

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590322

研究課題名(和文)一酸化窒素による乳癌幹細胞の増殖制御と創薬への応用

研究課題名(英文)Proliferation of breast cancer stem cells via NO/cGMP signaling pathway

研究代表者

諫田 泰成 (Kanda, Yasunari)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：70510387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：近年、乳癌は「癌幹細胞」と呼ばれる少数の集団を起源として形成されることが明らかになってきた。しかしながら、その増殖機構はほとんど明らかになっていない。乳癌幹細胞のモデルとして、ヒト乳癌細胞株MCF-7に含まれるアルデヒド脱水素酵素(ALDH)陽性細胞を使用した。NO合成酵素阻害剤により、エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖が抑制された。また、8-Br-cGMPはエストロゲンの作用を模倣した。従って、エストロゲン刺激によってNO/cGMP経路を介して乳癌幹細胞の増殖が誘導されることが示唆された。乳癌幹細胞におけるNOシグナルは新たな創薬の標的になることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Growing evidence suggests that development of breast cancer is originated from cancer stem cells, which can be isolated by aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity-based flow cytometry analysis. However, the growth regulation of cancer stem cells has not been fully understood. In the present study, we found that estrogen increased the size of ALDH-positive cell population in MCF-7 cells. The effect of estrogen was inhibited by the estrogen receptor (ER) antagonist ICI182780. We next examined the downstream pathway from the ER. A selective NOS inhibitor inhibited the effect of estrogen on NO production and the size of ALDH-positive cell population. In addition, 8-Br-cGMP mimicked the effect of estrogen. Taken together, these data suggest the estrogen expands breast cancer stem cells through the NO/cGMP signaling pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：癌幹細胞 エストロゲン NO cGMP PKG

1. 研究開始当初の背景

癌は形態や増殖能、分化状態などにおいて不均一な細胞集団であることはよく知られているが、不均一性をもたらす分子メカニズムは不明である。

近年、癌は癌幹細胞(または腫瘍始原細胞)と呼ばれるごく少数の細胞を起源として形成され、癌幹細胞の非対称性分裂によって癌の不均一性が生み出されるモデルが提唱されている。癌幹細胞は、正常組織における幹細胞と同様に、未分化状態で増殖する「自己複製能」と多様な細胞を生み出す「多分化能」を有する細胞と定義される。癌の治療の際、薬剤や放射線、外科手術などにより多くの癌細胞を除去できるが、治療抵抗性が高い非常にわずかな癌幹細胞が残存してしまうと癌の再発や転移がおこると考えられている。従って、幹細胞を直接標的とした治療法を開発することにより癌の根治療法が実現できると期待される。

癌幹細胞は細胞数が少なく同定・単離が困難であり、その実体が不明であった。現在は、細胞表面抗原、スフィアと呼ばれる細胞塊を形成する方法、薬剤排出能を利用する方法(SP細胞)、細胞内アルデヒド脱水素酵素(ALDH)の酵素活性を利用する方法など様々な技術開発により癌幹細胞を同定あるいは濃縮できるようになりつつある。しかしながら、癌幹細胞の増殖制御機構など明らかになっていない点も多く、癌幹細胞を直接たたくような治療薬はほとんど開発されていない。

2. 研究の目的

本研究において、ヒト乳癌細胞株から乳癌幹細胞のモデル細胞を作製し、自己複製を誘導するシグナル経路の検討を行う。特に、乳癌組織でNO合成酵素の発現が亢進している

ことに着目して、NOシグナルと癌幹細胞の増殖の関連を検討する。これにより、新たな創薬の標的分子の同定をめざす。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 (ATCC より購入) は、DMEM に 10%FBS を添加した培地で培養した。

(2) Aldefluor 染色

MCF-7 細胞を用いて、Aldefluor (Stem Cell Technologies)により染色を行った。具体的には、ALDH 酵素の蛍光基質である BODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA) を細胞に取り込ませて 37 °C で 30 分間培養したあと、ALDH によって代謝される産物 BAA の蛍光を FACS Aria II (BD Bioscience)により解析した。ALDH 選択的阻害剤である diethylaminobenzaldehyde (DEAB) の存在下では BAA による蛍光が認められないことを確認した。

