

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591677

研究課題名（和文）

乳癌ネオアジュバント症例を用いた化学療法前後における ALDH 陽性癌幹細胞の推移

研究課題名（英文）Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-Mesenchymal transition in chemosensitivity in breast cancer

研究代表者

高橋 麻衣子 (TAKAHASHI MAIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348661

研究成果の概要（和文）：

我々は癌幹細胞と EMT の関係に着目し、EMT 誘導因子 HOXB9 や、TGF β の活性化による EMT が乳癌癌幹細胞分画である CD44(+)/CD24(-) 細胞分画の増加を誘導することを確認した。さらに、この TGF β 経路を抑制する薬剤を新規に検証し、EMT に伴う CD44(+)/CD24(-) 細胞分画の増加が抑制されることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

We recently screened for novel TGF- β inhibitors among commercially available drugs and identified PSK as a strong inhibitor of the TGF- β -induced reporter activity of 3TP-lux. PSK suppressed TGF- β 1-induced EMT, and FACS analysis showed that PSK inhibited the EMT-mediated generation of CD44+ / CD24- cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：癌幹細胞 EMT 化学療法感受性 PSK 乳癌

1. 研究開始当初の背景

癌組織中の個々の細胞は、単一の性質を持つ細胞のみで構成されてはならず、多型性 (heterogeneity) を有しており、発生母地・周囲組織の環境によって癌細胞は生存の為に柔軟にその性質を変化させ、さらにこの過程で浸潤・転移能力を獲得すると考えられている。Al-Hajj らは乳癌細胞中の CD44(+)/CD24(- or low) Lineage(-) 細胞を分離し、この細胞 200 個が免疫不全マウスに生着可能であることを示し (Al-Hajj et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2003)、更にこの

細胞群中の ALDH 活性を持つ細胞は、わずか 20 個の細胞が免疫不全マウスに生着し、腫瘍形成を行うことが報告された。(Ginestier et al., Cell Stem Cell, 2007) この高い腫瘍生着能力を持つ細胞群は幹細胞と多くの点で類似の性質を持つ為、「癌幹細胞」であると考えられている。

この癌幹細胞に関する研究においては、そのほとんどが癌幹細胞の持つ強力な腫瘍生成能力 (tumor initiating ability) や、多分化能に焦点が当てられ、抗癌剤耐性獲得メカニズムにおける癌幹細胞の役割に肉薄した研究は未だ少ない。抗癌剤耐性獲得機序を

説明する理論として、癌の heterogenous な性質に基づく抗癌剤投与後の選択的生存によるとする説や、薬剤曝露への依存 (drug addiction) による癌細胞の形質変換によるとする説などが提唱され、研究が進められている。

これらの背景から、生来抗癌剤耐性を持つ癌幹細胞が生き残り、多分化能を駆使して抗癌剤耐性癌細胞群を生み出し、再増殖 (relapse) を即すという癌幹細胞の理論を検証し、その是非を問うことは、抗癌剤耐性メカニズムの解明に有意義であると考えられた。

我々は前実験を行い、乳腺上皮細胞株 MCF10A 及び MDA-MB231 を含む数種の乳癌細胞株のフローサイトメトリーを行い上記 CD44 (+) CD24 (- or low) 分画を検証することで、各細胞間の癌幹細胞分画の差異を比較検討を行った。さらにこれら細胞分画を抽出し、癌幹細胞群とそれ以外の群で抗癌剤に対する感受性が変化するかを既に他癌腫で検証済みである。既に胃癌手術検体のサイドポピュレーション分画 (SP 細胞) を分離し、抗癌剤を用いた薬剤耐性試験及び NOG マウス (免疫不全マウス) を用いた造腫瘍性の評価を行ったところ、SP 細胞は有意に高い薬剤耐性能と造腫瘍性を示した。本研究はこれらの概念及び成果を踏まえて発展させることにより、高い有用性を持った成果を上げると考えられた。

2. 研究の目的

現在までの多くの研究成果から、癌幹細胞自体が抗癌剤耐性を元来所有していると推察されている。このことから、化学療法を施行することで、癌幹細胞以外の抗癌剤に対する反応性を持つ細胞増殖の抑制及び死滅が生じ、相対的に癌幹細胞分画の腫瘍中の割合が増加すると我々は予測した。これに基づき、本研究で検証すべき仮説を

“乳癌において、抗癌剤投与後の腫瘍組織中の癌幹細胞を含む細胞群の割合は投与前と比較して増加する”

