

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07619

研究課題名(和文) 乳がん骨転移の潜在期において骨微小環境でがん細胞が生存するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Survival mechanism of breast cancer cells in the bone microenvironment at the latent stage of bone metastasis

研究代表者

二口 充 (Futakuchi, Mitsuru)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：60275120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨および皮下微小環境において乳がんが増殖する領域をin vivoで作成し、それぞれの領域由来のがん幹細胞のprimary cultureを単離できた。Microarrayにより遺伝子発現を検索し骨微小環境由来のがん幹細胞に特異的なマーカーとして、STAT3を同定した。STAT3のsiRNAを乳がん細胞に導入し、親株、Mock株、siRNA導入株(2種)を作成した。これらの細胞を用いて、in vivoにおいてsiRNA導入株が骨微小環境で増殖する場合は骨微小環境に特異的ながん幹細胞の数が減少することを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、1)骨微小環境に特異的なCSCに発現する因子を同定すること、同定された因子の機能を解析し治療抵抗性への関与を検索することで、2)皮下微小環境のCSCが骨微小環境のCSCと変化し治療抵抗性を示すメカニズムの解析をした。本研究は、微小環境に特異的ながん幹細胞のprimary cultureを単離し、独自に開発した動物モデルで治療抵抗性への関与を明らかにする独創的な研究である。本研究の成果に基づき、骨微小環境に潜むがん幹細胞(顕在化前の微小骨転移)を検出が可能となり、原発巣治療後の再発および転移を防ぐ治療法を創造することができる。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor-beta (TGF-beta) plays a key role in bone metastasis formation; we hypothesized the possible involvement of TGF-beta in the induction of cancer stem cells (CSCs) in the bone microenvironment (micro-E), which may be responsible for chemo-resistance. We found treatment with R1-Ki decreased tumor volume and cell proliferation in the bone micro-E. The number of cells positive for the CSC markers, SOX2, and CD166 in the bone micro-E, were significantly higher than those in the subQ micro-E. R1-Ki treatment significantly decreased the number of CSC marker positive cells in the bone micro-E but not in the subQ micro-E. Our results indicated that the bone micro-E is a key niche for CSC generation, and TGF-beta signaling has important roles in generating CSCs and tumor cell proliferation in the bone micro-E.

研究分野：がんの微小環境

キーワード：骨微小環境 乳がん 骨転移 がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国の女性に罹患率の高い乳がんは、原発巣に対して治療効果をあげている。しかし原発巣治療後に脊椎や骨盤などに高率に発生する骨転移巣は、従来の治療法に抵抗性を示すため、骨転移巣の治療抵抗性を関与する因子の同定は急務である。

近年がん幹細胞仮説が提唱され、大腸がん、膵がん、乳がん、前立腺がんなど様々ながんにおいて、がん幹細胞マーカーがそれぞれ同定されている。細胞周期を標的とした抗がん剤は、増殖が盛んながん細胞には有効であるが、がん幹細胞は増殖が遅く顕著な効果を示さないため、抗がん剤の治療抵抗性にはがん幹細胞が関与することが示唆されている。

我々は、骨転移巣の進展に重要な役割を果たす骨微小環境における腫瘍間質相互作用のメカニズムを解析できる動物モデルを独自に開発し、骨微小環境はがん幹細胞の niche であり TGF β が重要な役割を果たすことを明らかにした (Futakuchi et al., ADDR, 2016)。さらに、予備実験において抗がん剤 Docetaxel (Dox) 抵抗性とがん幹細胞の関連を検索した結果、同じ前立腺癌組織を移植しても、皮下微小環境で増殖する前立腺がんに対して DOX は有効であったが、骨微小環境で増殖する前立腺癌に対しては抵抗性を示した。

乳がんの原発巣においてもがん幹細胞は存在する。このため原発巣の CSC は骨微小環境に比べて数が少ないものの治療抵抗性を示すと考えられる。そこで我々は、原発巣のがん幹細胞が骨微小環境に転移し、形質が異なるがん幹細胞へと変化した結果、治療抵抗性を示すと仮説を立てた。

2. 研究の目的

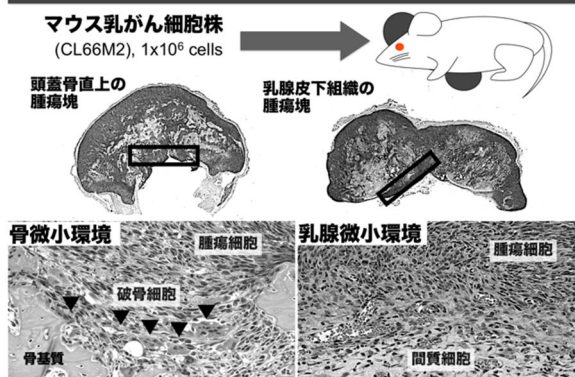
本研究の目的は、骨微小環境および皮下微小環境からそれぞれ CSC を取り出し、遺伝子レベルでその違いを比較することで、1) 骨微小環境に特異的な CSC に発現する因子を同定すること、同定された因子の機能を解析し治療抵抗性への関与を検索することで、2) 皮下微小環境の CSC が骨微小環境の CSC と変化し治療抵抗性を示すメカニズムの解析を目的とする。本研究は、微小環境に特異的ながん幹細胞の primary culture を単離し、独自に開発した動物モデルで治療抵抗性への関与を明らかにする独創的な研究である。本研究の成果に基づき、骨微小環境に潜むがん幹細胞 (顕在化前の微小骨転移) を検出が可能となり、原発巣治療後の再発・転移を防ぐ治療法を創造することができる。

