

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14381

研究課題名(和文)細胞順応による初期転移巣成立機構解析の基盤構築

研究課題名(英文)Molecular basis for the establishment of early metastatic lesion through cell adaptation

研究代表者

下野 洋平(Shimono, Yohei)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90594630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身に播種されるがん細胞が臓器選択的に定着する機構には、「播種先の臓器固有の微小環境へのがん細胞の適応(細胞順応)」が関連すると考えられる。本研究では、ヒト乳がん異種移植マウスの肝臓より分離した初期転移がん細胞の解析を通じて、がん転移の初期段階で特徴的に発現するマイクロRNAや遺伝子を同定した。つぎに、特にマイクロRNA-106b-25クラスターに着目してその発現制御機構を解析した。また、がん細胞の肝臓への「細胞順応」を解析するモデルとして肝臓の初代培養細胞とヒト乳がん細胞の共培養系を樹立した。

研究成果の概要(英文)：Successful engraftment of disseminated metastatic cancer cells will require an adaptation of cancer cells to the specific microenvironments of metastasized organs. We identified the profile of microRNAs and genes specifically expressed in the early metastatic cancer cells directly isolated from the metastatic organ of human breast cancer patient-derived xenograft mice. We then analyzed the regulatory mechanism for the expression of miR-106b-25 cluster miRNAs. We also established the in vitro culture system in which primary liver cells and human breast cancer patient-derived xenograft cells were co-cultured to facilitate analyses of the adaptation of breast cancer cells to metastasized organs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳がん 肝転移 異種移植マウス マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

がんの転移臓器には、がん種により一定の傾向がみられることは、古くから Seed and Soil 理論として知られる。その背景にある分子機構の一つとして、がん細胞と転移組織細胞の細胞表面分子間の選択的結合が関与することが示されてきた。また、転移臓器の微小環境は、がん細胞に特異的变化をおよぼして、抗がん剤に対する感受性なども変化させる。したがって、がん細胞は、臓器選択的に生着し、転移臓器特異的に性質を変化させていると考えられる。未解明であるこれらの機構を解明することは、原発巣のがん細胞に比べ明らかに治療が困難である転移がん細胞を克服するためにも重要である。

### 2. 研究の目的

がん細胞の臓器選択的な転移の過程では、「播種先の臓器固有の微小環境へのがん細胞の適応(細胞順応)」が起こり、それに伴いがん細胞の遺伝子発現に臓器特異的な変化がみられると考えられる。本研究では、初期の微小な肝転移が観察可能なヒト乳がん手術検体異種移植マウスを用いて、初期転移がん細胞の転移臓器への「細胞順応」に関わる分子機構を、マイクロRNA発現を指標に解析する。さらに、正常肝初代培養細胞とヒト乳がん細胞の共培養系を作製して、がん細胞順応機構解析モデルを樹立する。

### 3. 研究の方法

転移がん細胞の「細胞順応」に関わる分子機構を解明するために以下の三つの研究を遂行する。

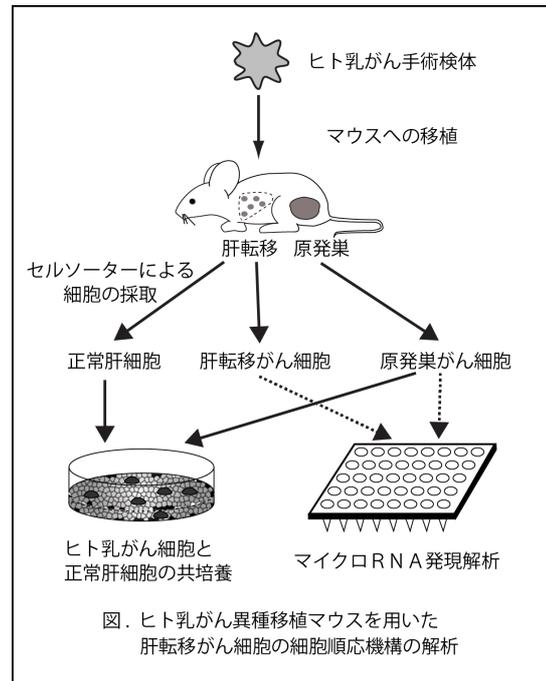
#### (1) 肝転移がん細胞と正常肝細胞のマイクロRNA発現プロファイルの比較

