

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23900

研究課題名(和文) S100蛋白質による乳がん幹細胞の転移と潜在を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) S100 protein in metastasis and dormancy of breast cancer stem cell

研究代表者

渡辺 崇 (Watanabe, Takashi)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：10402562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はがん幹細胞が肝臓に転移巣を形成する乳がん患者由来の腫瘍異種移植(PDX)マウスモデルを確立し、肝臓に転移したがん幹細胞でS100A10の発現レベルが原発巣よりも高いことを見出した。S100A10がマトリックスメタロプロテアーゼ活性やがん幹細胞関連遺伝子の発現レベルを制御し、乳がん細胞のS100A10発現量とin vitroでの浸潤能力や3次元オルガノイド形成能力には相関関係があることを明らかにした。また、S100A10の遺伝子発現を抑制すると、乳がん細胞の生体内での肝臓への転移能力が著しく低下した。S100A10は乳がん幹細胞の転移促進因子として機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はS100A10が転移がん幹細胞で特異的に発現し、転移の超早期段階から発現していることを見出し、S100A10がどのように転移がん幹細胞の性質や転移能を調節しているか明らかにした。本研究は転移乳がん細胞の「がん幹細胞」としての性質の維持と「超早期」の転移巣での生存を制御する分子機構を解明した点で学術的意義が大きい。また、公共データベースでの解析によりS100A10の発現レベルと全生存期間との関係には負の相関が認められるため、原発巣でのS100A10の発現が予後を規定する因子、病理診断マーカーとなる可能性がある。今後、本研究成果を元に応用研究が進むことを期待している。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells with cancer stem cell (CSC) properties drive initiation and growth of metastases at distant sites. We have established the breast cancer patient-derived tumor xenograft (PDX) mouse model in which CSC marker CD44+ cancer cells formed spontaneous microscopic metastases in the liver. In this PDX mouse, the expression levels of S100A10 was much higher in the CD44+ cancer cells metastasized to the liver. Knockdown of S100A10 in breast cancer cells suppressed and overexpression of S100A10 in breast cancer PDX cells enhanced their invasion abilities and 3D organoid formation capacities in vitro. Mechanistically, S100A10 regulated the matrix metalloproteinase activity and the expression levels of stem cell-related genes. Finally, knockdown of S100A10 significantly reduced their metastatic ability to the liver in vivo. These findings suggest that S100A10 functions as a metastasis promoter of breast CSCs by conferring both invasion ability and CSC properties in breast cancers.

研究分野：生化学

キーワード：がん幹細胞 乳がん S100A10 肝転移

1. 研究開始当初の背景

乳がんは女性に最も多いがんであり、その罹患者数も世界レベルで顕著に増加している。治療成績の向上にも関わらず、依然転移・再発乳がんは治癒が困難であり、化学療法を行った後の10年生存率も約5%と低い(Greenberg et al J Clin Oncol 1996, Rahman et al Cancer 1999)。そのため、乳がんの転移・再発に対して有効な治療法を見出すことは乳がん克服の鍵である。がんの転移や再発には、腫瘍中に存在するがん幹細胞が関与すると考えられている(Beck and Blanpain Nat Rev Cancer 2013)。がん幹細胞は自己複製能と多分化能、強い造腫瘍性、治療抵抗性といった特徴を有し、細胞周期の抑制と高い抗アポトーシス能で長い期間に渡って休眠状態で体内に潜伏する。乳がん治療終了時にがん幹細胞が少量残存すると、数年あるいは数十年後にそのがん幹細胞が再発巣あるいは転移巣として腫瘍組織を再び形成すると考えられている(Aguirre-Ghiso Nature Rev Cancer 2014)。しかし、乳がん幹細胞が転移臓器に入り込み定着する、転移の「超早期段階」に関わる分子機構は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、転移乳がん幹細胞に強く発現するS100に着目し、S100によるがん幹細胞の肝転移と肝臓での潜伏を制御する分子機構を解明することを目的とした。また、S100が乳がん予後を規定する分子マーカーや創薬ターゲットとなるか否か基盤となる情報を取得することも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、乳がん幹細胞が肝臓に転移し、潜伏していく過程でのS100の働きに焦点を絞り、以下の5点の研究を行った。

(1) 乳がん患者由来の腫瘍異種移植マウスモデルにおいて原発巣、転移巣のがん幹細胞を特徴づける遺伝子群をマイクロアレイによって同定した。

(2) S100A10の細胞内ターゲットとそのパスウェイを、DNAマイクロアレイを用いた発現解析で同定した。

(3) S100A10の過剰発現や発現抑制が、がん幹細胞の性状(オルガノイド形成能、細胞周期や幹細胞マーカーの発現量、抗アポトーシス能)、浸潤能に与える影響を検討した。