3. 研究の方法

Ex.1 骨および乳腺微小環境において乳がんが増殖する領域の作成

Balb C マウス由来の乳癌細胞株である CL66M2 を用いる。この CL66M2 を 12 匹の BalbC 雌マウスの乳腺皮下および頭蓋骨直上にそれぞれ 1.0×10^6 個移植する。増殖した腫瘍と頭蓋骨が接する部分では、破骨細胞が誘導され強い溶骨性変化を伴い腫瘍細胞が増殖する組織像を呈し、ヒトの乳がん骨転移巣と同じ組織像が観察でき(骨微小環境)、乳腺皮下に移植した領域ではマウス乳がん組織のみが増殖する組織像(乳腺微小環境)が観察される。移植後 30 日で屠殺剖検し骨および皮下微小環境を含めた腫瘍塊をそ

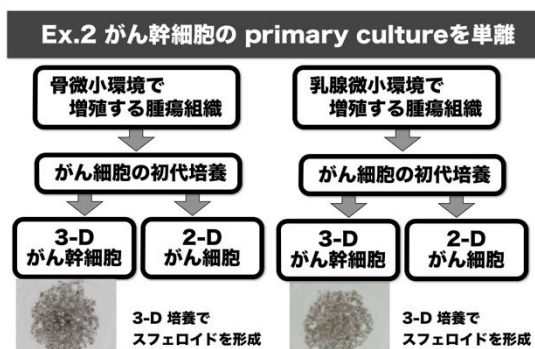
Ex.1 骨および皮下微小環境において乳がんが増殖する領域の作成



それぞれ半割し、半分は病理組織標本の作成にもう一方は初代培養細胞の作成に用いる。

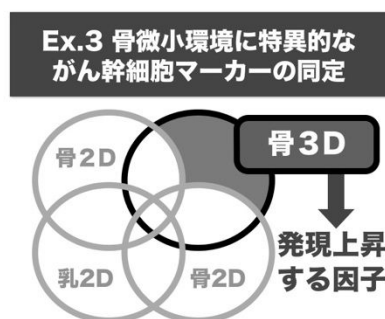
Ex.2 それぞれの微小環境由来のがん幹細胞の primary culture を単離

Ex.1)で作成した領域から切出した組織片をコラゲナーゼ処理して single cell を作成し、培養プレート上に 30 分培養した後非接着細胞を回収する。3D culture (96 well) で 72 時間培養し spheroid を形成したがん細胞をがん幹細胞として回収する(骨 3D, 乳 3D)。2D 96well plate で 72 時間培養したがん細胞を対照として回収する。それぞれの細胞から RNA を抽出する(骨 2D, 乳 2D)。



Ex.3 骨微小環境由来のがん幹細胞に特異的なマーカーの同定

骨微小環境由来のがん幹細胞に特異的なマーカー遺伝子は、骨微小環境由来のがん幹細胞で発現が上昇しており、他のがん細胞では発現が見られないと考えられる。Ex.2 で得られたサンプルを用いて東レ microarray により遺伝子発現を検索する。骨 3D, 骨 2D, 乳 3D, 乳 2D のうち、骨 3D でのみ発現上昇がある遺伝子を骨微小環境由来のがん幹細胞に特異的なマーカー遺伝子候補とする。



Ex.4 骨微小環境由来のがん幹細胞に特異的なマーカーであることの検証

マーカー候補遺伝子の siRNA を作成し、Neon transfection system(エレクトロポレーション)で乳がん細胞に導入する。Ex.1 と同じ方法で、親株、Mock 株、siRNA 導入株(2種)が、それぞれ骨および皮下微小環境で増殖する組織を作成する。さらに Ex.2 と同じ方法で、それぞれの領域からがん幹細胞を単離する。mRNA を抽出し定量 RT-PCR により発現量を検索し、骨微小環境に特異的ながん幹細胞の数を評価する。Mock 株が増殖する場合は骨微小環境由来のがん幹細胞が多く、siRNA 導入株では、骨微小環境由来のがん幹細胞の数がほとんどないことを確認する。

Ex.5 骨微小環境に特異的ながん幹細胞が治療抵抗性に関与することの検証

Ex.4 で作成した、親株、Mock 株、siRNA 導入株(2種)を用いる。骨微小環境に特異的ながん幹細胞の数が多い状態では(Mock 株)、壊死巣の割合が対照群(親株)と変わらず、治療抵抗性を呈する。骨微小環境におけるがん幹細胞の数を減少させた状態では(siRNA 導入株)、壊死巣の割合が対照群(親株)に比べて、優位に増大し、治療感受性となることを示す。

