTCH シグナルの連携による癌幹細胞の維持機構は Basal-like タイプ特異的で他の乳癌タイプでは見られなかった。本申請ではこれらの成果をもとに Basal-like タイプ乳癌特異的な NOTCH シグナル依存性癌幹細胞維持機構の分子レベルでの解明を目指す。また、得られた成果を治療法開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

(1) 所属機関の研究倫理審査委員会に承認された方法で乳癌患者検体を入手し、次項「4. 研究成果」に記載した方法で培養し、解析した。

(2) HCC38 及び HCC1143 細胞を EpCAM, CD44, CD24 で染色し上皮系細胞集団と間葉系細胞集団を分取し解析に用いた。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌手術検体での NF-κB-JAG1-NOTCH 経路と癌幹細胞維持との関係

腫瘍約 0.1 グラムの検体をメスで細断し、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNase で処理後、酵素で消化されなかった線維組織等を

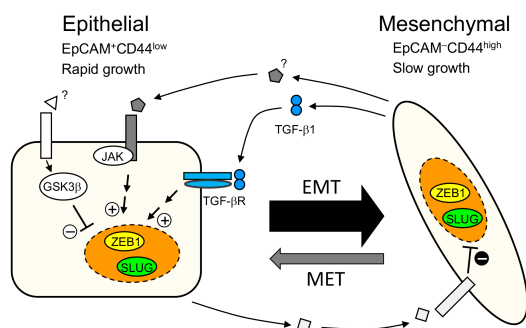
フィルターによって取り除き、弱遠心によって癌細胞をスフェロイドのまま回収する。このスフェロイドをコラーゲンコートされた培養ディッシュに播種し HuMEC 培地で培養し上皮様に伸展した癌細胞として以下の実験に用いた。次に癌細胞から RNA を抽出、BIRC5, FOXC1, ESR, FOXA1, ERBB2, GRB7 遺伝子の発現を RT-PCR により定量しその発現パターンから乳癌のサブタイプを決定した。NF-κB-JAG1-NOTCH 経路のがん幹細胞維持における関与については、癌細胞を TNFα で刺激して NF-κB を活性化した後に JAG1 の発現量を RT-PCR により定量し、癌幹細胞の増減は FACS で CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> 分画の割合定量することで算出した。

62 例の手術摘出腫瘍検体を扱い、15 例の培養に成功した。RT-PCR によるサブタイプ解析から 15 例のうち Basal-like サブタイプが 9 例、Luminal-like サブタイプが 2 例、ERBB2-enriched サブタイプが 1 例、未解析が 3 例である。Basal-like サブタイプ 9 例のうち 3 例で TNFα 刺激に依存した NF-κB の活性化により癌幹細胞分画が増大したが、Luminal-like サブタイプ 2 例、ERBB2-enriched サブタイプ 1 例では増大しなかった。この TNFα 刺激依存的な癌幹細胞増大が Basal-like サブタイプ特異的であることを結論するには例数を 5 倍程度増やす必要があるが、現時点では期待できる結果と言える。一方で Basal-like サブタイプ 9 例のうち 6 例で TNFα 刺激により JAG1 の発現が上昇したが、Luminal-like サブタイプ 2 例、ERBB2-enriched サブタイプ 1 例の中でも 2 例で TNFα 刺激により JAG1 の発現が上昇した。従って JAG1 の発現誘導については Basal-like サブタイプ特異的ではないと考えられる。また、Basal-like サブタイプで JAG1 発現誘導が認められた 3 例のうち、癌幹細胞が増えたのが 1 例であった。今後も解析を継続し Basal-like サブタイプ乳癌における癌幹細胞維持機構を in vivo 腫瘍において検証する予定である。

(2) Basal-like 乳癌における上皮-間葉双方向転換の分子機構解明

上皮間葉転換 EMT やその逆過程である間葉上皮転換 MET は癌転移において重要な役割を果たすが癌幹細胞の維持にも深く関与すると考えられている。我々は Basal-like 乳癌細胞株である HCC38 細胞や HCC1143 細胞、一部の乳癌臨床検体において Basal-like 乳癌様の EpCAM 陽性、E-cadherin 陽性の上皮系細胞集団と、Claudin-low 乳癌様の EpCAM 発現が低く Vimentin 陽性の間葉系細胞集団が一定の比率で共存していることを見出した。両集団の増殖速度に大きな差があること、間葉系細胞集団に EMT 誘導転写因子が高発現していることから、両集団の間で EMT と MET の双方向の転換があり、かつ両集団がお互い相互作用して双方向転換を制御していることが想定された。そこでこの双方向転換の制御機構を調べるために、各細胞集団を単

