

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08981

研究課題名（和文）乳癌幹細胞の薬剤感受性に基づいた新しい個別化薬剤選択システムの確立

研究課題名（英文）Establishment of a new personalized drug selection system based on drug sensitivity of breast cancer stem cells

研究代表者

角舎 学行（Kadoya, Takayuki）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：20609763

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）：48症例の乳癌組織から得られた乳癌細胞において、CD44+/CD24-の細胞の割合はスフェロイド培養前後で比較すると93%の症例で増加していた。またスフェロイド培養で得られた細胞は少数でもマウスへ生着し、移植した乳癌幹細胞は再び上皮性に分化したことから乳癌幹細胞性が証明された。48例の乳癌幹細胞では、間葉系マーカーであるTwist1、Snail、Vimentinの陽性パターンによって3つのグループに分類された。またDNA microarrayによる遺伝子発現解析を行ったところ、乳癌幹細胞は大きく二つのグループに分類された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の我々の研究の中で最もインパクトのある結果は、患者の乳癌組織から安定的に乳癌幹細胞が得られるようになったことである。それにより、乳癌幹細胞の生物学的特徴、遺伝子情報、薬剤感受性などを患者ごとに知ることができるようになり、治療戦略を立てる上で非常に有用である。次に、これまで一つのサブタイプを遡ると乳癌幹細胞は一つのタイプからなるのではと考えられていたが、我々が得た結果からは乳癌幹細胞の中には少数であるがCD44+/CD24-以外の乳癌幹細胞も存在し、ホルモン感受性、EMTマーカーの発現からも多様性があることが明らかになったことである。

研究成果の概要（英文）：The percentage of CD44+/CD24- cells in breast cancer cells obtained from 48 breast cancer tissues increased in 93% of cases before and after spheroid culture. In 48 cases, breast cancer stem cells were classified into three groups according to their positive patterns for the mesenchymal markers Twist1, Snail, and Vimentin. The 48 breast cancer stem cells were classified into three groups according to the positive patterns of mesenchymal markers Twist1, Snail, and Vimentin. Gene expression analysis by DNA microarray showed that breast cancer stem cells were classified into two major groups.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 乳癌幹細胞 遺伝子解析 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

幹細胞とは自己複製能と多分化能を有する細胞であるが、癌にも同様の機能を有する「癌幹細胞」が存在し、それを起源として癌が発生、分化していくという考えが知られている。乳癌では、細胞表面抗原が CD44+/CD24-である細胞集団が乳癌幹細胞であることがこれまでの研究で明らかになっている。しかし近年、それだけでは定義できない多様性が乳癌幹細胞にはあると考えられている。

乳癌幹細胞は少数で転移巣を形成する能力を持っており、抗癌剤や放射線への抵抗性を有しているため治療しても残存しやすく、再発・転移の原因になると考えられている。そのため、乳癌の根治を目指すための真のターゲットは乳癌幹細胞であり、その生物学的特徴、遺伝子情報、薬剤感受性などを知ることができれば、治療戦略を立てる上で非常に有用である。トリプルネガティブ乳癌やヒト上皮成長因子受容体 2 型 (HER2)陽性乳癌では、術前化学療法によって病理学的完全奏功 (pCR) が得られた症例の予後は非常に良いことがわかっている。そのため乳癌幹細胞の遺伝子情報や薬剤感受性の情報が得られれば、個々の症例で pCR が得られる最適な術前薬物療法レジメンを選択できると期待される。

患者の癌組織から癌幹細胞を選択的に培養する手段の一つとして、非接着性プレートを用いた三次元培養法 = スフェロイド培養法がある。これまでに大腸癌などでは、スフェロイド培養により癌幹細胞の選択的培養が可能となり、既に癌幹細胞ライブラリーが作製され、幹細胞の薬剤感受性従って投与した薬剤による効果的な治療成果も報告されている。しかしこれまで乳癌において患者の乳癌組織から乳癌幹細胞を多数例で安定的に選択培養した報告はなく、乳癌幹細胞の生物学的特徴や薬剤効果などは全くわかっていない。