と設定し、この仮説を証明するために以下を重点的に明らかにすることを当初の目的とした。

(1) 乳癌検体の異種移植モデルの確立と、各種抗癌剤投与の施行前・施行後における癌幹細胞分画の推移の検証

(2) 上記細胞分画の mammosphere formation assay による検体の解析。

(3) 癌幹細胞分画の異種移植モデルにおける生着の検証

(4) 乳癌術前化学療法施行前・施行後の癌幹細胞分画の検証

(5) 当科で施行中の乳癌術前ホルモン療法施行前・施行後の癌幹細胞分画の検証

これらを検証することで、マウスモデル及び臨床における術前化学療法を利用したモデルの両者において、癌幹細胞分画の推移を検討することが可能となり、結果の信頼性を担保することができると考えられる。

さらに、研究施行期間中に新たな目的として、固形癌癌幹細胞の成立過程とその特徴を検討すること。さらに、上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) と癌幹細胞分画の増減に着目して研究を進めた。本研究では、癌幹細胞分画を抑制する薬剤のスクリーニングと、EMT の抑制、またそれに伴う癌幹細胞分画の抑制による抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

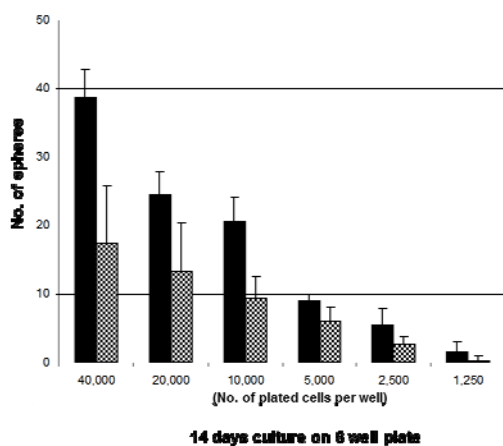
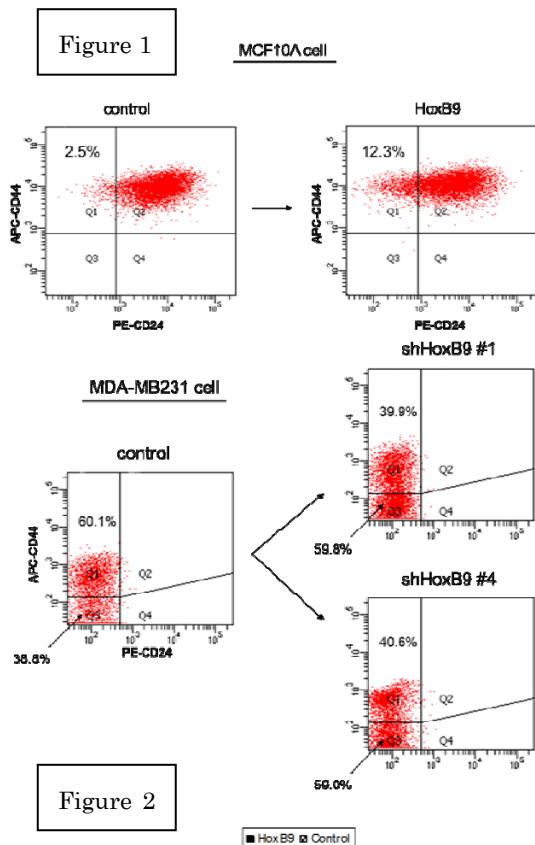
3. 研究の方法

(1) 癌幹細胞分画の同定

現在までの細胞株における検討は CD44 及び CD24 のみをマーカーとして進められてきたが、これに ALDEFLUOR 陽性細胞の検討を加え、化学療法施行前後の CD44 (+) CD24 (-) ALDEFLUOR (+) 細胞群の増減を、マウス異種移植モデル及びネオアジュバント症例について個々に検討する。ALDEFLUOR は ALDH 活性陽性細胞をフローサイトメトリーにて同定する試薬で、基質である BAAA が細胞に取り込まれ、ALDH によって BAA- (蛍光発光) に変換されるため、ALDH の活性の高い細胞は緑色の強い蛍光を発する。これは血液幹細胞の同定に用いられる試薬として既に商業展開されている薬剤で、簡便にフローサイトメトリーにて分離することが可能である。