(4) 異種移植マウスモデルを使った転移、潜伏モデルにおいてS100の発現抑制が肝臓への転移に与える影響を検討した。

(5) 乳がん患者の組織や公共データベースを用いてS100の発現量を解析し、予後との関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 肝臓に転移する乳がん幹細胞を特徴づける遺伝子群の同定

乳がん患者由来の腫瘍異種移植マウスモデルを作製し、乳がんが肝臓に自然転移し、マイクロ転移巣を形成するモデルを樹立した。この系において、乳腺近傍(原発巣)と肝臓(転移巣)からがん幹細胞マーカーCD44陽性細胞を純化し、遺伝子発現の差異をDNAマイクロアレイにより解析した。その結果、S100A10を始めとするいくつかのS100ファミリーメンバーが転移がん幹細胞で強く発現していることが明らかになった(図1)。

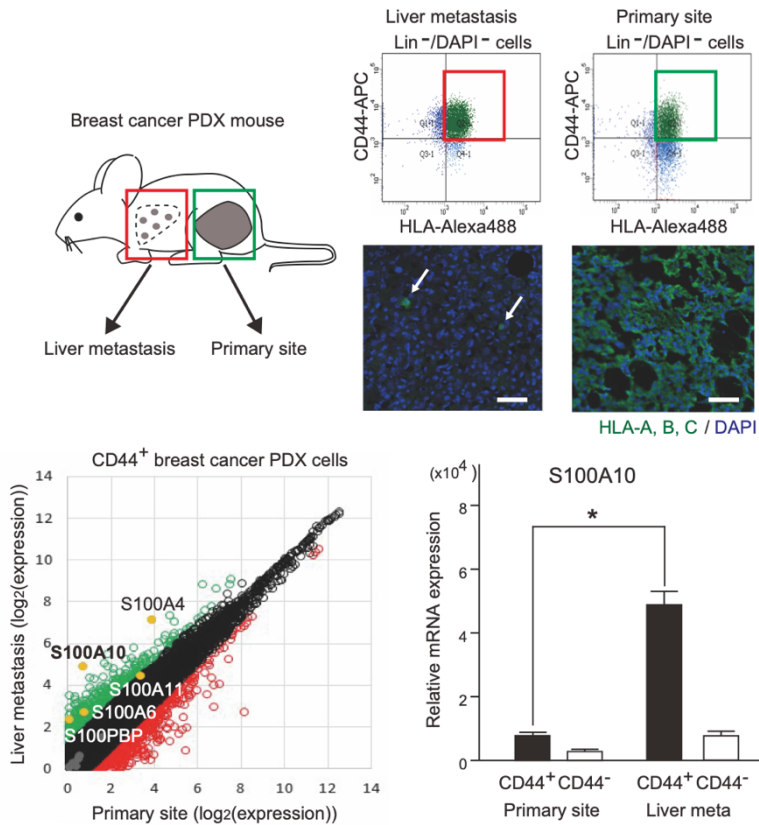


図1 乳がん患者異種移植モデルとS100A10遺伝子発現

原発巣あるいは転移先である肝臓からCD44陽性がん幹細胞をセルソーターで純化し、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現を比較した。肝臓に転移するがん幹細胞でS100A10の遺伝子発現が高いことが明らかになった。

(2) S100A10が制御するターゲット、パスウェイの解析

乳がん細胞株MDA-MB-231を用いてS100A10の発現を抑制した細胞株を作製し、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。Gene set enrichment analysisにより、S100A10の発現と、がん幹細胞性や細胞浸潤を制御する遺伝子群の発現との間に正の相関関係があることが明らかになった。この相関関係は、乳がん患者由来の腫瘍異種移植マウスモデルから純化した原発巣と、転移巣のCD44陽性がん幹細胞間の比較でも認められた(図2)。このことから、S100A10はがん幹細胞性と細胞の遊走や浸潤に関連する遺伝子をターゲットとしていることが示唆された。

