

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591895

研究課題名(和文) エストロゲンレセプター/ヘッジホッグ両シグナル経路を標的とした包括的乳癌治療

研究課題名(英文) comprehensive breast cancer therapy targeting both estrogen receptor and Hedgehog signaling pathways

研究代表者

田中 晴生 (Tanaka, Haruo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90585746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌幹細胞分画(CD44+CD24-細胞)において、CD44+CD24+細胞と比較し、腫瘍形成能、腫瘍増殖能が高かったが、Hh阻害剤添加によりCD44+CD24-細胞の高い腫瘍形成能、腫瘍増殖能は有意に低下した。CD24を抑制した乳癌細胞は浸潤能、コロニー形成能およびShh、Gli1の発現が有意に高かった。CD24を抑制した乳癌細胞においてShhを抑制すると腫瘍形成能および腫瘍増殖能が有意に低下した。ERα陽性乳癌においてはERα経路がHhシグナル系の活性化機序の1つとして相乗的に働いており、ER経路が乳癌の進展に参与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumorigenesis and proliferation in breast cancer stem cell population; CD44+CD24- cells were higher than those in CD44+CD24+ cells. Hedgehog inhibitor treatment significantly abrogated these increases. Invasiveness, colony formation, and expressions of Shh and Gli1 in CD24 siRNA transfected cells were significantly higher than those in control. Shh suppression in CD24 siRNA transfected cells significantly reduced tumorigenesis and proliferation. ERα pathway plays an important role for Hh signaling activation, suggesting that ER pathway contributes to the progression in breast cancer.

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：乳癌 エストロゲンレセプター Hedgehogシグナル 癌幹細胞 包括的乳癌治療法

1. 研究開始当初の背景

乳癌は癌の形質特性(ホルモンレセプターやHER2発現状態など)に基づいて細かく治療法が選択されている癌腫の一つである(乳癌診療ガイドライン、薬物療法 2010 年度版、日本乳癌学会編)。しかしながら、2)ER 陰性乳癌、ホルモン耐性乳癌、Triple negative 乳癌など、現在の治療戦略では必ずしも満足できる成果が得られない病態が存在する(Bosch A, Cancer Treat Rev 36:206-15, 2010)。また、3)乳癌は術後の病歴の長い癌腫であり、治療中に生物学的形質が変化する症例や、再発例においては、原発巣と転移巣の形質が異なる症例も少なくない。更には、4)抗癌剤耐性を有する乳癌幹細胞が存在し、現在の治療戦略の効果を改善するには乳癌幹細胞に対する治療法開発が必要とも考えられている(Liu R, New Engl J Med 356:217-226, 2007)。これら乳癌に対しては、個々の形質特別に基礎研究や治療法開発が進められているのが現状である。すなわち、現在の治療法開発は個々の症例の形質特性に応じた治療法を整えていくという視点から進められている。この方向性は極めて重要であるが、裏返せば、乳癌に共通した包括的な治療法の開発の重要性をも暗に指摘している。本研究は、後者の視点(より包括的な治療)に立った研究である。

2. 研究の目的

現在の乳癌治療は、個々の癌のホルモンレセプター発現状態などの特性に基づいて細かく区別されている。我々は、乳癌の形態形成シグナル系を解析中、現在の治療選択の指標となっている乳癌の特性を越えて、二つのシグナル系(Estrogen receptor 経路およびHedgehog 経路)が幅広い乳癌で機能している可能性を見出した。したがって、現在の治療戦略とは異なった上記二つのシグナル系を標的とする包括的な乳癌治療法および予防法の開発の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 乳腺組織におけるER α およびHhシグナル関連分子発現プロファイル作成:

手術時摘出乳腺組織(乳腺炎、線維線腫、非浸潤性乳管癌症例(DCIS)、微小浸潤癌(DCISM)、浸潤性乳管癌(IDC)におけるER α 発現、Hhシグナル関連分子発現を解析し、両シグナル系抑制療法の治療標的となる乳癌疾患およびその頻度(包括的治療となりえるか)を検証する。

