

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15473

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳がん幹細胞に対するluminal分化誘導療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of luminal induction therapy of triple-negative breast cancer stem cells

研究代表者

吉川 清次 (Yoshikawa, Kiyotsugu)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40333562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：MET (mesenchymal-epithelial transition)レポーターを用いたスクリーニングにより強力に上皮転換を誘導するshP1, shH1を同定した。shP1導入にて、乳癌細胞は抗癌剤に感受性を示す一方、膠芽細胞腫細胞は増殖は著明に抑制された。shP1とshH1の配列比較によりmiR-200配列を共通に認めた。shH1は強力な増殖抑制作用故に抗腫瘍効果も期待できる。がん幹細胞モデルに致死効果のあるshRNAの標的遺伝子がmiR-200c配列を持つことを発見した。今後はこれらのhybrid shRNAの増殖抑制効果を確認していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Through the shRNA library screening with MET reporter, I identified two shRNAs, shP1 and shH1. The shP1-infected MDA-MB-231 (231) breast cancer cells became mammary progenitor-like cells, but not luminal, maintained proliferative ability, and hence exhibit sensitivity to paclitaxel and EGFR inhibition. On the other hand, the shP1-infected U251 glioblastoma (GBM) cells increased the expression of ES-like genes. In contrast to shP1-231 cells, the shP1-U251 cells showed marked inhibition of their proliferative ability both in vitro and in vivo. We have found the sequence shared between shP1 and shH1 corresponding to miR-200c sequence. The shH1 has stronger growth-suppressive effect than shP1 in both 231 and U251. We have also identified the target genes whose inhibition leads to marked suppression in growth in artificial cancer stem cell model. These genes also have miR-200 sequence in common. In the future plan, we will see the effect of miR-200-containing shRNAs of the genes.

研究分野：分子腫瘍医学

キーワード：間葉転換解除 トリプルネガティブ乳癌 膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬が登場し、予後不良の HER2 陽性乳がんは格段に進歩した。しかしホルモン受容体陰性・HER2 陰性の triple negative 乳がん(TNBC)は、分子標的が未だ同定されておらず、臨床上の問題となっている。治療抵抗性の要因としてがん幹細胞の存在があり、乳がん幹細胞は epithelial-mesenchymal transition (EMT)を起こした細胞であることが判っている。我々は EMT/MET レポーターを用いた shRNA ライブラリースクリーニングにより TNBC がん幹細胞の性質をもつ間葉系乳がん細胞株を MET 誘導する新規 shRNA(以下 shP1 と呼ぶ)を同定した(図1)。 shP1 導入細胞は、luminal cytokeratin18 が陽転化し、EGFR/MEK 阻害・抗がん剤に対する感受性を獲得することから、shP1 によりがん幹細胞が luminal 前駆細胞に分化誘導