(2) マウス異種移植モデルにおける抗癌剤投与の施行前・施行後における癌幹細胞分画の推移の検証

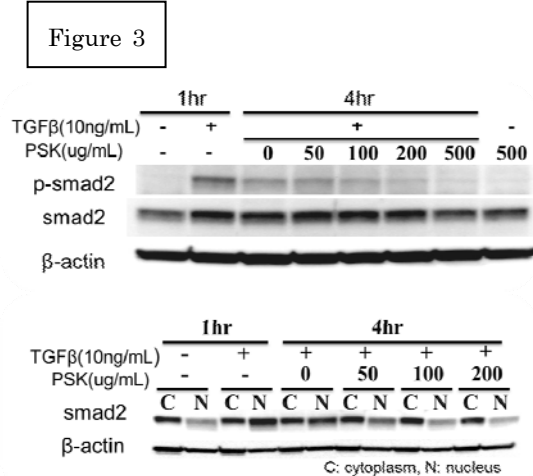
乳癌細胞株 MDA-MB231 を Nod/Scid mouse 皮下に移植し、右図のような経時的腫瘍体積変化を得る為の至適抗癌剤濃度及び投与期間を docetaxel 及び doxorubicin において検索を行う。具体的には、移植された腫瘍体積が 100~150mm³ に到達した時点で docetaxel もしくは doxorubicin の投与を開始する。経時的に腫瘍体積を計測し、25~50 mm³ に達した時点で腫瘍を切除し、解析に用いる。また、抗癌剤非投与群をコントロール群として用いる。



(3) EMT による癌幹細胞分画の誘導とその特性の検討

EMT は細胞への TGF β の添加や EMT 誘導因子の導入により生じることが可能である。我々はこれらを用いて乳癌細胞に EMT を誘導し、前述の方法で癌幹細胞の同定を行った。また、これによる mammosphere 形成能や、EMT に重要な働きを行う smad2 経路が、どのように癌幹細胞分画の増加に関わるかの検討を行う。

(4) TGF β 経路を抑制する薬剤のスクリーニングとこれによる癌幹細胞分画抑制の検討
3TP-lux は TGF β 経路の標的遺伝子のプロモーター活性部位にルシフェラーゼ遺伝子が融合されたプラスミドで、TGF β 経路の活性指標として頻用されるため、今回薬剤スクリーニングに使用した。



これにより同定された薬剤の TGF β 経路へ及ぼす影響を smad2 経路のタンパク質を対象としたウェスタンブロット法で検証すると同時に、フローサイトメトリーや mammosphere 形成能の検討による癌幹細胞分画よく性能の検討を行った。

4. 研究成果

(1) ALDH1 を用いた癌幹細胞分画の同定
我々は乳癌癌幹細胞分画を同定するために、CD44(+)CD24(-)分画に加え、ALDH1 陽性を用いた同定法を試みた。ALDH1 陽性細胞は ALDEFUOR 法を用いて解析を行ったが、各種乳腺上皮および乳癌細胞株 (MCF10A, MCF7, MDA-MB231, T47D) を用いて行った実験では、全ての細胞株で CD44(+)CD24(-)かつ ALDH1 陽性細胞は全体の 0.1%に満たない割合であったため、検出には不適と判断を行った。またこの検出精度で、貴重な患者検体を使用して研究を続けることは不適切であると判断し、ALDH1 による検出は行わず、今後は CD44(+)CD24(-)を乳癌癌幹細胞分画として研究を継続していくこととした。

(2) EMT 誘導による癌幹細胞分画の増加
我々は転写因子 HOXB9 が主に EMT 及び血管新生を中心として乳癌の悪性化に寄与することを明らかにし、これらの現象が erbB-PI3K-AKT 経路及び TGF β 経路に依存している事を示した。(Hayashida et al., PNAS, 2010) EMT を生じることで癌幹細胞分画の増加が認められるとの報告が多数認められるため、我々は乳腺上皮細胞 MCF10A に対してこの HOXB9 を導入したところ、EMT を認めると共に、CD44(+)CD24(-)分画はコントロールに比べて増大を認めた。(2.5%→12.3%) 一方で、HOXB9 に対する shRNA を用いて、HOXB9 高発現細胞株である MDA-MB231 に対して発現抑制を行ったところ、癌幹細胞分画は減少を認めた。(60.1% → 39.9%, 40.6%) (Figure 1)

さらに、mammosphere formation assay を施行したところ、コントロールに比べて、sphere 形成能が著明に亢進していた。(Figure 2)

(3) EMT 抑制とそれに伴う癌幹細胞分画の抑制

TGF β は著明な EMT 誘導因子であり、前述の HOXB9 においても、その導入により TGF β 経路の活性化が生じることが知られている。

我々は現在までに TGF β 阻害剤としての働きを持つことが知られていないが、臨床現場で十分な実績のある既存の薬剤をスクリーニングし、その中から免疫賦活剤として知られている PSK (クレスチン®) に 3TP-lux のルシフェラーゼ活性を著明に抑制する働きを有することを同定した。