ヒト乳がん異種移植マウスより分離した原発巣と肝転移巣のがん細胞、および正常肝細胞のマイクロRNA発現プロファイルを解析し、比較検討する。肝転移に伴い発現が変

化するがん細胞のマイクロRNAと、正常肝細胞に発現するマイクロRNAの共通性に特に着目する。

#### (2) 正常肝初代培養細胞とヒト乳がん細胞の共培養によるがん細胞順応機構解析モデルの樹立

細胞順応に伴うがん細胞の変化が観察可能なモデルとして、GFP発現ヒト乳がん細胞と正常肝初代培養細胞との共培養系を作製する。



### 4. 研究成果

#### (1) 転移がん細胞の細胞順応に関わる分子機構の解析

ヒト乳がん手術検体を移植した異種移植マウスを用いて、原発巣と初期肝転移巣のがん細胞を、セルソーターを用いて分離した。得られたがん細胞およびマウスの正常肝細胞のマイクロRNA発現プロファイルを、リアルタイムPCR法を用いたマイクロRNAアレイにより解析した。マイクロRNAの発現プロファイルの比較検討を通じて、1. 初期肝転移に伴い発現が変化するマイクロRNAと、2. 正常肝細胞と初期肝転移がん細胞に共通して発現がみられるマイクロRNA

Aを同定した。

例えば、転移巣ではmiR-106b-25 クラスタマイクロRNAをはじめとしたマイクロRNAの発現が低下していた。解析を通じて、酸素環境の変化に伴うmiR-106b-25 クラスタマイクロRNAの発現は、その宿主遺伝子であるMCM7の転写の変化ではなく、マイクロRNA前駆体からの成熟過程の変化により制御されることが明らかになった。

さらに、セルソーターを用いて分離した原発巣と初期肝転移巣のがん細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、初期肝転移に伴い発現が変化する一連の遺伝子を同定した。

本研究により明らかになった初期転移巣で発現が変化するマイクロRNAと遺伝子は、転移がん細胞が転移臓器に順応する過程で重要な「幹細胞性の制御」にも関わると考えられた。

## (2) 正常肝初代培養細胞とヒト乳がん細胞を用いたがん細胞順応機構解析モデルの樹立

「細胞順応」を解析するモデルとして、マウス肝臓より分離した初代培養肝細胞と、ヒト乳がん異種移植マウスの腫瘍より分離したがん細胞の共培養系を樹立した。つぎに、共培養系より分離したがん細胞のマイクロRNA発現を検討したが、それは必ずしも初期肝転移乳がん細胞のマイクロRNA発現パターンを反映しなかった。

エクソソームは、マイクロRNAを含む分子を細胞間で伝達する因子として注目されている。そこで、肝臓の初代培養細胞の上清よりエクソソームを分離して、三次元培養されたヒト乳がん細胞に加えたところ、ヒト乳がん細胞の形態変化を誘導した。したがって、初期転移がん細胞の「細胞順応」の過程に、周囲の肝細胞に由来するエクソソームが関与する可能性が考えられた。

## (3) 細胞順応に伴う腫瘍原性の変化

ヒト乳がん異種移植マウスの転移臓器より分離したがん細胞を継代移植したところ、肝転移巣より分離した初期転移がん細胞は継代移植が極めて困難であった。したがって、転移部位の違いによりがん細胞の腫瘍原性に著しい違いを生じると考えられた。この知見から、細胞順応はがん細胞の腫瘍原性にも影響する重要な因子であることが示唆された。

## (5) 今後の展望

本研究では、転移がん細胞の細胞順応の過程で、マイクロRNAおよび遺伝子の発現の変化がみられることが明らかになった。初期転移がん細胞では腫瘍原性も変化していることから、細胞順応に伴うがん細胞のエピジェネティックな変化は、比較的不可逆的なものであることが示唆された。臓器特異的ながん細胞の細胞順応の機構を明らかにすることは、原発巣に比べて明らかに治療が困難であるがん転移巣の克服のためにも重要な課題であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

1. Discordance of MCM7 mRNA and Its Intronic MicroRNA Levels under Hypoxia. Kondo H, Shimono Y, Mukohyama J, Tanaka Y, Shibuya N, Minami H, Kakeji Y, Suzuki A. *Anticancer Research*. 査読有、in press、2017年.
2. Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells. Tominaga K, Shimamura T, Kimura N, Murayama T, Matsubara D, Kanauchi H, Niida A, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji EI, Yano M, Sugano S, Shimono Y, Ishii H, Saya H, Mori M, Akashi K, Tada KI, Ogawa T, Tojo A, Miyano S, Gotoh

