

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591511  
 研究課題名（和文）内分泌シグナル系と形態形成シグナル系のクロストークを応用した乳癌治療法開発  
 研究課題名（英文）Development of breast cancer therapy using crosstalk between endocrine signaling pathways and morphogenesis signaling pathways  
 研究代表者  
 小島 雅之（KOJIMA MASAYUKI）  
 九州大学・大学病院・助教  
 研究者番号：90380394

## 研究成果の概要：

乳癌では形態形成シグナル系である Hedgehog (Hh) シグナルが再活性化し、治療標的となることを報告したが、本研究において、Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 経路活性化による Shh (Hedgehog シグナルのリガンド) の発現誘導が、リガンド依存性の Hh シグナル活性化をもたらす機序を初めて報告した。両シグナルの連関は、乳癌組織においても稼動している可能性が示され、両シグナル系の連関を視野に入れた治療法開発の可能性を示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：

乳癌、Hedgehog シグナル、ER $\alpha$ 経路、Sonic hedgehog、シグナル・クロストーク、増殖抑制、治療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、「癌は一種の奇形組織であり、発癌および進展に胎生期の臓器形成を司る形態形成シグナル系が関与している」という作業仮説のもとに、癌と形態形成シグナル系再活性化の関係を解析してきた。(2) 2003年頃より、膵癌を初め複数の癌腫において形態形成シグナル系の一つである Hedgehog (Hh) シグナル系の再活性化が報告されるようになってきた。我々も 2004 年に乳癌において Hh シグナルが高率に再活性化している

こと、および治療標的となることを見出した (Kubo et al. Cancer Res 64:6071-4,2004)。

(3) 我々は、膵癌における Hh 再活性化の機序の一つに炎症性刺激による Nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) 経路が関与している可能性を初めて明らかにした (Nakashima H et al. Cancer Res 66:7041-9,2006)。(4) しかし、何故乳癌において Hh シグナルが再活性化するかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、乳癌において Hh シグナル系が再活性化する機序を明らかにし、乳癌に対する新たな治療法を開発することである。我々は、既に手術時摘出乳癌組織の病理学的検索により、Hh シグナル活性化とエストロゲンレセプター (ER) 発現に正の相関を示唆するデータを得ている。

したがって、具体的な主目的は、ER シグナル系と Hh シグナル系のクロストークを想定し、ER シグナルと Hh シグナルの関連を分子レベルで解析し、抗エストロゲン剤に耐性となった ER 陽性乳癌などに対する Hh シグナル伝達系を標的とした次世代の治療法の可能性を検討することである。

### 3. 研究の方法

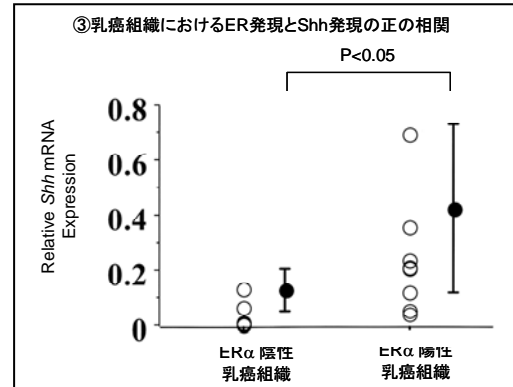
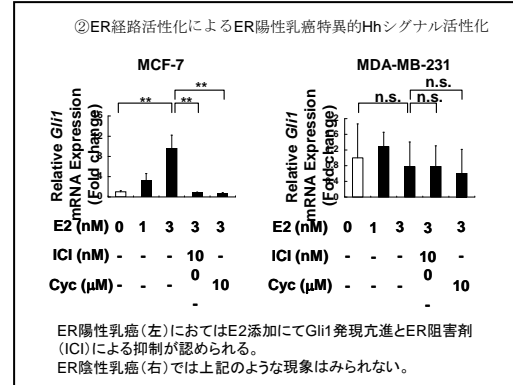
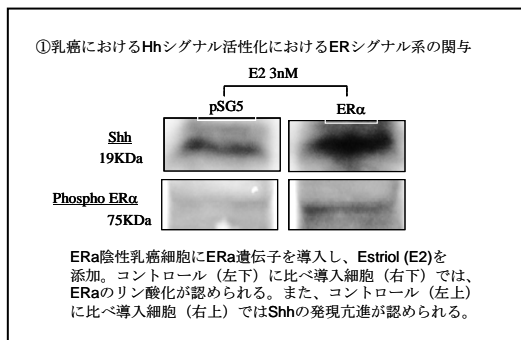
(1) 手術時摘出標本および乳癌細胞を用いて、ER 経路および Hh 経路の抑制系 (阻害剤、抗体、siRNA など) および活性化系 (遺伝子導入、活性化物質など) を応用し、両シグナル間のクロストークを解析する。