(3) xenograft

BALB/c nu-nu (6 週齢、♀) に 10^5 個の細胞をマトリゲルとともに移植した。6 週間後に腫瘍が形成されているのかを確認し、腫瘍形成したマウスの割合を tumor incidence として算出した。なお、動物実験計画は所内動物委員会において承認済である。

4. 研究成果

(1) 乳癌幹細胞の特性解析

我々は MCF-7 細胞を用いて Aldefluor 染色を行った結果、MCF7 細胞には ALDH 陽性細胞が約 1%存在することを見いだした(図 1)。

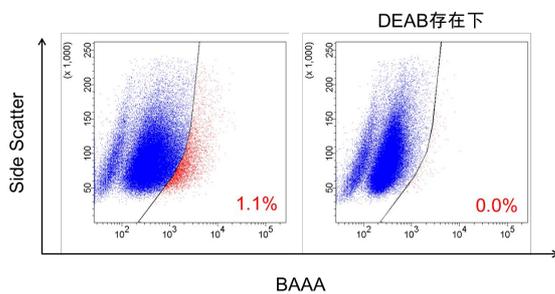


図1 MCF7細胞におけるALDH陽性細胞

MCF-7細胞由来のALDH陽性細胞を単離して、抗癌剤の存在下で培養し、生存率を解析した。その結果、ALDH陽性細胞は親細胞と比較して5-FUやドキシソルビシンに対して薬剤耐性を有していた(図2)。

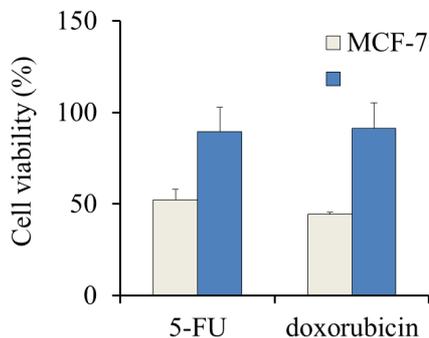


図2 ALDH陽性細胞の薬剤耐性

さらにALDH陽性細胞は、親細胞と比較して高い腫瘍形成能も示した(図3)。

Tumor incidence	
MCF-7	ALDH ⁺
1/10	3/10

図3 ALDH陽性細胞の腫瘍形成能

以上の結果から、MCF7細胞に含まれるALDH陽性細胞は、癌幹細胞としての性質を有することが示唆された。

(2) 乳癌幹細胞の増殖に対するエストロゲンの影響

次に、乳癌幹細胞の増殖に影響を与えるホルモンの探索を行った。その結果、 17β エストロゲン刺激によりALDH陽性細胞の増殖が誘導されることを見いだした。この作用はエストロゲン受容体アンタゴニストICI182780によって抑制された(図4)。従って、エストロゲンはエストロゲン受容体を介して乳癌幹細胞の増殖を誘導することが示唆された。

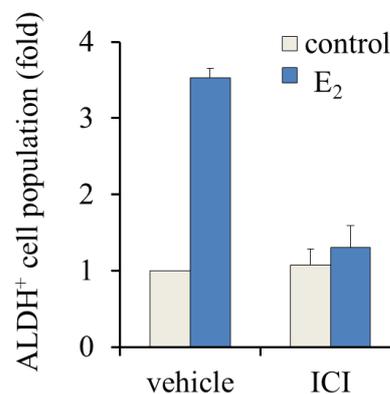


図4 エストロゲンによるALDH陽性細胞の増殖

(3) エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖に対するNO/cGMPの影響

次に、エストロゲン受容体の下流シグナルを検討した。エストロゲン刺激によりNO/cGMPシグナルが活性化されることが知られていることから、乳癌幹細胞の増殖に対する作用を調べた。その結果、エストロゲン刺激によるNO産生およびALDH陽性細胞の増殖はNO合成酵素阻害剤であるL-NAMEによって抑制された。L-NAME単独では特に作用が認められなかった(図5)。また、NOドナーSNAPの添加によって増殖が誘導された。従って、エストロゲン受容体の下流としてNOシグナルが示唆された。