本研究で、我々はスフェロイド培養により患者乳癌組織から安定的に乳癌幹細胞を選択培養する方法を確立し、得られた乳癌幹細胞の生物学的特徴について検討した。

2. 研究の目的

乳癌幹細胞をターゲットとした有効な治療法確立のため、患者由来の乳癌組織から乳癌幹細胞を選択的に培養する方法を確立し、免疫染色や遺伝子発現により乳癌幹細胞の多様性を検討する。

3. 研究の方法

手術で得られた未治療の ER 陽性 HER2 陰性乳癌 48 症例の乳癌組織を採取し、非接着性プレートを用いてスフェロイド培養を行う。得られた乳癌細胞について、CD44+/CD24-の細胞の割合、マウス移植における生着能、分化能を調べることにより、スフェロイド培養により得られた乳癌細胞の幹細胞性を検討した。また培養した乳癌幹細胞を用いて免疫染色や DNA microarray を行い、ER 陽性 HER2 陰性乳癌幹細胞のグループ分類や幹細胞性に関わるシグナル、分子の探索を行った。

4. 研究成果

・患者乳癌組織からのスフェロイド培養

この研究で、手術検体から乳癌幹細胞を選択培養した乳癌48症例すべてER陽性HER2陰性乳癌であり、腫瘍径はT1 3、リンパ節転移陽性症例は17例 (35.4%) だった。Day28まではスフェロイドの個数は増加していったが、それ以降はほとんど増加しなかった。回収

したスフェロイドの構成細胞は、多くの症例がGATA3陽性の乳癌細胞であったが、CD45陽性の白血球、SMA陽性の線維芽細胞も含まれていた。その割合は症例により差があり、白血球、線維芽細胞が比較的多く含まれている症例も存在した。

スフェロイド培養により得られた細胞の幹細胞性を、CD44/CD24による免疫染色で検討した。原発巣組織とスフェロイドとの比較では、CD44+/CD24-細胞の割合の平均値は原発巣13.8%、スフェロイド61.6%と有意に上昇していた。症例ごとのCD44+/CD24-細胞の割合の変化を見ると、46症例(93%)において原発巣よりもスフェロイドで増加していたが、2症例(7%)では変化がなかった。

ER陽性率の変化を検討したところ、原発巣では全例ER陽性（Allred scoreの平均値：7.2）であったが、スフェロイドではAllred scoreの平均値は2.8と減少し、25例（52%）でERが陰転化していた。症例ごとのPgR発現の変化をAllred scoreで比較すると、PgRは45例（94%）の症例で減少していたが、3症例(6%)では変化がなかった。PgRのAllred scoreの変化はERに比べて少ないが、やはりスフェロイド培養後では減少する傾向だった。

間葉系マーカー陽性率をスフェロイド培養前後で比較すると、Twist1は原発巣44% スフェロイド75%、Snailは13% 58%、Vimentinは8% 38%といずれも間葉系マーカー陽性率は上昇した。症例ごとの間葉系マーカーの発現は大きく4パターン（Twist1/Snail/Vimentin+, Twist1/Snail+, Twist1+, all negative）に分かれており、同じER陽性HER2陰性乳癌であっても乳癌幹細胞の上皮間葉転換（EMT）には差があった。

スフェロイド培養にて選択培養した乳癌幹細胞11例をNSGマウスの皮下に移植し、そのうち5例でPDSX(Patient-derived stem cell xenografts)を作成できた。11例の原発巣の臨床的特徴とPDSXの作成の可否に明らかな関係性は認めなかった。その5例において原発巣、スフェロイド、PDSXとの間でCD44+/CD24-細胞の割合を比較したところ、原発巣からスフェロイド培養することで増加したCD44+/CD24-細胞は、PDSXでは原発巣とほぼ同様の割合にまで減少した。また、ホルモンレセプター陽性細胞の割合はスフェロイドで減少しPDSXで増加したが、スフェロイド、PDSXのいずれでも陰転化した症例も1例あった。逆に、間葉系マーカーであるSnail陽性細胞の割合は、スフェロイドで増加し、PDSXでは減少した。また、原発巣から採取した乳癌細胞と、スフェロイド培養により選択培養した乳癌幹細胞をマウスに移植し増殖能を比較した。その結果、原発巣から採取した乳癌細胞をそのまま移植した場合は全く腫瘍形成を観察できなかったのに対し、スフェロイド培養により選択培養した乳癌幹細胞を移植した場合は10ポイント中3ポイントで腫瘍形成が観察された。