(2) 乳癌組織における乳癌幹細胞同定とER α およびHhシグナル関連分子発現の解析: 乳癌幹細胞に対する治療法としての可能性を検証する目的で、乳癌組織における乳癌幹細胞分画(CD44+CD24-細胞)の存在およびERおよびHhシグナル関連分子の発現を半定量的三重蛍光免疫組織染色法にて解析する。

(3) 細胞レベルでの治療標的機能の同定: ER α およびHER2発現パターンの異なる乳癌細胞株を標的として、ERおよびHh両シグナル阻害(各種阻害剤、RNA干渉法: siRNA)による遺伝子発現ノックダウンによる増殖(FACScan、コロニー形成)浸潤(Matrigel invasion assay)薬剤感受性(FACScan、コロニー形成)に及ぼす影響を解析し、治療標的となり得る機能を同定する。

(4) 免疫不全マウス移植系における包括的治療法としての検証: 細胞移植系; 現在、治療法選択に難渋する形質特性を有する乳癌(CD44+CD24-乳癌細胞など)細胞株を中心に、免疫不全マウス移植系を用いてシグナル阻害剤による治療効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 非腫瘍性乳腺組織、DCIS、微小浸潤を伴うDCIS(DCISM)およびIDCにおけるsonic Hh(Shh)およびGli1の発現を免疫組織学染色を行い解析した。IDCにおけるShh陽性の割合は、他より有意に高かった。Gli1の陽性率は、非腫瘍性乳腺組織からIDCまで、段階的に増加した。

(2) 乳癌組織において乳癌幹細胞分画(CD44+CD24-細胞)にGli1の発現が主に認められた(図1)。FACSで分取したCD44+CD24-細胞およびCD44+CD24+細胞をヌードマウスに皮下移植する実験では、CD44+CD24-細胞を

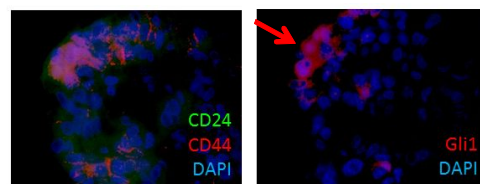


図1. 手術切除乳癌組織の蛍光免疫染色組織像。CD44+CD24-細胞にGli1発現(矢印)が認められる。

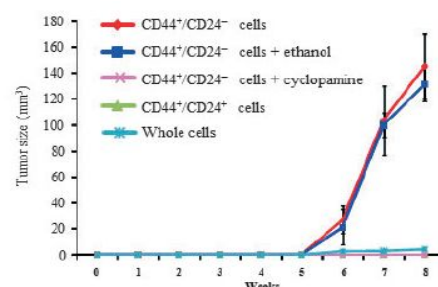


図2. CD44+CD24-細胞における腫瘍増殖能は高いが、Hh阻害剤シクロパミン前処理によりこの腫瘍増殖能は抑制された。

移植した群の腫瘍増殖が有意に高く、Hh阻害剤シクロパミンの前処理によりこの腫瘍増

値は有意に低下した（業績、図2）

（3）MCF-7細胞株にCD24 siRNAを導入した細胞はコントロールと比較し、浸潤能、コロニー形成能が有意に高く、また、Hhシグナルとの関連では、CD24 siRNAを導入した細胞はShh、Gli1の発現が有意に高かった（図3）

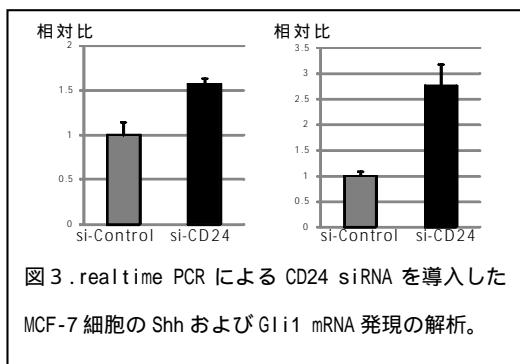


図3. realtime PCRによるCD24 siRNAを導入したMCF-7細胞のShhおよびGli1 mRNA発現の解析。

CD24 siRNAを導入した細胞にShh siRNAを用いて、Shhを抑制すると、浸潤能およびコロニー形成能は有意に低下した（図4）。これらの結果より、CD24分子の制御にShhが関与していることが示唆された。