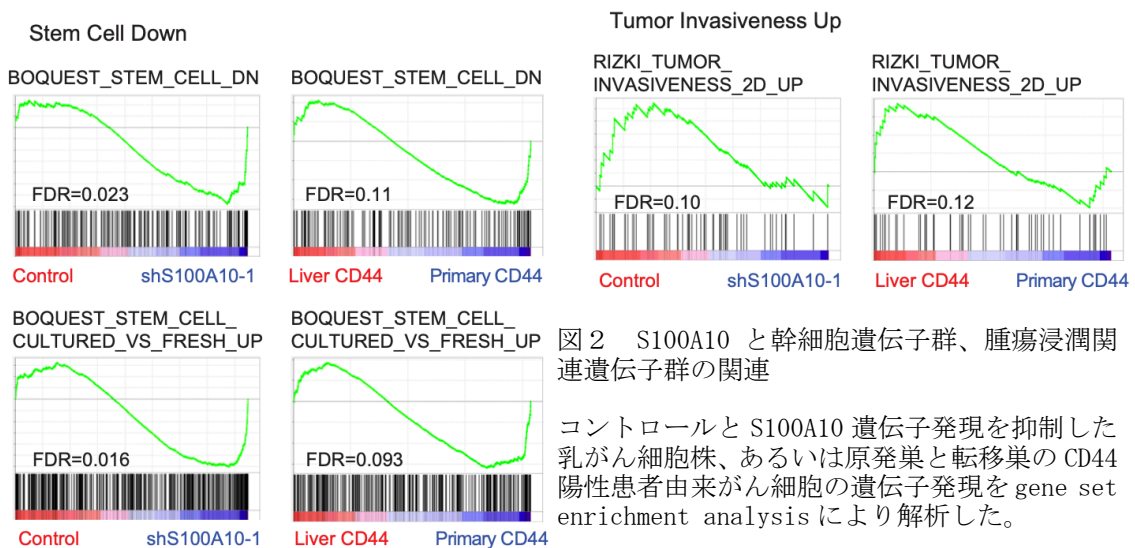


図2 S100A10と幹細胞遺伝子群、腫瘍浸潤関連遺伝子群の関連

コントロールとS100A10遺伝子発現を抑制した乳がん細胞株、あるいは原発巣と転移巣のCD44陽性患者由来がん細胞の遺伝子発現をgene set enrichment analysisにより解析した。

(3) S100A10による幹細胞能、細胞浸潤能の制御

患者由来細胞とMDA-MB-231細胞株を用いて、細胞増殖能、細胞周期の進行、オルガノイド形成能、抗アポトーシス能、がん幹細胞マーカー発現レベルを解析した。その結果、MDA-MB-231細胞

胞のコントロール群に比較して S100A10 の発現を抑制した細胞群は、オルガノイド形成能が减弱していた。患者由来の細胞では S100A10 の過剰発現によりオルガノイド形成能が亢進すること、Oct4 や Nanog などの幹細胞マーカーの遺伝子発現が上昇することも見出した。細胞浸潤能への影響を解析したところ、MDA-MB-231 細胞で S100A10 の発現を抑制すると、マトリックスメタロプロテアーゼの活性が減少し、細胞浸潤能が减弱することが明らかになった。また、患者由来の細胞では S100A10 の過剰発現により浸潤能が上昇した (図 3)。一方、細胞増殖能、細胞周期の進行、抗アポトーシス能には顕著な影響が認められなかった。オルガノイド形成能は癌幹細胞性を反映していることから、これらの結果は S100A10 ががん幹細胞性を制御し、またマトリックスメタロプロテアーゼの活性を調節することで細胞浸潤能に関与することを示唆している。

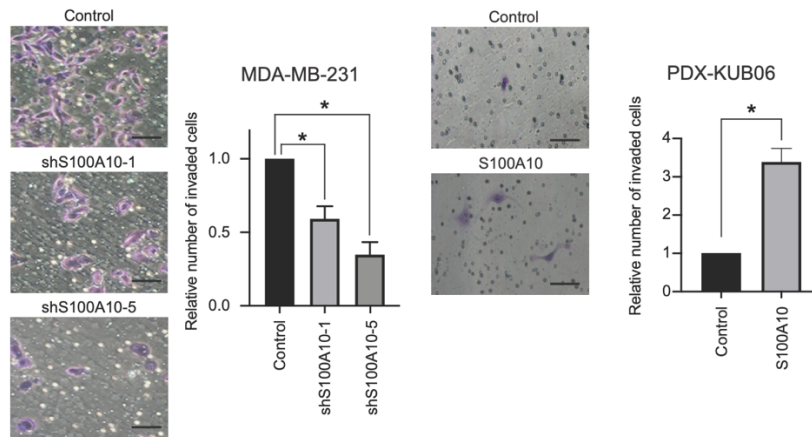


図 3 S100A10 による細胞浸潤能の制御

乳がん細胞株 MDA-MB-231 では S100A10 遺伝子発現抑制により細胞浸潤能が减弱するのに対し、患者由来乳がん細胞 (KUB06) では S100A10 の過剰発現により浸潤能が亢進する。