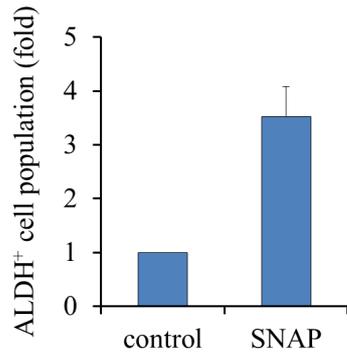
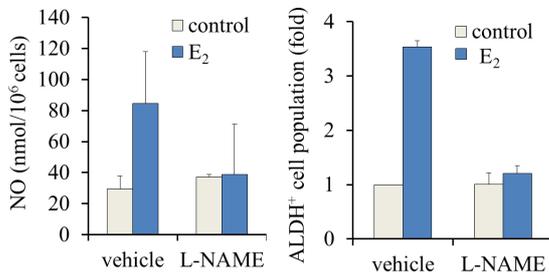


図5 エストロゲンによるALDH陽性細胞の増殖に対するNOの作用

さらに、cGMPのアナログによってALDH陽性細胞の増殖が誘導された(図6)。一方、cAMPアナログは特に作用を示さなかった。

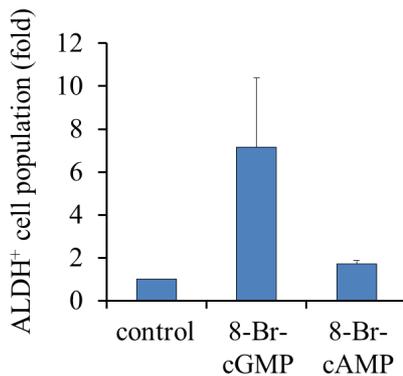


図6 8-Br-cGMPによるALDH陽性細胞の増殖

以上の結果から、エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖にNOおよびcGMPが関与することが示唆された。

(4) 乳癌幹細胞の増殖に対するPKGの影響

NOを介した乳癌幹細胞の増殖にcGMPの関与が示唆されたことから、PKG阻害剤KT5823の影響を検討した。その結果、エストロゲン刺激によるALDH陽性細胞はKT5823によって抑制された。

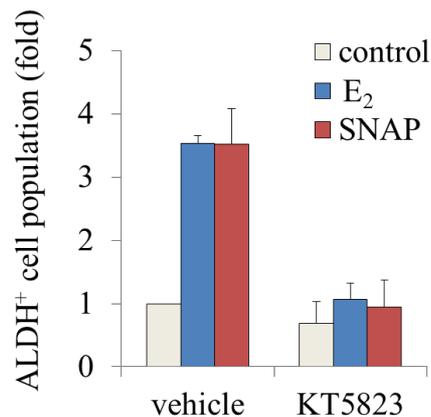


図6 エストロゲンによるALDH陽性細胞の増殖に対するPKG阻害剤の影響

そこで、乳癌幹細胞の増殖に関わるPKGの基質をマイクロアレイ解析などの手法により検討した。その結果、乳癌幹細胞の増殖にかかわるPKG基質の同定に成功した(投稿準備中)。

以上の研究から、エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖には、NO/cGMP/PKG経路が関与することが示唆された。

現在、臨床検体由来の癌幹細胞の解析を行っており、NOシグナル経路の臨床的な意義を検討している。これらの検討により、NOシグナル経路が新たな乳癌治療薬の標的になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Yamada S., Kotake Y., Sekino Y. and Kanda Y.*, AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metalomics* 5:484-91 (2013).
2. Kuroda T., Yasuda S., Kusakawa S., Hirata N., Kanda Y., Suzuki K., Takahashi M., Nishikawa S., Kawamata S and Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 7, e37342 (2012).
3. Lin W., Hirata N., Sekino Y. and Kanda Y.*. Role of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in normal and cancer stem cells. *Current Drug Targets* 13:656-65. (2012). *C.A.

〔学会発表〕(計26件)

1. 諫田泰成、平田尚也、林和花、関野祐子：Effects of sex hormones on proliferation of breast cancer stem cell. 第9回幹細胞シンポジウム、東京、2011.05.13.
2. 平田尚也、林和花、関野祐子、諫田泰成：エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖、第124回薬理学会関東部会、2011.06.04.
3. Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Yuko Sekino. Sphingosine-1-phosphate mediates proliferation of breast cancer stem cells. FASEB summer conference, 2011.08.16.
4. 諫田泰成、平田尚也、関野祐子：乳癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン1リン酸の作用、第34回分子生物学会、横浜、2011.12.13.
5. Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Yuko Sekino. Sphingolipid-mediated proliferation of

cancer stem cells. Keystone Symposia (Q3), Banff, Canada, 2012.02.14.