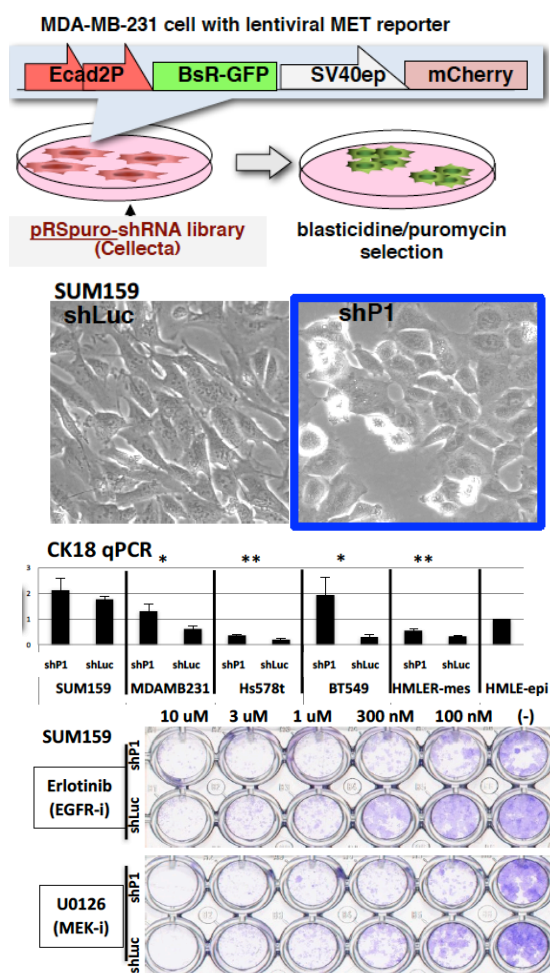


図1. MET誘導shRNA: shP1の同定

されたと考えられる。

2. 研究の目的

ホルモン受容体陰性・HER2 陰性の triple-negative 乳がん (TNBC)は未だ治療標的分子の同定されていない難治性がんである。乳がんは不均一な細胞集団で構成され、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) によって TNBC がん幹細胞が生み出されている。我々は独自のレポーターシステムによるスクリーニングにより間葉上皮転換(MET)を誘導する shRNA (shP1)を同定した。shP1 は TNBC がん幹細胞を luminal 前駆細胞へと分化誘導し、抗がん剤の感受性を高めることを見いだした。本申請では、CSC から分化誘導された luminal 前駆細胞の増殖を抑える化合物の探索と、成熟分化を誘導し抗 estrogen に対する感受性を獲得する方法の探索を行い、TNBC を分化誘導した後に治療する新たな治療戦略の確立をする。

3. 研究の方法

間葉系乳がん細胞株から分化誘導された luminal 前駆様細胞 (shP1 細胞)の標的遺伝子をマイクロアレー解析より抽出し、ノックダウンによる増殖抑制効果を観る (A1)。shP1 細胞の増殖を抑制する化合物を化合物ライブラリーにて探索する (A2)。estrogen-responsive element (ERE)下流に blasticidine 耐性遺伝子を発現する ERE レポーター細胞に shRNA ライブラリーを導入し、estrogen/blasticidine 下に生存した細胞クローンの shRNA 部のシーケンスにより遺伝子標的を同定する。同定された shRNA が tamoxifen 感受性をあげるか shP1 細胞に導入し確認する (B)。A. B より同定された shRNA の他がん腫での効果と、*in vivo*での TNBC ヒトがん組織への効果を patient-derived xenograft (PDX) マウス移

植モデルで検証する (C)。

4. 研究成果

ERE レポーターを組み込んだ MCF7 細胞において E2 depletion 前後の ERE 転写活性を測定したところ予想に反して減少した。Estrogen responsive element を指標にしたスクリーニングの続行は困難と判断した。そのため当初の実験計画を変更し、MET 誘導 shRNA のさらなるスクリーニングを行い MET 誘導のメカニズムを探索することとした。最終的に shP1 に加えて shH1 の 2 つの shRNA を同定した。shH1 の標的遺伝子に対する shRNA を 2 つ作成したが、shP1 と同様に KD 効果と MET 誘導の間に相関関係は見られず、shH1 の off target 効果であると考えられた。shP1 と shH1 の MET 誘導効果は幅広く間葉系腫瘍細胞株 (乳がん・膠芽腫・骨肉腫・滑膜腫・膵臓がん・肺がん・線維肉腫) に幅広く MET を誘導し、共通の機構があると考えられた (図 3)。shP1 と shH1 の配列を比較して 11 bp の相同配列を同定し、内 7bp は MET 誘導が報告されている miR-200 ファミリーの seed 配列に一致した。一方 shP1

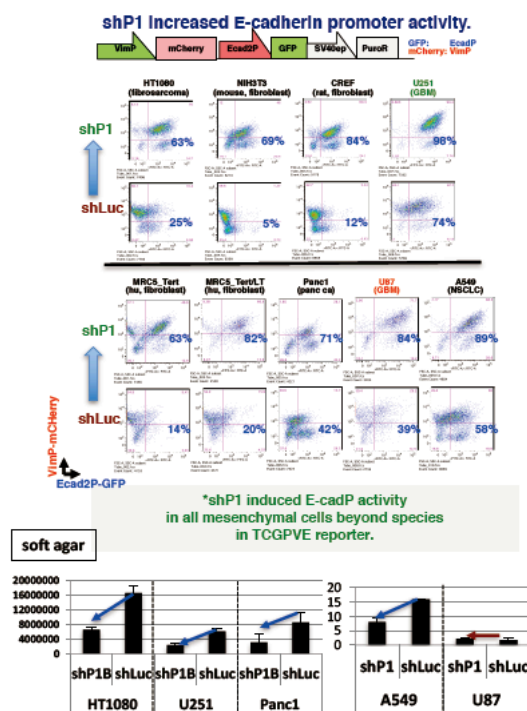


図3. shP1の各種癌細胞に対する影響

と shH1 では、増殖抑制効果に違いが認められ、shH1 の方が強い増殖抑制効果を認めた。U251 膠芽腫細胞株に対しては shP1・shH1・miR-200c のすべてで増殖抑制効果が認められる一方、MDA-MB-231 細胞では、shP1・miR-200c は増殖を促進する一方、shH1 は増殖を抑制した (図 4)。