前述の 3TP-lux の結果を受けて、我々は TGF β 経路に遺伝子変異を持たない大腸癌細胞株 SW837 に対して TGF β 1 を 1 時間添加し、これを完全に除去した後に PSK を 4 時間添加したところ、smad2 のリン酸化及び核内移行が濃度依存性に抑制されること、また TGF β 経路の標的遺伝子である SERPINE1, TAGLN 等の発現が抑制されることを示した。さらに同様の結果が乳腺上皮細胞株 MCF10A 及び乳癌細胞株 MDA-MB231 において観察されたため、PSK は TGF β により活性化される主要な経路である smad 経路を抑制する働きがあることが確認された。また、乳腺上皮細胞株 MCF10A 及び乳癌細胞株 MDA-MB231 に対して、TGF β 1 添加による活性刺激後に PSK を添加することにより、smad2 のリン酸化及び核内移行の抑制を確認した。(Figure 3)

EMT は上皮細胞が間質様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入・神経提細胞の遊走に重要な働きを行っている。(Greenburget al., J Cell Biol, 1982) 一方で間質細胞への移行により細胞遊走能の亢進をもたらすことから、癌細胞の浸潤や転移との関連が近年脚光を浴びている現象である。細胞への TGF β 刺激はこの EMT を誘導することが広く知られており、我々は乳腺上皮細胞 MCF10A への TGF β 添加により、EMT が誘導されること。PSK の同時添加により、細胞形態・E-cadherin の発現減弱・vimentin の発現亢進・細胞遊走能の亢進の全てが抑制されることを確認した

正常乳腺上皮細胞 MCF10A を用いて、TGF β 1 添加により得られる EMT とこの EMT 変化による、幹細胞分画である CD44 (+)CD24 (-) 細胞分画の増加が PSK により抑制されるかを検討した。

TGF β の添加により MCF10A は細胞形態の変化

Figure 4

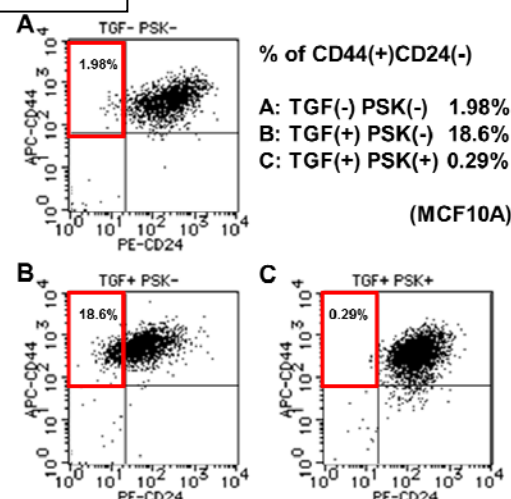
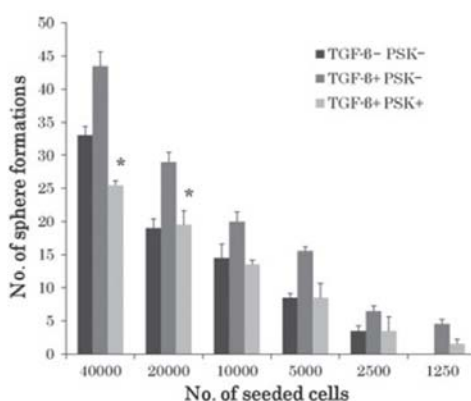


Figure 5



を伴う EMT を生じ、CD44 (+)CD24 (-) 細胞分画が 1.98% から 18.6% へと亢進を認めたが、PSK を同時添加した群においては、CD44 (+)CD24 (-) 細胞分画は 0.29% と、これを著明に抑制することが確認された。(Figure 4) さらに、mammosphere の形成能を確認したところ、PSK の添加により、sphere 形成能の抑制が確認された。(Figure 5) すなわち、EMT に伴う CD44 (+)CD24 (-) 細胞分画の増加は、PSK による TGF β 経路と同様に抑制されることが確認された。

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 1 件)

- ① Yoshihiro Ono, Tetsu Hayashida, Ayano Konagai, Hiroshi Okazaki, Shigeyuki Kawachi, Minoru Tanabe, Masahiro Shinoda, Hiromitsu Jinno Hirotoishi Hasegawa, Masaki Kitajima, and Yuko Kitagawa

Direct inhibition of the transforming growth factor β pathway by protein-bound

polysaccharide through inactivation of smad2 signaling, Cancer Science, 2012 Feb; 103(2):317-324. (査読有り)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記すべき事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 麻衣子 (TAKAHASHI MAIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348661

(2) 研究分担者

林田 哲 (HAYASHIDA TETSU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80327543