6. 平田尚也、関野祐子、諫田泰成：エストロゲン刺激による乳癌幹細胞の増殖に対する Src の影響、第85回日本薬理学会京都、2012.03.14.
7. 諫田泰成：Role of sphingosine kinase-1 in proliferation of cancer stem cells. 第10回幹細胞シンポジウム、淡路島、2012.05.31.
8. Naoya Hirata, Yuko Sekino, Yasunari Kanda. Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in cancer stem cells. 10th International Society for Stem Cell Research, Yokohama 2012.06.14.
9. Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Yuko Sekino. Regulation of breast cancer stem cells by sphingosine-1-phosphate. 10th International Society for Stem Cell Research, Yokohama 2012.06.14.
10. 諫田泰成：乳癌幹細胞におけるリゾリン脂質の機能解析、第11回生命科学研究会、秋田、2012.06.30.
11. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成：乳癌幹細胞の増殖に対する TGF β の影響、日本薬理学会第126回関東部会、東京、2012.07.14.
12. 平田尚也、諫田泰成：TGF β 刺激による MEK/ERK を介した乳癌幹細胞の増殖、第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012.09.19.
13. 諫田泰成：癌幹細胞を標的とする薬剤の可能性、第127回薬理学会関東部会シンポジウム、東京、2012.10.20
14. 諫田泰成、平田尚也、山田茂、関野祐子：乳癌幹細胞におけるスフィンゴシン1リン酸と Notch シグナルのクロストーク、第35回日本分子生物学会、福岡、2012.12.13.
15. 諫田泰成：癌幹細胞の受容体を標的とした治療戦略、第86回日本薬理学会年会、

- 福岡、2013.03.21
16. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成 : TGFβ 刺激による Notch シグナルを介した乳癌幹細胞の増殖機構、第 86 回日本薬理学会、福岡、2013.03.22
 17. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成 : 乳癌幹細胞におけるニコチンと Notch シグナルのクロストーク、第 12 回日本再生医療学会、東京、2013.03.22
 18. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成 : ADAM17 mediates cancer stem cell phenotype in MCF-7 cells、第 11 回幹細胞シンポジウム、東京、2013.05.17
 19. Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Yuko Sekino. Role of sphingosine kinase in cancer stem cells. FASEB Summer Research Conference, Niseko, Japan 2013.08.07.
 20. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成 : NO/sGC/cGMP 経路を介した乳癌幹細胞の増殖、第 86 回日本生化学会、横浜、2013.09.13
 21. 諫田泰成 : 癌幹細胞を標的とした創薬の可能性、第 36 回日本生物工学会、広島、2013.09.20
 22. 平田尚也、諫田泰成 : In vitro および in vivo における mammosphere の増殖に対するニコチンの影響、第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013.10.03
 23. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成 : スフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR3 を介した乳癌幹細胞の増殖機構、第 129 回日本薬理学会関東部会、東京、2013.10.19.
 24. Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, and Yuko Sekino. A novel role of sphingosine-1-phosphate receptor S1PR3 in cancer stem cell expansion via a Notch-dependent pathway. Keystone symposium, Canada, 2014.02.04

25. 平田尚也、山田茂、関野祐子、諫田泰成 : 乳癌幹細胞の増殖に対するスフィンゴシン 1 リン酸受容体 S1PR3 の影響、第 13 回日本再生医療学会、京都、2014.03.06
26. 平田尚也、山田茂、正田卓司、栗原正明、関野祐子、諫田泰成 : S1PR3 は乳癌幹細胞に対する新規標的分子である、第 87 回日本薬理学会、仙台、2014.03.19

〔図書〕(計 2 件)

1. Kanda Y. Cancer Stem Cells - Fact or Fiction? (Chapter1). Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. *CRC Press* (2013).
2. Kanda Y. Isolation and characterization of cancer stem cells using flow cytometry (Chapter6, p107-124). *Clinical Flow Cytometry – Emerging Applications, InTech* (2012).

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/phar/lab/lab2.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

諫田 泰成 (Kanda, Yasunari)
 国立医薬品食品衛生研究所
 薬理部第二室・室長
 研究者番号 : 70510387

(2)研究分担者

石田 誠一 (Ishida, Seiichi)
 国立医薬品食品衛生研究所
 薬理部第三室・室長
 研究者番号 : 10270505

(3)連携研究者

なし