14例の乳癌手術検体から選択培養した乳癌幹細胞に対してDNA microarrayを行い遺伝子発現量によりクラスタリング解析を行ったところ、乳癌幹細胞は遺伝子発現パターンにより大きく二つのグループに分類された。カットオフを変えても二つのグループは変わらなかった。さらにその二つのグループを遺伝子オンロジー分析で検討したところ、両グループ間で発現が有意に異なるいくつかの遺伝子群が明らかになった。片方のグループはTNFRSF17、POU2AF1、CD79Aといった免疫応答に関与する遺伝子が多く発現しており（免疫応答群）、もう片方のグループはSELENBP1、ICA1といった蛋白質結合に関与する遺伝子が比較的多く発現（蛋白質結合群）していた。

結論

我々は、患者のスフェロイド培養により48例の患者乳癌組織から乳癌幹細胞を安定的に選択培養できることを証明した。さらにER陽性HER2陰性乳癌症例の乳癌幹細胞には、

生物学的、遺伝学的多様性があることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Amioka A, Kadoya T, Sueoka S, Kobayashi Y, Sasada S, Emi A, Masumoto N, Ito M, Nakayama K, Okada M	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of Wnt5a on drug resistance in estrogen receptor positive breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 1062-1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-021-01241-0	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 Goda N, Sasada S, Shigematsu H, Masumoto N, Arihiro K, Nishikawa H, Sakaguchi S, Okada M, Kadoya T	4. 巻 13
2. 論文標題 The ratio of CD8+lymphocytes to tumor-infiltrating suppressive FOXP3+ effector regulatory T cells is associated with treatment response in invasive breast cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Discov Oncol	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12672-022-00482-5	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 Kimura Y, Masumoto N, Kanou A, Fukui K, Sasada S, Emi A, Kadoya T, Arihiro K, Okada M	4. 巻 41
2. 論文標題 The TILs-US score on ultrasonography can predict the pathological response to neoadjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 101725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.suronc.2022.101725	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 末岡智志、角舎学行、池尻はるか、金子佑妃、甲斐あずさ、川又あゆみ、平岡恵美子、笹田伸介、恵美純子、舛本法生、有廣光司、岡田守人
2. 発表標題 乳癌組織からの乳癌幹細胞の選択培養と、癌幹細胞の病理学的特徴
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末岡智志、角舎学行、池尻はるか、金子佑妃、甲斐あずさ、川又あゆみ、平岡恵美子、笹田伸介、恵美純子、舛本法生、有廣光司、岡田守人
2. 発表標題 患者組織由来の乳癌幹細胞の選択培養法の確立と癌幹細胞ターゲット療法への展開
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末岡智志、角舎学行、池尻はるか、金子佑妃、甲斐あずさ、川又あゆみ、平岡恵美子、笹田伸介、恵美純子、舛本法生、有廣光司、岡田守人
2. 発表標題 患者組織由来の乳癌幹細胞の選択培養法の確立と癌幹細胞ターゲット療法への展開
3. 学会等名 第30回乳癌基礎研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末岡智志、角舎学行、池尻はるか、金子佑妃、甲斐あずさ、川又あゆみ、平岡恵美子、笹田伸介、恵美純子、舛本法生、有廣光司、岡田守人
2. 発表標題 患者由来乳癌幹細胞から作成したxenograftモデルの病理学的検討
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------