動物実験での検証: Ex.1 と同じ方法を用いて細胞株1つあたり 12 匹のマウスに移植する。6 匹を無処置群とし、6 匹の抗がん剤 Docetaxel (Dox) 投与群では移植後 20 日に 20mg/kg 体重の濃度で DOX を単回投与する。移植後 30 日で屠殺剖検し、骨および皮下微小環境を含めた腫瘍塊をそれぞれ半割し、半分は病理組織標本の作成に用いる。

治療抵抗性の評価: 腫瘍組織の H.E. 標本を用いて全断面の写真を撮影する。画像解析装置を用いて腫瘍全体の面積と壊死巣の面積を測定し、壊死部分の割合 (%) を算出する。対照群に比べ有意に壊死巣の割合が増大している場合は治療感受性、対照群と変わらない場合は治療抵抗性とする。

4. 研究成果

骨および皮下微小環境において乳がんが増殖する領域を *in vivo* で作成した。さらに、それぞれの領域由来のがん幹細胞の primary culture を単離できた。Microarray により遺伝子発現を検索し骨微小環境由来のがん幹細胞に特異的なマーカーとして、STAT3 を同定した。STAT3 の siRNA を乳がん細胞に導入し、親株、Mock 株、siRNA 導入株(2種)を作成した。これらの細胞を用いて、*in vivo* において siRNA 導入株が骨微小環境で増殖する場合は骨微小環境に特異的ながん幹細胞の数が減少することを確認できた。

現在、骨微小環境におけるがん幹細胞の数を減少させた状態では (siRNA 導入株) 壊死巣の割合が対照群 (親株) に比べて有意に増大し、治療感受性となることを示す目的で研究を継続中である。

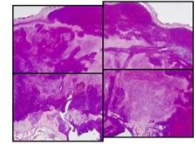
Ex.5 治療抵抗性の評価 (予備実験)

治療が有効ならば

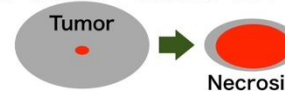
1) 腫瘍の体積が減少



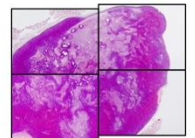
骨微小環境にて増殖する腫瘍



2) 腫瘍内の壊死巣が増大



皮下微小環境にて増殖する腫瘍



壊死巣の割合を定量的に評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawano Hiroaki, Kudo Takashi, Umeda Masataka, Futakuchi Mitsuru, Sueyoshi Eijun, Maemura Koji	4. 巻 85
2. 論文標題 Myocardial Damage and Microvasculopathy in a Patient With Systemic Sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 224 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-1133	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 Ohe Rintaro, Yang Suran, Yamashita Daisuke, Ichikawa Chihiro, Saito Akihisa, Kabasawa Takanobu, Utsunomiya Aya, Aung Naing Ye, Urano Yuka, Kitaoka Takumi, Suzuki Kazushi, Takahara Daiichiro, Sasaki Akiko, Takakubo Yuya, Takagi Michiaki, Yamakawa Mitsunori, Futakuchi Mitsuru	4. 巻 72
2. 論文標題 Pathogenesis of follicular thymic hyperplasia associated with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 252 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kentaro Furukawa 1, Hiroaki Kawano 1, Mitsuru Futakuchi 2, Mitsuaki Ishijima 1, Yuki Yangataga 1, Yuki Ueno 1, Seiji Koga 1, Satoshi Ikeda 1, Kiyohiko Eishi 3, Koji Maemura 1	4. 巻 71
2. 論文標題 Pulmonary atherosclerosis in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 164-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuxuan Han, Jun Nakayama, Yusuke Hayashi, Seongmoon Jeong, Mitsuru Futakuchi, Emi Ito, Shinya Watanabe, Kentaro Semba	4. 巻 25
2. 論文標題 Establishment and characterization of highly osteolytic luminal breast cancer cell lines by intracaudal arterial injection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 111-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12743	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大江倫太郎, 樺澤崇允, 二口 充
2. 発表標題 Establishment of Predicting Druggable Genes by Using Micro-specimens.
3. 学会等名 The 30th Meeting of the Japanese Association for Metastasis Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江倫太郎, 樺澤崇允, 二口 充
2. 発表標題 Establishment of Predicting Druggable Genes by Using Micro-specimens in gastric and colorectal cancers.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二口 充
2. 発表標題 病理学教室の形態学的変化と今後の展望 山形に驚いた後に起こったこと
3. 学会等名 第38回山形形態機能研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江倫太郎, 福田瑞貴, 鈴木一司, 北岡匠, 二口 充
2. 発表標題 大腸癌における腫瘍内不均一性 Buddingの意義
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2021年度成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二口 充
2. 発表標題 病理形態解析支援活動の実際 どんなニーズにどう対応しているのか？
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 二口 充	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 317
3. 書名 マウス・ラットモデル作成・解析プロフェッショナル 第2章 4がん転移モデルとその解析法	

1. 著者名 二口 充	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 9
3. 書名 マウス・ラットモデル作成・解析プロフェッショナル	

〔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
---------	---------