(2) 上記結果をもとに、細胞増殖を指標として治療標的となる分子群を検索し、各種乳癌細胞 (ER 陽性乳癌、ER 陰性乳癌、抗エストロゲン剤耐性乳癌、多剤耐性乳癌) に対する細胞増殖抑制効果を検討する。

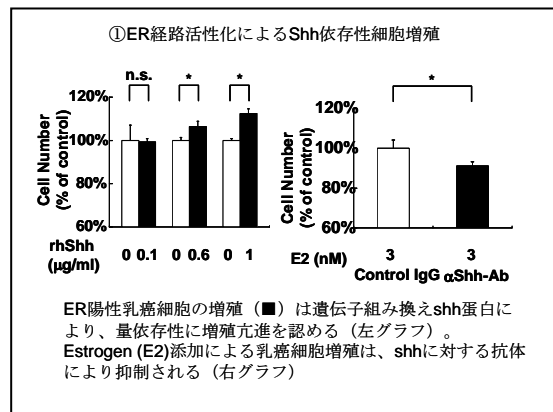
(3) 初期の乳癌と考えられる非浸潤性乳管癌 (DCIS) において両シグナル系のクロストークを検証し、発癌および乳癌予防の観点から解析する。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌における ER シグナル活性化による Hh シグナルの活性化と細胞増殖亢進: ER 陽性および陰性乳癌細胞を標的細胞とし、① ER 陽性乳癌での特異的な ER 活性化による Hh 系のリガンドである Shh の発現誘導を確認した。一方、ER シグナル抑制による Shh 発現抑制を確認し、両シグナル系の連関を明らかにした。②さらに、ER 経路の活性化による Shh 発現を介したリガンド依存性 ER 陽性乳癌細胞特異的な Hh 経路活性化を確認した。③手術時乳癌組織において両シグナルのクロストークの可能性 (mRNA レベル) を支持するデータを得た。以上の成果の詳細は論文 3 を参照。

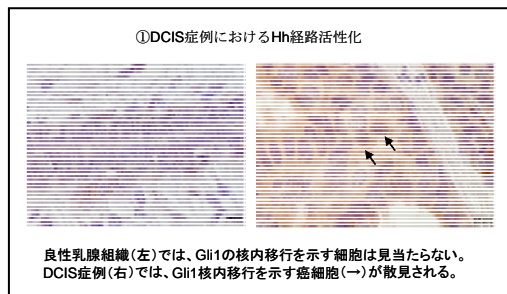


(2) ER 経路と Hh シグナルのクロストークを利用した治療法開発への基礎的成果: ①ER 陽性乳癌細胞における ER 経路活性化による細胞増殖亢進と ER 経路阻害による増殖抑制を明らかにし、ER 経路と Hh シグナル系の連関を視野に入れた治療法開発の可能性を示した。②低重力培養装置を応用し手術時採取乳癌組織を3日間培養するシステムを用いて、ER シグナル阻害剤や Hh シグナル阻害剤による細胞増殖抑制を Ki-67 染色によって確認した。



(3) 非浸潤性乳管癌 (DCIS) における ER 経路および Hh 経路の活性化解析と癌進展および予防標的としての両シグナル系の関与の検証: 手術時摘出乳腺組織 (浸潤癌 56 例、DCIS 50 例、良性病変 34 例、計 140 例) を用いて、Hh 関連分子および ER 発現を免疫組織

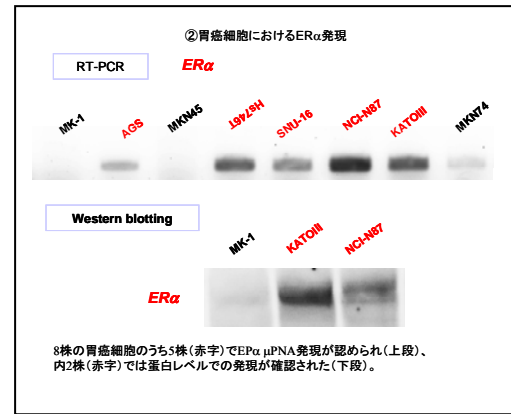
染色にて解析した。その結果、①Hh シグナル活性化 (Gli1 核内移行) は、良性病変ではほとんど認めず、浸潤癌では高率に認められた。予想通り、DCIS は両者の中間に位置しており、Hh シグナル活性化は、癌の進展と正の相関を示した。②浸潤性乳癌では ER 発現と Hh 経路活性化に正の相関が認められたが、DCIS においては両者は逆相関を認めた (学会発表 1)。この両病変における相違は現在検討中である。