独もしくはお互いの集団を種々の比率で混合して培養を行ったところ、間葉系細胞の集団は周囲の上皮細胞の EMT を促進し、逆に



上皮細胞の集団は周囲の間葉系細胞の MET を促進することが分かった。またこの EMT/MET には TGF-β1 や JAK2 の活性化によって誘導される転写因子 ZEB1, SLUG の活性化が重要であることが明らかとなった(図)。一般に上皮細胞は増殖能が高く腫瘍形成に重要である一方、間葉系細胞は遊走能や細胞生存能が高く治療抵抗性との関連が報告されており、Basal-like 乳癌における両細胞のバランス維持機構の解明は、癌幹細胞の維持機構の解明に繋がるばかりでなく新たな乳癌治療戦略の創出に繋がると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Yamamoto, M., Sakane, K., Tominaga, K., Gotoh, N., Niwa, T., Kikuchi, Y., Tada, K., Goshima, N., Semba, K. and Inoue, J. Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*. doi: 10.1111/cas.13246 (2017). 査読有
2. Shibata, Y., Tokunaga, F., Goto, E., Komatsu, G., Gohda, J., Saeki, Y., Tanaka, K., Takahashi, H., Sawasaki, T., Inoue, S., Oshiumi, H., Seya, T., Nakano, H., Tanaka, Y., Iwai, K. and Inoue, J. HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathogens* 13(1):e1006162. doi: 10.1371/journal.ppat.1006162 (2017). 査読有
3. Varney, M., Choi, K., Bolanos, L., Christie, S., Fang, J., Grimes, L., Maciejewski, J., Inoue, J. and Starczynowski D. Epistasis between TIFAB and miR-146a, neighboring genes in del(5q) MDS. *Leukemia* (2017) 31, 491–495; doi:10.1038/leu.2016.276 査読有
4. Yu, J., Yun, H., Shin, B., Kim, Y., Park, E.S., Choi, S., Yu, J., Amarasekara, D.S., Kim, S., Inoue, J., Walsh, M.C., Choi, Y., Takami, M. and Rho, J.\* Interaction of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) and Vav3 in the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) signaling complex enhances osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* (2016) 291(39):20643-60. doi: 10.1074/jbc.M116.728303. 査読有
5. Narushima, Y., Kozuka-Hata, H., Tsumoto, K., Inoue, J. and Oyama, M.\* Quantitative phosphoproteomics-based molecular network description for high-resolution kinase-substrate interactome analysis. *Bioinformatics* (2016) doi:10.1093/bioinformatics/btw164. 査読有
6. Narushima, Y., Kozuka-Hata, H., Koyama-Nasu, R., Tsumoto, K., Inoue, J., Akiyama, T., Oyama, M.\* Integrative Network Analysis Combined with Quantitative Phosphoproteomics Reveals TGFBR2 as a Novel Regulator of Glioblastoma Stem Cell Properties. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 1017-1031 (2016). doi:10.1074/mcp.M115.049999. 査読有
7. Tateishi, R., Akiyama, N., Miyauchi, M., Yoshinaga, R., Sasanuma, H., Kudo, T., Shimbo, M., Shinohara, M., Obata, K., Inoue, J., Shirakawa, M., Shiba, D., Asahara, H., Yoshida, N., Takahashi, S., Morita, M. and Akiyama, T.\* Hypergravity provokes a temporary reduction of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes and a persistent decrease in medullary thymic epithelial cell frequency in mice. *PLoS ONE* 10(10): e0141650. doi:10.1371/journal.pone.0141650 (2015). 査読有
8. Varney, M.E., Niederkorn, M., Konno, H., Matsumura, T., Gohda, J., Yoshida, N., Akiyama, T., Christie, S., Fang, J., Miller, D., Jerez, A., Karsan, A., Maciejewski, J.P., Inoue, J. and Starczynowski, D.T.\* Loss of *Tifab*, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor–TRAF6 signaling *J. Exp. Med.* 212, 1967-1985. doi: 10.1084/jem.20141898 (2015) 査読有
9. Seki, T., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Miyauchi, M., Akiyama, N., Yamaguchi, N., Gohda, J., Akiyama, T. and Inoue, J.\* Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in *Relb-Venus* knock-in mice. *J. Biochem.* 158, 485-495. doi: 10.1093/jb/mvv064 (2015) 査読有
10. Shinzawa, M., Konno, H., Qin, J., Akiyama, N., Miyauchi, M., Ohashi, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H., Akiyama, T.\* and Inoue, J.\* Catalytic subunits of the phosphatase calcineurin interact with NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and attenuate NIK-dependent gene expression. *Sci. Rep.* 5:10758. doi: 10.1038/srep10758 (2015). 査読有
11. Gohda, J., Ma, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Gu, L., Han, Y., Li, T., Gao, G.F., Inoue, J.,

