

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10569

研究課題名(和文)患者由来乳癌幹細胞の同定と治療標的探索

研究課題名(英文)Analysis of a candidate gene for breast cancer stemness

研究代表者

高井 健 (Takai, Ken)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 乳腺腫瘍内科・その他

研究者番号：80775031

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)：エストロゲン受容体(ER)はtumor cluster内では核に発現しているがLGR5(+)細胞には認めなかった。一方でstromaでは細胞膜にERを発現するLGR5(+)細胞を認めた。膜型ER(mER)を発現する腫瘍細胞はホルモン受容体陽性乳癌患者の胸水や血液にも認められた。血中mER細胞は一次内分泌療法前の効果予測に有用で、その数は内分泌療法の治療効果と相関していた。LGR5は乳癌幹細胞マーカーであることを証明できなかったが、治療抵抗性との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移・再発ホルモン受容体陽性乳癌における血中mERの検出は、一次治療として副作用の少ない内分泌療法を選択できることを示しており、患者に負担の少ないリキッドバイオプシーが転移部位の生検に代わる可能性がある。LGR5(+)細胞が乳癌幹細胞の可能性を示唆する状況証拠はあるものの、LGR5(-)細胞からも誘導される可能性が示唆された。癌幹細胞仮説を柔軟に取り入れて研究を進めることが腫瘍生物学の理解に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To develop the breast cancer stem cell-targeted therapy, we first examined the expressions of LGR5, one of mammary stem cell markers, and estrogen receptor (ER), a target of hormone therapy, in breast cancer tissues. Although ER was expressed in the nucleus of LGR5(-), not LGR5(+), tumor cells at the tumor cluster site, there were LGR5(+) tumor cells with membrane-localized ERs (mERs) at the stromal site. The mER-expressing tumor cells were also detected in the pleural effusion and the blood of hormone receptor-positive breast cancer patients. The detection of mER cells in patients' blood was useful for prediction of the efficacy of the first hormone therapy, and changes of their numbers were correlated with therapy response. We found that LGR5(+) cells finally increased in a case of resistance to the therapy. Thus, although we could not demonstrate that LGR5 was a breast cancer stem cell marker, it may be related with therapy resistance.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：乳癌 膜型エストロゲン受容体 癌幹細胞 血液循環腫瘍細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの分子生物学的な解明が大きく進む中で、いまだに転移はがんによる死亡率の90%以上の原因となっている。乳癌患者においては手術や放射線療法、化学療法による完全寛解後の転移・再発が臨床上問題となる。癌幹細胞 (Cancer stem cell) はheterogeneousな腫瘍細胞集団の中に少数存在し、腫瘍形成や転移の起源であることが最近わかっている。原発巣から分離された癌幹細胞は血管に侵入し、転移臓器に着床するとそこから腫瘍を増殖させる。転移先に潜伏した癌幹細胞は治療抵抗性であるため、術後の化学療法や放射線療法にも関わらず再発すると考えられている。そこで我々は一次治療前の採血によって血中の乳癌幹細胞を検出し、その治療標的分子を同定することで、将来の乳癌転移予測と再発予防のための適切な治療薬選択が可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

LGR5はR-spondinをリガンドとしてWntシグナルを活性化する受容体で、腸管上皮だけでなく正常乳腺の幹細胞マーカーでもある。当院で樹立した乳癌のPatient-Derived Xenograft (PDX) マウスモデルの肺転移において、2個以上の細胞から成る転移巣では必ずLGR5(+)細胞が存在していた。これはLGR5(+)細胞が癌幹細胞の機能のうち転移開始能を持つ可能性を示唆する。そこで乳癌幹細胞マーカー候補としてLGR5に注目し、癌幹細胞の特性を示すか評価した。さらに乳癌患者の血中LGR5(+)細胞を解析し、標的となりうる分子の解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) 早期乳癌及び転移・再発乳癌患者の血中腫瘍細胞(CTC)の蛍光免疫染色を行い、血中LGR5(+)細胞をカウントした。そのうちの1例は、術前化学療法後のCTCと手術検体におけるLGR5(+)細胞も解析した。
- (2) HER2陽性及び陰性乳癌患者のCTCの蛍光免疫染色を行い、血中HER2(+)LGR5(+)細胞をカウントした。そのうち1例は、抗HER2療法後のCTCも解析した。
- (3) LGR5(+)細胞が癌幹細胞であることを証明するために、PDXマウスの腫瘍からLGR5(+)細胞とLGR5(-)細胞をFlow cytometry法にて分離し、それぞれ少数の細胞を別の免疫不全マウスに移植した。腫瘍サイズを測定し、Flow cytometry法でLGR5(+)細胞の割合を解析した。
- (4) 乳癌患者の原発腫瘍、胸水細胞、CTCの蛍光免疫染色を行い、LGR5(+)細胞におけるエストロゲン受容体 (ER) の発現を解析した。治療経過とCTC数の解析も行った。