- N. *Oncogene*, 査読有、36 巻、1276-1286 頁、2017 年、doi: 10.1038/onc.2016.293.
3. Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Goto H, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. *Journal of Biochemistry*, 査読有、161 巻、237-244 頁、2017 年、doi: 10.1093/jb/mvw074.
  4. Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens. Mukohyama J, Iwakiri D, Zen Y, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y, Shimono Y. *Oncotarget*, 査読有、7 巻、50150-50160 頁、2016 年、doi: 10.18632/oncotarget.10322.
  5. Effect of Xenotransplantation Site on MicroRNA Expression of Human Colon Cancer Stem Cells. Mukohyama J, Shimono Y, Yamashita K, Sumi Y, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y. *Anticancer Research*, 査読有、36 巻、3679-86 頁、2016 年.
  6. Regulation of CD44 expression and focal adhesion by Golgi phosphatidylinositol 4-phosphate in breast cancer. Ijuin T, Takeuchi Y, Shimono Y, Fukumoto M, Tokuda E, Takenawa T. *Cancer Science*, 査読有、107 巻、981-90 頁、2016 年、doi: 10.1111/cas.12968.
  7. A Novel Nectin-mediated Cell Adhesion Apparatus That Is Implicated in Prolactin Receptor Signaling for Mammary Gland Development. Kitayama M, Mizutani K, Maruoka M, Mandai K, Sakakibara S, Ueda Y, Komori T, Shimono Y, Takai Y. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、291 巻、5817-5831 頁、2016 年、doi: 10.1074/jbc.M115.685917.
  8. miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells through the Inhibition of DCLK1. Sakaguchi M, Hisamori S, Oshima N, Sato F, Shimono Y, Sakai Y. *Molecular Cancer Research*, 査読有、14 巻、354-62 頁、2016 年、doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0380.
  9. MicroRNA Regulation of Human Breast Cancer Stem Cells. Shimono Y, Mukohyama J, Nakamura S, Minami H. *Journal of Clinical Medicine*, 査読有、5 巻、e2、2016 年、doi: 10.3390/jcm5010002.
  10. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. *Oncology Reports*, 査読有、33 巻、1837-1843 頁、2015 年、doi: 10.3892/or.2015.3767.
- [学会発表](計 19 件)
1. Yohei Shimono, MicroRNA Regulation of Cancer Stem Cells in Human Solid Tumors、神戸大学・ワシントン大学・オスロ大学国際合同シンポジウム、2017.3.13-14. 神戸大学(兵庫県)
  2. 下野 洋平、西村 建徳、向山 順子、鈴木 聡、後藤 典子、早期転移乳がん幹細胞を特徴づける幹細胞性維持機構の解析、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、2017.2.14-15. 金沢東急ホテル(石川県)
  3. Yohei Shimono, Identification of the proteins specific for human breast cancer stem cells、ベルギー大学訪問団シンポジウム、2016.10.14. 神戸大学(兵庫県)
  4. 下野 洋平、向山 順子、西村 建徳、磯

部 大地、向原 徹、鈴木 聡、後藤 典子、南 博信、臓器への潜在転移に関わるヒト乳がん幹細胞の解析、日本サイトメトリ学会、2016.7.23-24. 九州大学(福岡県)

5. Yohei Shimono, Junko Mukohyama, Tatsunori Nishimura, Noriko Gotoh, Hironobu Minami, Akira Suzuki、Molecular characterization of quiescence and stemness of metastatic breast cancer stem cells: implication for their therapeutic resistance. 第41回内藤コンファレンス、2016.7.5-8. シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道)
6. Yohei Shimono, Tatsunori Nishimura, Junko Mukohyama, Taichi Isobe, Toru Mukohara, Noriko Gotoh, Hironobu Minami、Molecular characterization of dormant metastatic human breast cancer stem cells. 第14回 幹細胞シンポジウム、2016.5.20-21. 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)
7. Yohei Shimono、Cancer stem cells and drug resistance in human breast cancers. Joint Symposium of University of Liege & Kobe University、2015.5.13-14. 神戸大学(兵庫県)

〔図書〕(計 2件)

1. Shimono Y, Mukohyama J, Isobe T, Johnston D, Dalerba P, Suzuki A. Springer, Organoid Culture of Human Cancer Stem Cells, in Organoids: Stem Cells, Structure and Function (Kursad Turksen, ed.), 査読有、1-9頁、2016年、DOI: 10.1007/7651\_2016\_13

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/>

<http://ganshien.umin.jp/research/spotlight/shimono/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下野 洋平 (SHIMONO, Yohei)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 90594630

### (2) 研究協力者

南 博信 (MINAMI, Hironobu)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

高尾 信太郎 (TAKAO, Shintaro)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

Michael Clarke (CLARKE, Michael)

スタンフォード大学・幹細胞医学研究所・教授

磯部 大地 (ISOBE, Taichi)

スタンフォード大学・幹細胞医学研究所・博士研究員

向山 順子 (MUKOHYAMA, Junko)

神戸大学・大学院医学研究科・大学院生