(4) 浸潤性乳管癌の乳管内進展部 (Intraductal component: IDC) における両シグナル系の解析: 部分的浸潤を伴う微小浸潤性乳管癌症例を用いて、浸潤部と非浸潤部の両シグナル系の発現解析を実施中である。①免疫組織染色の結果では、浸潤部での Hh 経路活性化の増強を示唆する結果を得ている。②現在、定性的、定量的比較を可能にするため micro-dissection 法による解析、および③蛍光免疫組織染色による解析を開始した。

(5) Hh シグナル抑制のための抗体作成: 新たな乳癌治療および乳癌予防のため、Hh 受容体 Patched1 のペプチドに対する抗体を作成した (論文 4)。本抗体は、Hh シグナル活性化を抑制し、乳癌細胞および膵癌細胞の増殖を抑制した。

(6) その他の重要な成果: ①Hh 活性化が乳癌の増殖促進に加え浸潤能亢進にも関与していること (論文 2)、および同様のシグナル系のクロストークが ERα 陽性胃癌においても認められることが細胞株および胃癌組織レベルで明らかになりつつある (学会発表 2)。この成果は、内分泌経路と形態形成シグナル経路の連関に焦点を当てた新たな治療法開発の可能性へと進展している。



## 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 4 件)

(1) Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N, Kuroki S, Tanaka M, Katano M: The hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res*, In press. 査読あり

(2) Kameda C, Tanaka H, Yamasaki A, Nakamura M, Koga K, Sato N, Kubo M, Tanaka M, Katano M: The hedgehog pathway is a possible therapeutic target for patients with estrogen receptor-negative breast cancer. *Anticancer Res* 29:871-880, 2009 査読あり

(3) Koga K, Nakamura M, Nakashima H, Akiyoshi T, Kubo M, Sato N, Kuroki S, Nomura M, Tanaka M, Katano M: Novel link between estrogen receptor alpha and hedgehog pathway in breast cancer. *Anticancer Res* 28:731-740, 2008 査読あり

(4) Nakamura M, Kubo M, Yanai K, Mikami Y, Ikebe M, Nagai S, Yamaguchi K, Tanaka M, Katano M: Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation. *Anticancer Res* 27:3743-3748, 2007 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

(1) 宗崎正恵: 非浸潤性乳管癌 (DCIS) の浸潤癌への進展: Hedgehog (Hh) シグナル系の関与と乳癌治療への応用。第 109 回日本外科学会総会、2009 年 4 月 4 日 (サージカルフォーラム)、福岡国際会議場

(2) 亀田千津: 胃癌における Estrogen receptor alpha (ER alpha) の治療標的とし

ての新たな可能性：ER シグナル経路と Hedgehog 経路のクロストーク。2009年4月4日（サージカルフォーラム）、福岡国際会議場

(3) Tanaka H: Development of novel breast cancer stem cell therapy targeting hedgehog signaling pathway. The 11<sup>th</sup> St. Gallen Breast Cancer Conference, 2009, 3. 12, 2009

(4) 田中晴生：腫瘍幹細胞を標的とした乳癌治療法の開発。第21回日本バイオセラピー学会総会（ワークショップ）、2008年11月18日、東京ドームホテル

(5) 亀田千津：ER陰性およびTriple negative 乳癌に対する新たな治療標的：Hedgehog シグナル。第109回日本外科学会総会、2008年5月15日（サージカルフォーラム）、長崎ブリックホール

(6) 古賀健一郎：乳癌における内分泌系シグナル系（ER シグナル）と形態形成シグナル系（Hedgehog シグナル）のクロストーク：新規治療法開発への応用。平成19年度21COE若手研究者成果発表会、九州大学コラボステーション I

(7) Katano M: Morphogenesis signaling and cancer. 九州大学21COE国際シンポジウム、2007年11月6日、九州大学コラボステーション I

(8) 古賀健一郎：Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 陽性乳癌におけるER $\alpha$ とHedgehog経路の連関。第20回日本バイオセラピー学会総会（ワークショップ）、2007年10月11日、札幌プリンスホテル

(9) 片野光男：形態形成シグナルと癌。第20回日本バイオセラピー学会総会（特別講演）、2007年10月11日、札幌プリンスホテル

(10) 田中晴生：腫瘍幹細胞（cancer stem cell）を標的とした乳癌治療法の開発。第20回日本バイオセラピー学会総会、2007年10月11日、札幌プリンスホテル

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

にて開示予定。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 雅之 (KOJIMA MASAYUKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90380394

### (2) 研究分担者

久保 真 (KUBO MAKOTO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60403961

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20423527

### (3) 連携研究者

なし