4. 研究成果

(1) 血中LGR5(+)細胞の解析

乳癌患者におけるCTCを採取したところ、LGR5(+)細胞はStage IVの患者で高率に検出された(図1)。術前化学療法前に認めた血中LGR5(+)細胞は、抗がん剤治療によって減少したが、化学療法後に手術した原発腫瘍においては、一部LGR5(+)細胞が濃縮された部分が存在した(図2)。これはLGR5(+)細胞が治療抵抗性の可能性を示唆しており、癌幹細胞の特徴に一致する。

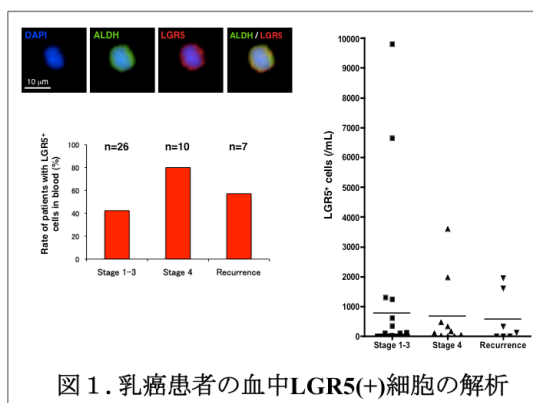


図1. 乳癌患者の血中LGR5(+)細胞の解析

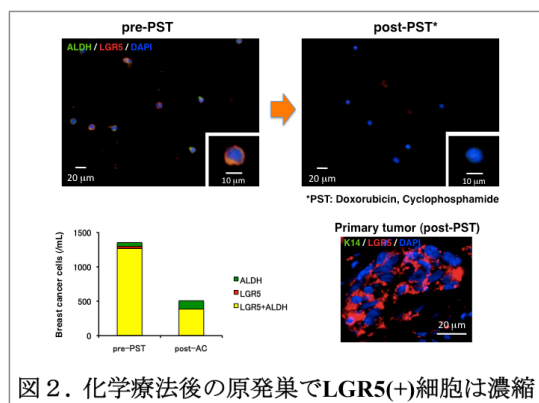


図2. 化学療法後の原発巣でLGR5(+)細胞は濃縮

(2) 血中LGR5(+)細胞はHER2を発現する

癌幹細胞を標的とする分子の探索過程で、まずLGR5(+)細胞がHER2とERを発現するか検討した。血液中でHER2を発現するLGR5(+)細胞を調べたところ、原発腫瘍がHER2 typeのときだけでなくHER2陰性のLuminal typeでも検出された(図3)。Luminal typeの原発腫瘍には、stromaにHER2(+)LGR5(+)細胞が存在する症例があり、浸潤過程でHER2を発現する可能性が示唆された。抗HER2療法により血中LGR5(+)細胞が消失したHER2 typeの症例(図4)では、原発巣がかなり縮小し、リ

