

## 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 6 月 15 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591687

研究課題名（和文）腫瘍活性化線維芽細胞（CAF）の機能解析と乳癌ホルモン療法反応性

研究課題名（英文）Functional analysis of carcinoma-associated fibroblasts and response to hormonal therapy in breast cancer

研究代表者：山口 ゆり（YAMAGUCHI YURI）

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・主任研究員

研究者番号：80166628

研究成果の概要(和文):閉経後乳癌では腫瘍周辺の間質線維芽細胞(CAF, Carcinoma-associated fibroblast)がアロマターゼを発現し、局所的にエストロゲンを供給する。我々はERE(Estrogen Response Element)-GFPを用いてCAFによるER活性化能と検体の乳癌細胞のER活性を可視化して定量するオリジナルなシステムを開発し、個々の症例のCAFの特性を解析した。ER活性化能が低い症例群ではER活性化能とアロマターゼの発現が相関し、このような症例ではアロマターゼ阻害剤 Exemestane 術前治療後にER活性が低下し、病理学的治療効果が良いことが判明した。治療の個別化にはCAFの特性の解析が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文): In postmenopausal breast cancers, CAFs (carcinoma-associated fibroblasts) express aromatase, and locally produce estrogen to activate the estrogen receptor (ER). We established a reporter cell system to detect the ER-activating ability of CAFs under coculture with MCF-7-E10 cells stably transfected with the ERE-GFP gene, and ER activity in breast cancer cells in primary culture by adenovirus-mediated introduction of the ERE-GFP reporter gene. In the cases in which ER-activating abilities of CAF were low, ER-activating abilities correlated with aromatase expression. In these cases, neoadjuvant hormonal therapy with an aromatase inhibitor, exemestane, decreased ER activities in tumor cells and led to a favorable clinical response. Functional analysis of CAF for individual breast cancers might be important to predict the endocrine therapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：癌, 細胞・組織, シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

(1)閉経後乳癌において腫瘍周辺の間質線維芽細胞 CAF (Carcinoma-Associated Fibroblast)はエストロゲン代謝酵素アロマトラーゼを発現し、局所的なエストロゲンを供給し、このことが乳癌発症の要因の一つとされている。アロマトラーゼ阻害剤は乳癌の内分泌療法において高い奏効性を示すことが知られているがエストロゲン受容体(ER)陽性乳癌の1/3では奏効せず、新たな奏効性予測の指標が要求されている。

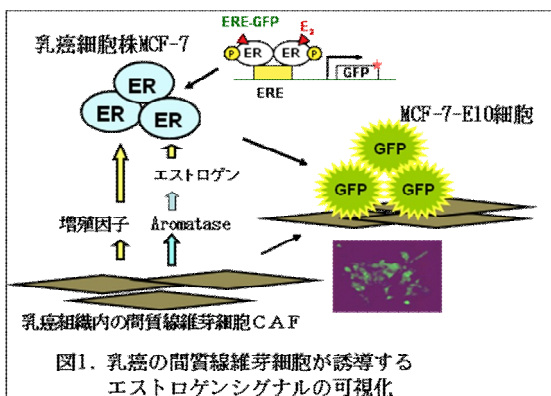
(2)ERは転写因子として genomic に働く他、non-genomic な経路でもそのシグナルを伝達し、増殖因子によるリン酸化を介したエストロゲン非依存性の ER 活性化経路など複数のシグナルカスケードで活性化される。その制御には癌細胞をとりまくCAFを中心とする微小環境に依存する。微小環境の特性が乳癌の個性、治療の奏効性に影響すると考えられる。

## 2. 研究の目的

乳癌CAFの特性についてエストロゲンシグナル依存性および非依存性の癌細胞増殖促進作用を中心に解析し、乳癌微小環境の個別化を基盤とする治療の奏効性予測および治療標的の探索を目指す。

## 3. 研究の方法

我々はERE(estrogen response element)-GFPを安定導入した乳癌細胞株MCF-7-E10を樹立し、乳癌組織から単離したCAFのエストロゲンシグナル依存性およびリン酸化経路等によるエストロゲンシグナル非依存性を含む包括的なER活性化能を共培養により、可視化するシステムを開発した(図1)。

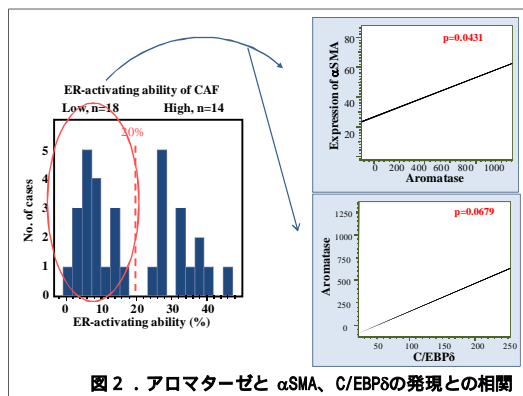


この系を用いて個々の乳癌についてCAFのER活性化能を測定する。一方、CAFにおけるアロマトラーゼの発現およびアロマトラーゼの発現と関連する脂肪細胞の分化過程に特異的に発現する転写因子群、活性化した筋線維芽細胞の指標であるalpha-SMAなどの発現をリアルタイムPCRで解析し、その相関を検討す

る。我々はERE-GFPを組み込んだアデノウイルスベクターを用いて個々の乳癌について乳癌細胞のER活性を定量するシステムも開発した。そこで、アロマトラーゼ阻害剤Exemestaneの短期術前ホルモン療法を受けた症例について治療の前後の針生検を用いてCAFのER活性化能と乳癌細胞のER活性、治療効果の関連性を解析する。MCF-7-E10細胞のXenograftにおけるCAFの機能も検討する。また、乳癌組織の抽出液を用いて微小環境中に存在する増殖因子などのER活性や乳癌細胞の増殖に対する効果も検討する。

## 4. 研究成果

(1)CAFのER活性化能はアロマトラーゼ阻害剤の添加により阻害される症例もあるが、アロマトラーゼの発現量とは相関せず、エストロゲン以外のER活性化経路があることがわかった。アロマトラーゼの発現は前駆脂肪細胞で高いことが報告されているため、ER活性化能と脂肪細胞の分化過程に特異的な転写因子群やalpha-SMAとの相関を検討したが相関は認められず、CAFの多様性が示された。次に、CAFのER活性化能が低い群と高い群に分けて検討した結果、低い群ではアロマトラーゼの発現はalpha-SMAやpreadipocyte特異的転写因子C/EBP deltaの発現と相関または相関する傾向を示した(図2)。



また、MCF-7-E10細胞とCAFを同所性にヌードマウスに移植したXenograftにおいてGFPを観察した。

(2)次にCAFのER活性化能と乳癌細胞のER活性および内分泌療法の治療奏効性との相関を検討した。アロマトラーゼ阻害剤Exemestaneの短期術前ホルモン療法を受けた症例87例のうち治療の前後で針生検を用いてER活性が解析できた80例を検討した結果、治療によりER活性が低下した症例が26%、増加した症例が12%、低値あるいは高値を示し、変化のなかった症例はそれぞれ17%、37%であった。

CAFの培養が可能であった28例を検討した

結果、治療により ER 活性が低下した症例の CAF の ER 活性化能 (図 3、Group 1) はその他の症例より有意に低いことを確認した。

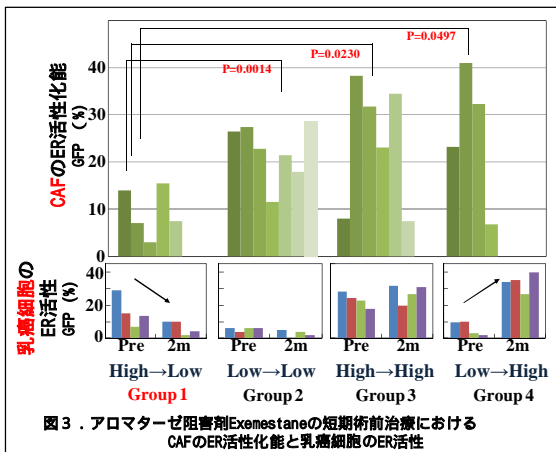


図 3 . アロマターゼ阻害剤 Exemestane の短期術前治療における CAF の ER 活性化能と乳癌細胞の ER 活性

即ち Exemestane により ER 活性が低下した症例において ER の活性化は主に CAF のアロマターゼを介したエストロゲン産生に依存していることが示唆された。その他の症例では増殖因子等の経路による ER の活性化経路の影響が考えられる。

また、治療後に低い ER 活性を示した閉経後乳癌では Exemestane による病理学的治療効果がよいことが判明した (図 4)。

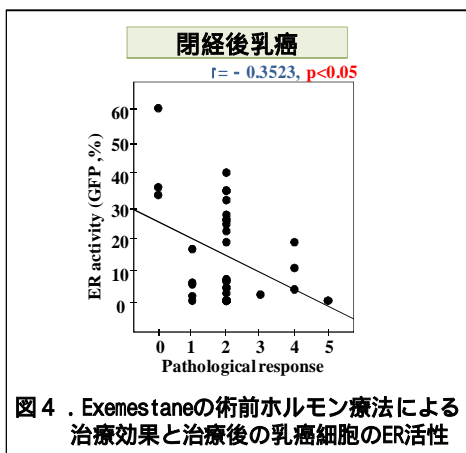


図 4 . Exemestane の術前ホルモン療法による治療効果と治療後の乳癌細胞の ER 活性

以上の結果から、CAF が産生するエストロゲンに依存した乳癌においては CAF の ER 活性化能は穏やかであり、アロマターゼの発現と相関する。このような症例ではアロマターゼ阻害剤によって乳癌細胞の ER 活性は低下し、治療効果も良いことが判明した。

(3) 我々は微小環境中に存在する種々の因子による総合的な ER の活性化や癌細胞の増殖作用を解析するため、乳癌組織を細切して得た上清の効果を検討した。その結果、抗エストロゲン剤では阻害されない乳癌細胞に対する増殖促進活性を見出した。この活性は個々の症例によって異なること、また、抗体

や受容体の阻害剤による解析から、増殖促進活性の一部に hepatocyte growth factor (HGF)、insulin-like growth factor (IGF-1) が関与することを見出している。病理学的因子とこの活性との相関を検討した結果、腫瘍径が大きく、Intrinsic subtype の Her2 型で高く、組織型では硬癌、充実腺管癌で高いことがわかった(図 5)。

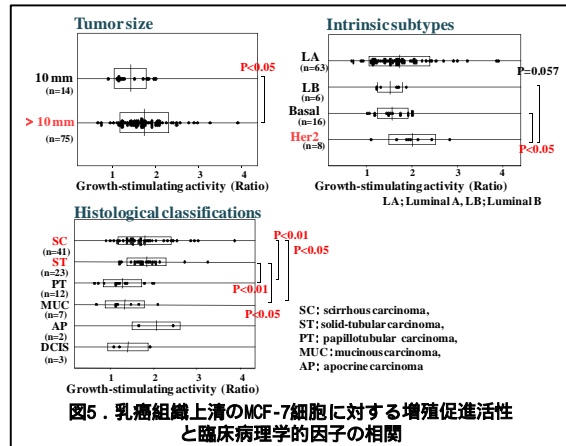


図 5 . 乳癌組織上清の MCF-7 細胞に対する増殖促進活性と臨床病理学的因子の相関

ER 陰性乳癌組織の上清の解析では増殖促進活性が高い症例群では低い症例群より HER2 の発現が高いことも判明した。以上、乳癌組織上清中の増殖促進活性はエストロゲン非依存性で増殖因子のシグナルに依存することが示唆され、増殖促進活性は悪性度の高い乳癌ほど高いことがわかった。

今後は乳癌の浸潤能に対する作用や再発の大きな要因である乳癌幹細胞の維持に対する CAF および液性の微小環境の機能を解析し、治療の標的因子を探索していく。

## 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 3 件)

Tokuda E, Seino Y, Arakawa A, Saito M, Kasumi F, Hayashi S, Yamaguchi Y. Estrogenreceptor -a directly regulates sensitivity to paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. Breast Cancer Res. 査読有 Treat. Published online, 11 September, 2011.

Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Opera TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有, 127, 358-366, 2011.