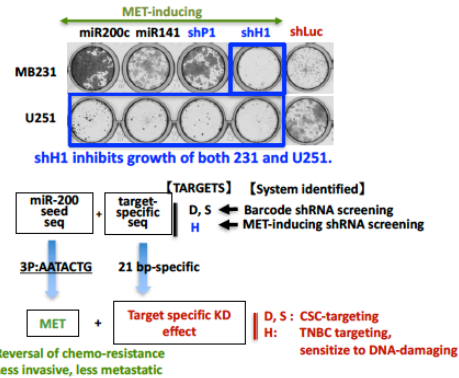


図4. shP1・shH1の乳癌・膠芽腫細胞株の増殖に対する影響

shP1 誘導 231 細胞の解析では、TERT・ERBB3 mRNA の増加、細胞周期 G2M/polyloid 集団の増加を認めた。MET 誘導は細胞周期を介して 231 細胞の増殖を促進すること、DNA 修復に関係する H 遺伝子機能抑制が上皮化細胞に有効であることを示唆している。以上より miR-200 seed 配列を含む遺伝子が新たな標的になりうることを示唆される。上記のようにトリプルネガティブ乳がん (TNBC) の luminal 分化誘導は未だ実現できていないが、miR-200c の seed 配列+標的遺伝子 shRNA からなる hybrid shRNA による標的 knock down が新たな治療戦略になるとの着想を得た。特に shH1 の増殖抑制効果が顕著である。今後は miR-200c の seed 配列を持つ標的遺伝子の網羅的な解析を通じて、TNBC に効果を示す配列の同定を行う。これまでの研究で、doxycycline による H-RAS 誘導・tamoxifen による SNAIL 活性化 EMT 誘導する、人工がん幹細胞モデルを用いた Barcode shRNA screening により間葉系のがん幹細胞に対して致死効果のある shRNA を複数同定している (図 5)。そのうちの D・S・N 遺伝子は miR-200c seed

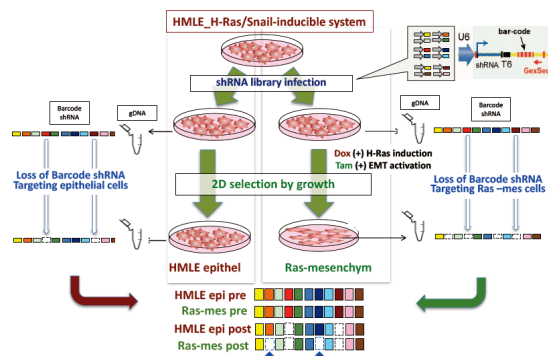


図5. Barcode shRNA screeningによる癌幹細胞致死遺伝子の同定配列を持つことを確認している。今後はこれらの hybrid shRNA の増殖抑制効果を in vivo, in vitro の両方で確認していく予定である。

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 5 件)

吉川清次、荒川芳輝、戸口田淳也、戸井雅和

“Targeting epithelial-mesenchymal transition: from breast cancer to glioblastoma” “間葉転換解除による難治性がん治療法の開発”

第75回日本癌学会学術総会

2016年10月6日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

吉川清次、戸井雅和

“トリプルネガティブ乳癌の間葉上皮転換による分化療法の検討：膠芽腫との比較から見えてきた治療可能性”

第24回日本乳癌学会学術総会 パネルディスカッション

2016年6月17日 東京国際展示場 (東京都)

Yoshikawa K, Sakai H, Shimazaki M, Okada N, Matsumoto Y, Reinherz E, Toi M. Reversal of mesenchymal phenotype of triple-negative breast cancer and glioblastoma cells and its therapeutic implication.

AACR-NCI-EORTC international conference

2015年11月8日 Boston (USA)

吉川清次、酒井浩旭、嶋崎雅広、岡田宣宏、松本純明、戸井雅和

“トリプルネガティブ乳癌とグリオブラストーマにおける MET による分化療法の検討。”

第53回日本癌治療学会学術総会 (ワークショップ)

2015年10月29日 京都国際会議場 (京都府・京都市)

吉川清次、酒井浩旭、嶋崎雅広、岡田宣宏、松本純明、戸井雅和

“Therapeutic reversal of mesenchymal phenotype by MET in triple-negative breast cancer and glioblastoma cells.”

“トリプルネガティブ乳癌とグリオブラストーマにおける MET による間葉転換解除による分化療法の検討。”

第74回日本癌学会学術総会 (シンポジウム講演)

2015年10月8日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

[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(現所属)

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/教員の研究紹介/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川清次 (YOSHIKAWA Kiyotsugu)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40333562

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし