

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08261

研究課題名(和文) サブタイプ変化を伴う乳がんの悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism underlying the discordance of breast cancer subtypes

研究代表者

高橋 陵宇 (Takahashi, Ryou-u)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・准教授

研究者番号：10625510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんのサブタイプ分類(ホルモン受容体および HER2 受容体の有無)は治療薬の選択において重要である。一方で、近年、再発および転移巣においてサブタイプの不一致が見られることが報告されている。また、サブタイプ不一致が解析できる実験系も十分確立されていない。

本研究では、サブタイプ不一致が誘導できる実験系の確立を試みるとともに、その分子機序を検討した。期間内にホルモン受容体の1つであるエストロゲン受容体の発現低下が誘導できる実験系の確立に成功している。また、サブタイプ不一致が観察される症例として骨転移症例が報告されているため、骨転移性乳がん細胞株の作製も試みており、樹立にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サブタイプ分類は乳がんの治療薬の選択において重要な指標となるため、治療過程あるいは再発時にサブタイプの変化が生じた場合は適切な治療薬を選択できていない可能性がある。一方で、サブタイプの変化を評価できる実験系は十分に確立されていない。本研究によりサブタイプ変化の機序の一端を明らかにできた場合、治療過程における奏効率の評価や再発予測の技術開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulating the lines of evidence suggest that breast cancer subtype might change from the primary tumor to the recurrence. Since the subtype and receptor status are critical factors for the consideration of the cancer treatment, it is important to understand the molecular mechanism of the subtype discordance. However, the experimental conditions of subtype discordance are still reminded to be established.

In the present study, using the breast cancer cell lines expressing estrogen receptor (ER) that is one of the hormone receptors, we succeeded in the establishment of the cell culture method where down-regulation of estrogen receptor was observed. We also established the bone metastatic cell lines. Because bone metastasis is often associated with the recurrence of ER positive breast cancer patient. Our results might contribute the understanding of the molecular mechanism for the subtype discordance and improve the treatment of breast cancer patients.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん 幹細胞 サブタイプ変化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんは遺伝子発現および免疫組織学的解析から大きく4つのサブタイプ(Luminal-A and B, HER2+, Basal型)に分類され(表1)、ホルモン受容体であるエストロゲン受容体(ER)や受容体型チロシンキナーゼ(HER2)がその指標として用いられる。また、Basal型においてはホルモン受容体(ERおよびプロゲステロン受容体)とHER2が共に陰性であるTriple Negative Breast Cancer (TNBC)症例が多く見られる。このようなサブタイプ

表1: 乳がんのサブタイプ分類

	増殖能	ER(+)	ER(-)
HER2(-)	低い	Luminal A: ホルモン療法	Basal (主にTNBC): 化学療法
	高い	Luminal B: ホルモン療法 + 化学療法	
HER2(+)	問わず	Luminal B: ホルモン療法 + 化学療法 + 分子標的薬	HER2: 化学療法 + 分子標的薬

(増殖能: Ki67の発現で評価)

タイプ分類は治療薬(ホルモン療法、抗がん剤、分子標的薬)の選択に非常に有用である。その一方で、再発性乳がんなどにおける予後不良症例では、サブタイプの不一致が観察されることが報告された(Liedtke et al. Ann Oncol 2009, Dieci et al. Ann Oncol 2013)。特に、ER陽性から陰性への変化などが見られるLuminal型からBasal型への移行が確認された場合に、有意に予後不良であることが明らかにされた。

上記のように乳がんのサブタイプ不一致とその予後に相関が見られるにも関わらず、現在に至るまで、サブタイプ変化の機序を詳細に検討した報告はほとんどない。また、同一細胞内でサブタイプ変化が生じるかどうかも十分には検討されていない。申請者らはこれまでに、乳がん細胞において非翻訳型RNAの1つであるmicroRNA-27b(miR-27b)の発現低下に伴い、がん幹細胞画分(CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup>画分)が形成されることを報告している(Takahashi et al. Nat commun 2015)。その後の解析から、上記の幹細胞画分が形成される際に、サブタイプ変化の重要な特徴の1つである“エストロゲン受容体(ER)の発現低下”が誘導されることを見出している。

### 2. 研究の目的

本研究では、Luminal型の乳がん細胞株においてERの発現低下が誘導される機序を明らかにし、難治性乳がんを対象とした新たな治療方法の開発に取り組むことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 単一乳がん細胞内におけるERの発現解析

ERの発現低下が単一乳がん細胞内において生じるかを検討するため、ER応答性のGFPおよびLuciferase遺伝子(ER-GFP-T2A-Luc)を発現するコンストラクトを作製し、ER-GFP-T2A-Luc陽性細胞集団から陰性細胞が形成されるかをセルソーターにより検討した。レンチウイルスを用いてER-GFP-T2A-Lucを恒常発現するER陽性の乳がん細胞株を2種(MCF7およびZR75-1細胞)作製した。ER-GFP-T2A-Luc陽性の細胞集団をセルソーターにより分取し、ERの陰転化を誘導できる条件下で細胞培養を行った。その後、再度、ER-GFP-T2A-Lucの発現を評価した。

#### 2) ERの発現変動に関わる分子の探索

前項で使用した細胞株(MCF7-ER-GFP-T2A-Luc)を用いて、ERの陰転化に伴い変動する遺伝子群の同定を試みた。ERの発現低下を誘導する前後でRNAを抽出し、マイクロアレイを用