Kataoka M, Yamaguchi Y, Moriya Y, Sawada N, Yasuno H, Kondoh K, Evans DB, Mori K, Hayashi S. Antitumor activity of chemoendocrine therapy in premenopausal and postmenopausal models with human breast cancer xenografts. *Oncol Rep*. 査読有, 27, 303-310, 2011.

[学会発表](計 18 件)

徳田恵美、清野祐子、荒川 敦、齊藤光江、霞 富士雄、林 慎一、山口ゆり：ER の発現はバクリタキセルの感受性を規定する。第 19 回日本乳癌学会学術総会、9.2,2011、仙台。

伊藤貴子、田澤智香、花村 徹、田中美穂、山口ゆり、森谷卓也、平川 久、林 慎一：乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討と臨床病理学的因子との相関。第 19 回日本乳癌学会学術総会、9.3.2011、仙台。

山口ゆり、井上賢一、清野祐子、須田哲司、武井寛幸、田部井敏夫、黒住昌史、林 慎一：アロマターゼ阻害剤の乳癌術前ホルモン療法におけるエストロゲンシグナルの変化。第 70 回日本癌学会学術総会、10.3.2011、名古屋。

伊藤貴子、田澤智香、山口ゆり、田中美穂、佐藤 望、森谷卓也、平川 久、林 慎一：乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討と intrinsic subtype との相関。第 70 回日本癌学会学術総会、10.4,2011、名古屋。

須田哲司、清野祐子、大庭華子、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一、山口ゆり：乳癌間質線維芽細胞における ER 活性化能と癌抑制遺伝子異常との関連性の解析。第 70 回日本癌学会学術総会、10.4,2011、名古屋。

伊藤貴子、山口ゆり他 4 名：乳癌組織からの癌幹細胞の同定・培養の試みと臨床病理学的因子との相関。第 18 回日本乳癌学会学術総会。6.24,2010、札幌。

山口ゆり、清野祐子、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一：乳癌微小環境のヒト乳癌培養株細胞の Mammosphere 形成における増殖促進効果。第 69 回日本癌学会。9.22,2010、大阪。

伊藤貴子、田澤智香、山口ゆり、田中美穂、森谷卓也、平川 久、林 慎一：乳癌原発腫瘍における癌幹細胞の解析。第 69 回日本癌学会。9.23,2010、大阪。

徳田恵美、清野祐子、齊藤光江、霞 富士雄、林 慎一、山口ゆり：乳癌の術前化学療法における ER 発現の意義の検討。第 69 回日本癌学会。9.24,2010、大阪。

清野祐子、山口ゆり、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一：アロマターゼ阻害剤耐性乳癌のエストロゲン活性。第 69 回日本癌学会。9.24,2010、大阪。

Yuri Yamaguchi, 他 7 名: Evaluation of individual estrogen-related signals in the neoadjuvant therapy with aromatase inhibitor in breast cancer. 6th International Symposium on Hormonal Oncogenesis, September 12-16, 2010, Tokyo, Japan.

山口ゆり、他 7 名: 乳癌のエストロゲンシグナルに対するエグゼメスタンの短期術前治療による効果。第 68 回日本癌学会総会、10.2, 2009、横浜。

大庭華子、山口ゆり 他 5 名: 乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析。第 68 回日本癌学会総会、10.2, 2009、横浜。

林 慎一、山口ゆり: ホルモン療法の効果予測因子 - 基礎の立場から - <シンポジウム>, 第 17 回日本乳癌学会。7.3, 2009、東京。

Sin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi: Growth factors and estrogen signaling implicated in the hormonal therapy for human breast cancer (Symposium), 14th International Congress of Endocrinology, March 28, 2010, Kyoto.

Yuri Yamaguchi, 他 7 名: Evaluation of tumor microenvironment-regulated estrogen signals in individual breast cancers and their adjacent stromal fibroblasts. 4<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. March 29, 2010, Kyoto.

大庭華子、山口ゆり、他 5 名: 乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析。第 10 回ホルモンと癌研究会、8.1,2009、仙台。

山口ゆり、他 7 名: 乳癌のエストロゲンシグナルに対するアロマターゼ阻害剤 Exemestane の短期術前治療の効果。第 10 回ホルモンと癌研究会、8.1,2009、仙台。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 ゆり (YAMAGUCHI YURI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・主任研究員

研究者番号：80166628