

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890048

研究課題名（和文） システム生物学的方法論による乳癌幹細胞の自己複製と分化の分子機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanisms controlling self-renewal and differentiation of breast cancer stem cells using systems biological methodology

研究代表者 日野原 邦彦 (Hinohara Kuniyiko)

東京大学医科学研究所・特任助教

研究者番号：50549467

研究成果の概要（和文）：システム生物学的解析手法の一つである Gene set enrichment analysis (GSEA) 法により、乳癌幹細胞において炎症性免疫応答関連シグナルが亢進していることを見出し、転写因子 NF- κ B が乳癌幹細胞の自己複製能を制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We used gene set enrichment analysis (GSEA), which is an analytical method for determining gene expression profiles on the basis of potential pathways and identified that breast cancer cell lines contain a CD44^{hi}/CD24^{low} breast cancer stem cell population with a distinct molecular profile, which includes inflammatory properties. We also identified that NF- κ B, one of the main regulator of inflammatory signaling pathway, regulates the self-renewal capacity of breast cancer stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：癌研究

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：乳癌、癌幹細胞、GSEA 解析、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

2003 年にヒト乳癌の解析から乳癌幹細胞の存在が明らかとなった。癌幹細胞は高い造腫瘍能を有し、高い抗癌剤耐性を持つことが知られていることから、この一部の癌幹細胞を治療標的とするための新たな分子標的の同定が求められていた。しかし 2009 年時点では乳癌幹細胞の維持に関わる分子機構については未解明な部分が多かった。また乳癌細胞株中の乳癌幹細胞に関する知見も乏しかった。

2. 研究の目的

本研究では、システム生物学的方法論を用いて乳癌幹細胞において活性化している新規遺伝子パスウェイを包括的に明らかにし、そこから乳癌幹細胞の自己複製と分化の分子機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株から CD44^{hi}/CD24^{low} 乳癌幹細胞集団とそれ以外の細胞集団を単離し、それらの造腫瘍性を検討することで、乳癌細胞株における乳癌幹細胞の存在を確かめる。

(2) 単離した乳癌幹細胞集団およびそれ以外の細胞集団のマイクロアレイ解析を行な

う。得られたデータを Pathway 解析手法のひとつである Gene set enrichment analysis (GSEA) により解析することで、乳癌幹細胞で濃縮されている遺伝子 Pathway を同定する。

(3) 同定した Pathway を構成する遺伝子について、乳癌幹細胞の自己複製能の制御に関わるかどうかを分子生物学的手法により検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト乳癌細胞株から癌幹細胞画分である CD44^{hi}/CD24^{low} 画分と、対照群として CD44^{hi}/CD24^{hi} 画分をソーティングし、マウス移植モデルにおいて癌幹細胞画分の高い腫瘍形成能を確認した (図1)。

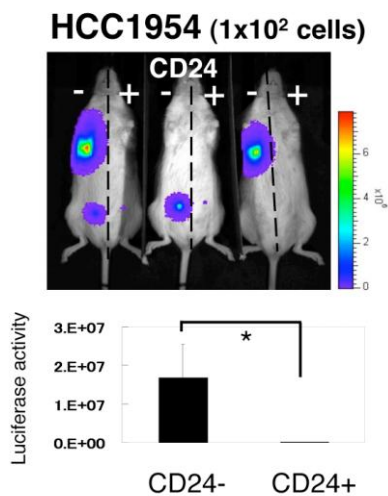


図1 乳癌幹細胞移植による腫瘍形成

(2) 次に、両画分の遺伝子発現パターンについて cDNA マイクロアレイによる解析を行なった。GSEA によりアレイデータを解析した結果、乳癌幹細胞画分では TGF- β pathway, ROS metabolic pathway 等の既報の乳癌幹細胞特異的パスウェイに加えて、TNF response pathway、IFN response pathway、NF- κ B pathway 等の炎症性免疫応答に関わる遺伝子セットの濃縮が認められた。