- Iwamoto, A. and Ishida, T\*. HIV-1 replicates in human osteoclasts and enhances their differentiation in vitro. *Retrovirology* 12:12 doi:10.1186/s12977-015-0139-7 (2015). 査読有
- Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F. and Fukai, S. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 222–229 (2015). 査読有
  - Ito-Kureha, T., Koshikawa, N., Yamamoto, M., Semba, K., Yamaguchi, N., Yamamoto, T., Seiki, M. and Inoue, J.\* Tropomodulin 1 expression driven by NF- $\kappa$ B enhances breast cancer growth. *Cancer Res.* 75, 62–72 (2015). 査読有

〔学会発表〕(計 25 件)

- 柴田佑里、HTLV-1 Tax Induces K63-and M1-linked Hybrid Polyubiquitin Chains to Activate the IKK Complex、18th International Conference on Human Retrovirology HTLV & Related Viruses、平成 29 年 3 月 7 日-10 日、グランドアーク半蔵門(東京都千代田区)
- 井上純一郎、ヒト T 細胞白血病ウイルスの発癌タンパクの発癌タンパク質 Tax による NF- $\kappa$ B 活性化機構、金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、平成 29 年 2 月 14 日 - 15 日、金沢東急ホテル(石川県金沢市)
- 山本瑞生、TRAF6 は乳腺上皮細胞の維持および乳腺上皮細胞の細胞死抑制によって妊娠期の乳腺発達を促進する、先端モデル動物支援プラットフォーム、平成 29 年 2 月 6 日-7 日、琵琶湖ホテル(滋賀県大津市)
- 柴田佑里、ポリユビキチン鎖を介した HTLV-1 Tax 誘導性の IKK 複合体活性化機構の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 坂根康太、Basal-like 乳がんモデルマウスにおける CRISPR/Cas9 システムを利用したガン抑制遺伝子の探索、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 山本瑞生、TRAF6 は乳腺上皮細胞の維持および乳腺上皮細胞の細胞死抑制によって妊娠期の乳腺発達を促進する、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 山本瑞生、乳腺発達と乳がん悪性化における転写因子 NF- $\kappa$ B の役割の相違、第 75 回日本癌学会学術総会、平成 28 年 10 月 6 日 - 8 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 井上純一郎、HTLV-1 Tax 誘導性の IKK 複合体活性化機構の解析、第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会、平成 28 年 8 月 26 日-28 日、鹿児島県市町村自治会館(鹿児島県鹿児島市)
- 柴田佑里、Analysis of HTLV-1 Tax-induced IKK activation pathway、American Association Cancer Research、平成 28 年 3 月 13 日 - 17 日、バンクーバー(カナダ)
- 山本瑞生、TRAF6 regulates pregnancy-induced mammary gland development and maintenance of epithelial stem cells、Keystone symposia Stem Cells and Cancer (C1)、平成 28 年 3 月 6 日 - 10 日、コロラド(USA)
- 山本瑞生、乳癌における細胞間相互作用による上皮的葉転換の制御、第 74 回日本癌学会学術総会、平成 27 年 10 月 8 日 - 10 日、名古屋国際センター(愛知県名古屋市中区)
- 柴田佑里、HTLV-1 Tax 誘導性の IKK 複合体活性化におけるポリユビキチン鎖の機能解析、日本 HTLV-1 学会学術集会、平成 27 年 8 月 22 日-23 日、東京大学医科学研究所(東京都港区)
- 井上純一郎、NF- $\kappa$ B シグナルによる Triple negative 乳がんの悪性化、癌研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム、平成 27 年 1 月 27 日 - 28 日、一橋講堂 学術総合センター(東京都千代田区)
- 井上純一郎、Tropomodulin 1 expression driven by NF- $\kappa$ B enhances breast cancer growth、The 4th Japan-France Cancer Workshop、平成 26 年 11 月 19 日-21 日、関西セミナーハウス(京都府京都市)

〔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  
<https://www.traf6.com>

## 6. 研究組織

- 研究代表者  
井上 純一郎 (INOUE, Jun-ichiro)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：70176428
- 研究分担者：なし
- 連携研究者：なし
- 研究協力者  
山本瑞生 (YAMAMOTO, Mizuki)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号：95750365