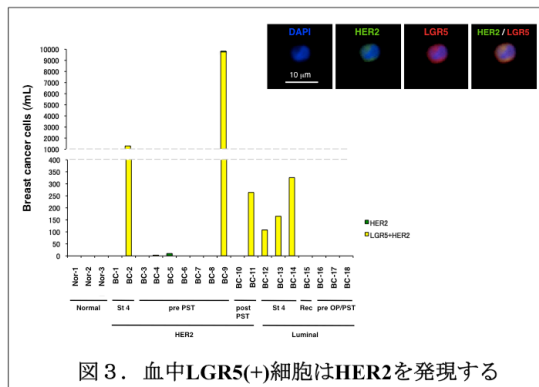


図3. 血中LGR5(+)細胞はHER2を発現する

リンパ節転移が消失した。

(3) LGR5(+)細胞は癌幹細胞ではない

LGR5(+)細胞が癌幹細胞であることを証明するために、PDXマウスの腫瘍からLGR5(+)細胞とLGR5(-)細胞をFlow cytometry法にて分離し、それぞれ少数の細胞を別の免疫不全マウスに移植した。その結果、予想と反してLGR5(-)細胞は腫瘍を形成し、しかもLGR5(+)細胞由来の腫瘍よりも増大速度が早かった(図5)。さらにLGR5(-)細胞由来の腫瘍にLGR5(+)細胞が出現していた(LGR5(+)細胞由来の腫瘍とLGR5(-)細胞由来の腫瘍では、LGR5(+)細胞の割合はほぼ同じであった)。したがって、PDXマウスの腫瘍を使ってLGR5(+)細胞が癌幹細胞の特徴としての腫瘍形成の起源であるということを証明することはできなかった。

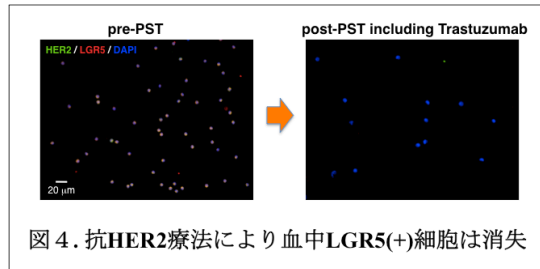


図4. 抗HER2療法により血中LGR5(+)細胞は消失

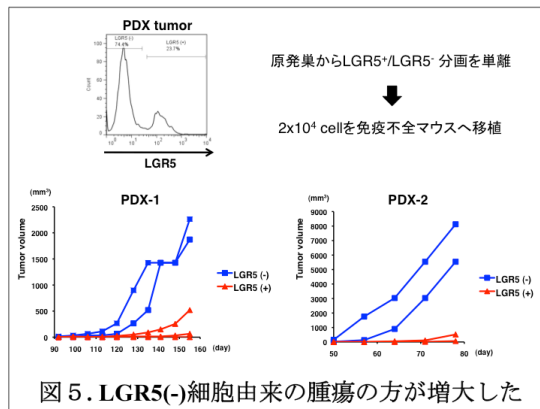


図5. LGR5(-)細胞由来の腫瘍の方が増大した

(4) 血中mER細胞の解析

ホルモン受容体 (HR) 陽性乳癌の原発腫瘍のcluster内でLGR5(+)細胞はERを発現していなかった。一方stromaにおいて、核ではなく細胞膜にERを発現するLGR5(+)細胞が存在していた(図6)。膜型ER(mER)を発現する腫瘍細胞はHR陽性乳癌患者の胸水や血液中にも認められた(図7)。乳癌患者の血中mER細胞の検出率を解析したところ、ホルモン療法感受性転移・再発乳癌の一次内分泌療法前で100%(6/6)であったのに対し、HR陽性早期乳癌の治療前で50%(3/6)、HR陰性乳癌の治療前で0%(0/5)であった。治療抵抗性再発乳癌の一次内分泌療法前の1例では検出されなかった(図8)。さらにホルモン療法の経過と血中mER細胞数の変化を7例のHR陽性転移・再発乳癌患者で検討したところ、血中mER細胞の数と治療効果は相関していた(図9)。また、ホルモン療法経過中の血中LGR5(+)細胞の増加は治療抵抗性と関連する可能性が考えられた。