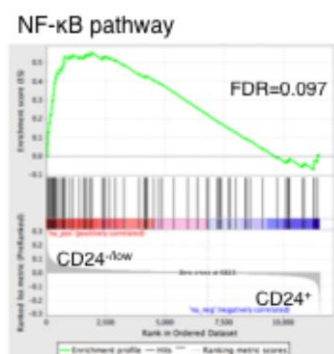


図2 GSEA 解析結果の一例

(3) GSEA 解析から得られた癌幹細胞画分で高発現している遺伝子について qRT-PCR による Validation を行い、VEGFA, CCL5, IL8, SDF2L ならびに TLR1 の癌幹細胞画分における高発現を確認した。さらに、TNF、IFN パスウェイ共通の因子でもある NF- κ B の活性を検討した結果、HCC1954 細胞株と MCF7 乳癌細胞株の CD24^{-/low} CD44⁺ 乳癌幹細胞画分では対照群の CD44^{hi}/CD24^{hi} 画分と比べて NF- κ B の活性化が認められた。また NF- κ B インヒビターである DHMEQ の投与により、HCC1954 細胞株の CD44^{hi}/CD24^{low} 乳癌幹細胞画分における NF- κ B 活性は大きく減少した。さらに DHMEQ 投与により、CD44^{hi}/CD24^{low} 乳癌幹細胞画分では IL8, CCL5 の発現低下が認められた。以上のことから乳癌幹細胞では NF- κ B が活性化しており、IL8 や CCL5 等のケモカインの発現を制御していると考えられた。これらのことは、乳癌幹細胞での炎症性免疫応答関連遺伝子群の重要性を示唆するものである。

(4) 乳癌幹細胞の培養法であり、in vitro での自己複製能を検討するためのアッセイ法であるスフィア培養系を構築した。この系を用いて HCC1954 細胞株と MCF7 乳癌細胞株中の癌幹細胞画分の培養を行なったところ、通常の接着培養時の細胞に比べてスフィア細胞では NF- κ B の活性が上昇していることが明らかとなった。さらに NF- κ B インヒビターの濃度依存的に、また NF- κ B 抑制型 mutant である I κ B-SR の発現により、乳癌スフィアの形成数は減少した。次に NF- κ B の乳癌幹細胞自己複製における役割について検討するために、Secondary スフィアアッセイを行なった。具体的には、低濃度の NF- κ B インヒビター投与後に形成された Primary スフィアをシングルセルに分散した後、阻害剤なしで培養することで、もう一度スフィアを形成できるかどうかについて検討を行なった。その結果、Secondary スフィア培養時は阻害剤なしの通常培養にも関わらず、Primary スフィア培養時に NF- κ B インヒビター処理を行なった群は、Secondary スフィアの形成も減少した。このことから、NF- κ B の阻害により乳癌幹細胞の自己複製能が阻害されたことが示された。

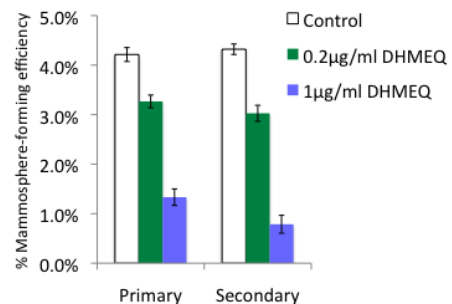


図3 自己複製能の検討結果

(5) また、NF- κ B は PI3K/Akt 経路による制御を受けることが報告されている。そこでまず、乳癌スフィアの形成に PI3K/Akt 経路が関わるかどうかを検討したところ、PI3K インヒビターの投与によりスフィアの形成は阻害された。このことから、乳癌幹細胞の自己複製は PI3K/Akt 経路を介して規定されていることが示唆された。