(4) 移植モデルにおける乳がん転移における S100A10 の機能解析

生体内における S100A10 の働きを明らかにするため、作製した S100A10 発現抑制乳がん細胞株 MDA-MB-231 を高度免疫不全マウスの皮下乳腺に移植し、乳がん形成能および転移能を生体内で解析した。原発巣の乳がん形成能はコントロール群と S100A10 発現抑制群において差がなかったが、肝転移巣の数はコントロール群に比較して S100A10 発現抑制群において有意に減少していた (図 4)。また、転移巣において増殖マーカー Ki67 陽性細胞の数も、S100A10 の遺伝子発現により減少することが明らかになった。このことより、S100A10 発現抑制により肝臓への遠隔転移能と転移後の増殖能が减弱することが明らかとなった。

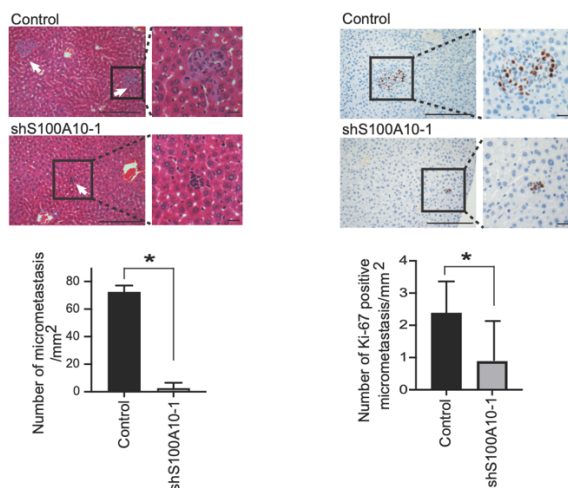


図 4 S100A10 による乳がん転移能の制御

コントロールあるいは S100A10 の発現を抑制した乳がん細胞株 MDA-MB-231 を高度免疫不全マウスの皮下に移植し、肝臓への転移を検討した。S100A10 遺伝子発現を抑制することで、肝臓への転移が减弱することが明らかになった。

(5) 乳がんにおける S100A10 発現レベル

公共データベース (GENT2 GPL-96 platform [HG-U133A]) を用いて、通常組織と乳がん組織で

S100A10 の発現量を比較したところ、優位に乳がん組織で S100A10 の発現レベルが上昇していることが明らかになった。さらに、同データベースで S100A10 発現レベルと予後との関係を解析したところ、S100A10 の発現レベルが高いと予後が不良であることが明らかになった。

以上より、S100A10 は乳がん幹細胞の浸潤能と幹細胞性を調節し、がん幹細胞の転移を制御する新規がん幹細胞制御因子であることが示唆された。

〈引用文献〉

1. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 14, 611-622, 2014.
2. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 13, 727-738, 2013.
3. Rahman ZU, Frye DK, Smith TL, Asmar L, Theriault RL, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Results and long term follow-up for 1581 patients with metastatic breast carcinoma treated with standard dose doxorubicin-containing chemotherapy: a reference. *Cancer* 85, 104-111, 1999.
4. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 2197-2205, 1996.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yanagi Hisano, Watanabe Takashi, Nishimura Tatsunori, Hayashi Takanori, Kono Seishi, Tsuchida Hitomi, Hirata Munetsugu, Kijima Yuko, Takao Shintaro, Okada Seiji, Suzuki Motoshi, Imaizumi Kazuyoshi, Kawada Kenji, Minami Hironobu, Gotoh Noriko, Shimono Yohei	4. 巻 111
2. 論文標題 Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4359 ~ 4370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mukohyama Junko, Isobe Taichi, Hu Qingjiang, Hayashi Takanori, Watanabe Takashi, Maeda Masao, Yanagi Hisano, Qian Xin, Yamashita Kimihiro, Minami Hironobu, Mimori Koshi, Sahoo Debashis, Kakeji Yoshihiro, Suzuki Akira, Dalerba Piero, Shimono Yohei	4. 巻 79
2. 論文標題 miR-221 Targets QKI to Enhance the Tumorigenic Capacity of Human Colorectal Cancer Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5151 ~ 5158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-3544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳久乃
2. 発表標題 転移乳がん幹細胞におけるS100A10の発現上昇
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺崇
2. 発表標題 Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells.
3. 学会等名 藤田医学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------