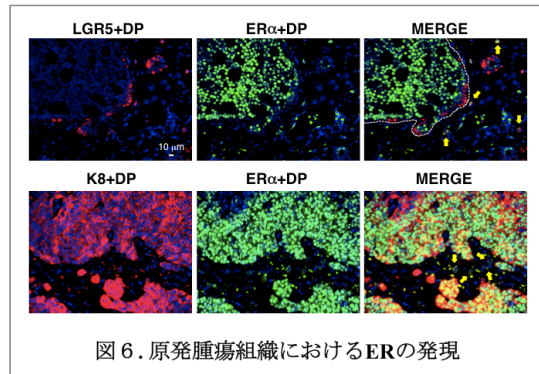


図6. 原発腫瘍組織におけるERの発現

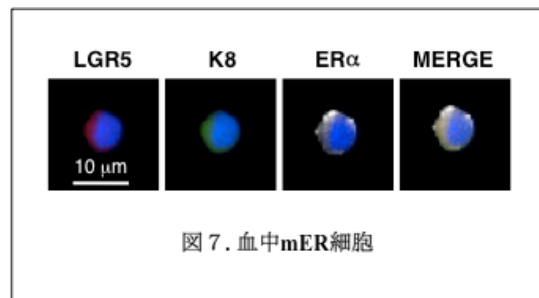


図7. 血中mER細胞

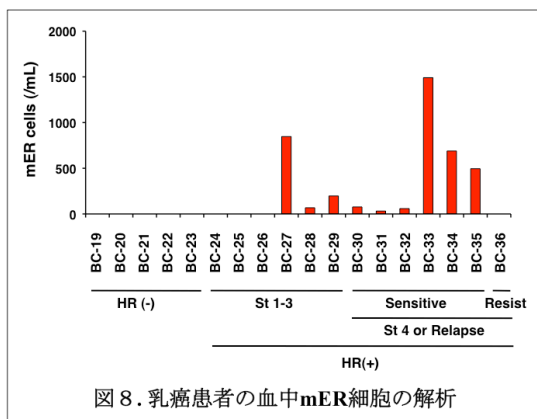


図8. 乳癌患者の血中mER細胞の解析

	mER (mL)	mER (mL)	Clinical Info
BC-33	1491 ANA	(5 w) 124 ↓	CA15-3 → (→ long SD)
BC-34	689 TAM+LHRHa	(5 w) 666 ↓	CEA ↓ PR (→ PD 12 m later)
BC-30	77 ANA	(6 m) 39 ↓	CA15-3 ↓ (→ long SD)
BC-35	495 ANA+PALBO	(3 m) 186 ↓	CA15-3 ↓ PR (→ PD 3 m later)
BC-32	59 TAM+LHRHa	(4 m) 0 ↓	PR (→ PD 17 m later)
BC-37	ANA 2	(6 m) 2 →	CEA ↓ PR (→ long SD)
BC-38	LET 3	(11 m) 333 ↑	ST439 ↑ PD

図9. ホルモン療法の経過と血中mER細胞数の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高井 健、山口 ゆり、山田 遥子、永井 成勲、坪井 美樹、久保 和之、平方 智子、戸塚 勝理、松本 広志、井上 賢一
2. 発表標題 ホルモン受容体陽性転移・再発乳癌における内分泌療法の早期効果予測：CTC vs 腫瘍マーカー
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高井 健、山口 ゆり、山田 遥子、永井 成勲、坪井 美樹、久保 和之、戸塚 勝理、林 祐二、松本 広志、井上 賢一
2. 発表標題 ホルモン受容体陽性転移・再発乳癌における血中膜型ER陽性細胞の検出と解析
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井 健、飯田 圭介、小松 恵、王 曉斐、山田 遥子、坪井 美樹、久保 和之、戸塚 勝理、林 祐二、大庭 華子、松本 広志、黒住 昌史、井上 賢一
2. 発表標題 リキッドバイオプシーによる乳癌ER/HER2判定の遠隔転移診断への応用
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永井 成勲 (Nagai Shigenori) (20458277)	埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 乳腺腫瘍内科・副部長 (82402)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	菅沼 雅美 (Suganuma Masami) (20196695)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	
連携研究者	井上 賢一 (Inoue Kenichi) (70443059)	埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・病院 乳腺腫瘍内科・部長 (82402)	
連携研究者	上條 岳彦 (Kamijo Takehiko) (90262708)	埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・臨床腫瘍研究所・研究所長 (82402)	