(6) さらに、NOD/SCID マウスの乳腺脂肪帯付近への乳癌細胞移植による Xenograft のアッセイ系を構築した。この系を用いて HCC1954 細胞による腫瘍形成能に NF- κ B が関わっているかを、NF- κ B インヒビターを定期的に腹腔内注射することで検討した。その結果、HCC1954 細胞の移植により形成される腫瘍は、NF- κ B インヒビター投与により腫瘍サイズが小さくなることから、in vivo における腫瘍の悪性化に NF- κ B が関わることを示された。

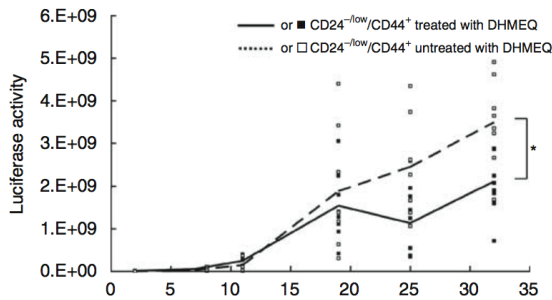


図4 NF- κ B インヒビター投与の in vivo 腫瘍形成に対する影響

(7) 以上より、乳癌幹細胞では炎症性免疫応答関連遺伝子パスウェイが亢進しており、NF- κ B と PI3K/Akt 経路が乳癌幹細胞の自己複製能の維持に関わることが明らかとなった。乳癌幹細胞における炎症性免疫応答シグナルの活性化や NF- κ B による乳癌幹細胞制御機構は、これまで明らかとなっていない新たな知見である。本研究により癌幹細胞と炎症シグナルが緊密にリンクしていることが明らかとなり、今後より詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、新たな癌幹細胞の制御機構の発見につながることを期待される。具体的な今後の展望としては、現在乳癌幹細胞の自己複製能の維持に関わる新規分子の同定を目的として、NF- κ B を制御する分子の探索を行なっている。さらに将来的には転写因子 NF- κ B によって制御される分子群も同定することで、乳癌幹細胞維持に関わる新たな分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。これらのことは、現在臨床現場において求められている癌幹細胞の選択的治療法の確立につながることを期待されることから、大変意義深いものと考えている。

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2件)

1. Hinohara K, Gotoh N. Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells. *Curr Opin Pharmacol.* (査読有) 10:650-4, 2010.

2. Murohashi, M.*, Hinohara, K.*, Kuroda, M., Isagawa, T., Tsuji, S., Kobayashi, S., Umezawa, K., Tojo, A., Aburatani, H. and Gotoh, N.: Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British J. Cancer*, (査読有) 102: 206-212, 2010.

* equal contribution

[学会発表] (計6件)

1. 日野原邦彦、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、井上純一郎、後藤典子
“NF-kappaB regulates the self-renewal of breast cancer stem cells”
第33回日本分子生物学会
2010年12月9日神戸

2. 日野原邦彦、室橋道子、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、井上純一郎、後藤典子
“Potential roles of NF-kappa B pathways in breast cancer stem cells”
第69回日本癌学会学術総会
2010年9月24日大阪

3. 日野原邦彦、室橋道子、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、後藤典子
“Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer stem cells”
第8回幹細胞シンポジウム
2010年5月14日淡路

4. 日野原邦彦、室橋道子、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、後藤典子
“Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer-initiating cells”
American Association for Cancer Research 10th Annual Meeting 2010
2010年4月20日 Walter E. Washington Convention Center, Washington D.C., USA

5. 日野原邦彦、室橋道子、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、後藤典子
“Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer-initiating cells”
第32回日本分子生物学会
2009年12月9日横浜

6. 室橋道子、日野原邦彦、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、後藤典子
“ヒト乳癌細胞株における癌幹細胞の分子シグネチャー”
第68回日本癌学会
2009年10月2日横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/system-seimei/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野原 邦彦 (HINOHARA KUNIHICO)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：50549467