いた遺伝子発現解析を行った。

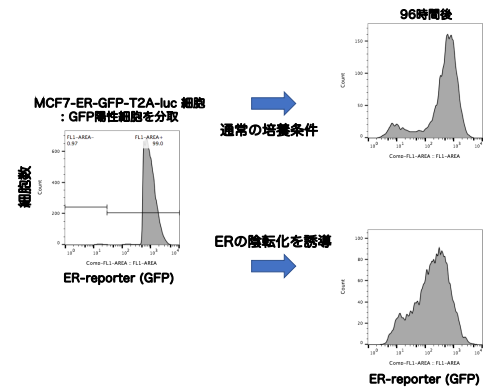
### 3) 骨転移株の作製

予後不良の Luminal 症例では骨転移を生じる割合が他の臓器への転移の割合と比較して約3倍高いため(Kennecke et al., JCO 2010)、サブタイプ変化を示した細胞集団が骨転移にも深く関与していると考えられた。そこで、項目 1)で樹立した細胞株を用いて骨転移株の樹立を試みた。また、骨転移株において ER の発現低下に関わる分子の発現を検討した。

## 4. 研究成果

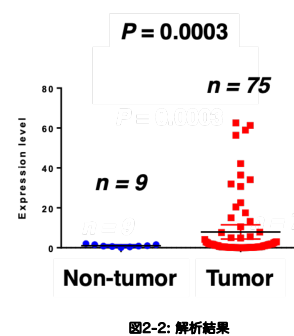
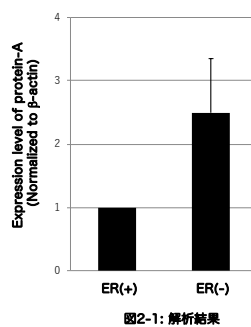
### 1) 単一乳がん細胞内における ER の発現解析

ER-GFP-T2A-Luc 陽性の細胞を分取後、再度 ER の陰転化を誘導した。誘導後 96 時間後にセルソーターにより ER-GFP-T2A-Luc の発現を評価した結果、通常の培養条件と比較して ER-GFP-T2A-Luc 陰性の細胞集団が有意に増加することが明らかとなった(図 1 参照)。



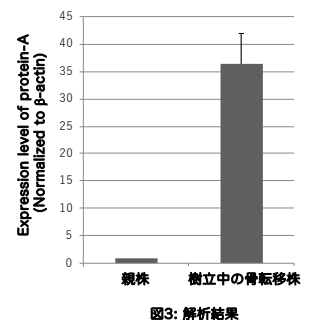
### 2) ER の発現変動に関わる分子の探索

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、ER の発現低下により亢進する分子群の同定に成功した。これらの分子群から膜タンパク質 (分子 A) に焦点を当て解析したところ、定量 PCR の結果からも同様の結果が得られた(図 2-1 参照)。また、臨床検体を用いた解析からも非がん部と比較してがん部において分子 A の発現が亢進していることが観察された(図 2-2 参照)。



### 3) 骨転移株の作製

免疫不全マウスと Luciferase 遺伝子を恒常発現する乳がん細胞株 2 種 (MCF7-luc および ZR75-1-luc 細胞株) を用いて骨転移株の樹立を試みた。現在までに骨組織に生着した細胞株を分取し、骨組織への転移能が亢進したかを検討中である。また、骨組織に生着した細胞集団において前項の分子 A の発現を定量 PCR により評価したところ、有意に発現が亢進していた(図 3 参照)。



以上のことから、本研究では 1) ER の陰転化が単一乳がん細胞で生じていることを明らかにし、さらには、2) ER の発現低下に伴い発現が亢進する分子 A の同定に成功した。ま

た、分子 A は骨転移への関与も観察された。これらの結果は、ER 陰転化の機序の理解、さらには、骨転移を伴う予後不良症例の改善に貢献するものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件, すべて査読有り)

1. Takahashi RU, Prieto-Vila M, Kohama I, Ochiya T. Development of miRNA-based therapeutic approaches for cancer patients. *Cancer Sci.* 2019, in press
2. Miyazaki H, Takahashi RU, Prieto-Vila M, Kawamura Y, Kondo S, Shiota T, Ochiya T. CD44 exerts a functional role during EMT induction in cisplatin-resistant head and neck cancer cells. *Oncotarget.* 2018 Jan 13;9(11):10029-10041. doi: 10.18632/oncotarget.24252.
3. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 1;18(12).pii: E2574. doi: 10.3390/ijms18122574.
4. Hironaka-Mitsunashi A, Matsuzaki J, Takahashi RU, Yoshida M, Nezu Y, Yamamoto Y, Shiino S, Kinoshita T, Ushijima T, Hiraoka N, Shimizu C, Tamura K, Ochiya T. A tissue microRNA signature that predicts the prognosis of breast cancer in young women. *PLoS One.* 2017 Nov 15;12(11):e0187638. doi: 10.1371/journal.pone.0187638.
5. Takahashi RU, Prieto-Vila M, Hironaka A, Ochiya T. The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. *Clin Chem Lab Med.* 2017 May 1;55(5):648-656. doi: 10.1515/cclm-2016-0708.
6. Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi RU, Yamamoto Y, Camargo FD, Ochiya T. Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell.* 2017 Jan 5;20(1):41-55. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.007.

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. 難治性乳がんを標的とした新規核酸医薬の開発  
高橋 陵宇, 武元 宏泰, 西山 伸宏, 落谷 孝広  
第 77 回日本癌学会学術総会(招待講演)(国際学会), (2018)

〔図書〕 (計 1 件)

1. 体液 MicroRNA を対象としたがんの早期診断方法の開発とその展望  
高橋陵宇、プリエット・ピラ・マルタ、小濱一作、落谷孝広  
癌と化学療法 Volume 45, Issue 6, 899 - 905 (2018)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 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：<http://www.telomere.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

※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。