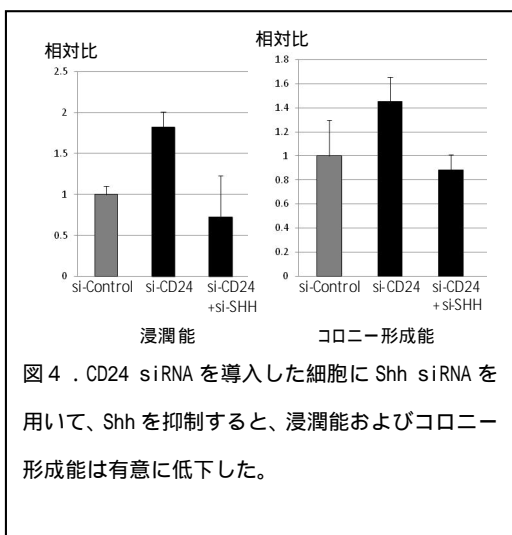


図4. CD24 siRNAを導入した細胞にShh siRNAを用いて、Shhを抑制すると、浸潤能およびコロニー形成能は有意に低下した。

（4）CD24 siRNAを用いCD24を抑制したMCF-7細胞株にさらにShh siRNAを導入した

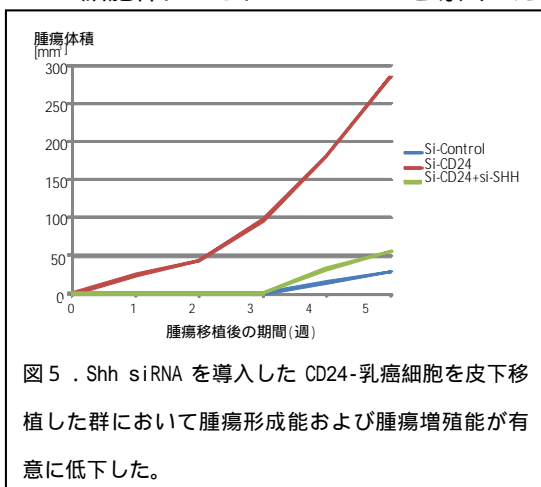


図5. Shh siRNAを導入したCD24-乳癌細胞を皮下移植した群において腫瘍形成能および腫瘍増殖能が有意に低下した。

細胞をマウスに皮下移植した実験では、CD24

を単独で抑制したものと比較し、Shh siRNAを導入したCD24-細胞を皮下移植した群において、腫瘍形成能および腫瘍増殖能が有意に低下する結果が得られた（図5）

（5）ERα陽性乳癌においてはERα経路がHhシグナル系の活性化機序の1つとして相乗的に働いており、ER経路が乳癌の進展に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Nagamatsu I, Onishi H, Matsushita S, Kubo M, Kai M, Imaizumi A, Nakano K, Hattori M, Oda Y, Tanaka M, Katano M, NOTCH4 is a potential therapeutic target for gallbladder cancer, Anticancer Res, 査読有, 34(1), 2014, 69-80.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403446>

Kubo M, Onishi H, Kuroki S, Okido S, Shimada K, Yokohata K, Umeda S, Ogawa T, Tanaka M, Katano M, Short-term and low-dose prednisolone administration reduces aromatase inhibitor-induced arthralgia in patients with breast cancer, Anticancer Res, 査読有, 32(6), 2012, 2385-2390.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641670>

Kai M, Onishi H, Souzaki M, Tanaka H, Kubo M, Tanaka M, Katano M, Semi-quantitative evaluation of CD44+/CD24- tumor cell distribution in breast cancer tissue using a newly developed fluorescence immunohistochemical staining method, Cancer Sci, 査読有, 102(12), 2011, 2132-2138.

Doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02063.x

〔学会発表〕(計11件)

永松 伊織、トリプルネガティブ乳癌に対する新たな治療標的の同定：Notchシグナル系、2013年12月6日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会、いわて県民情報交流センター（盛岡市）

巢山 久実、乳癌細胞におけるCD24分子発現とHh経路活性化の関連の解析、2013年12月5日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会、いわて県民情報交流センター（盛岡市）

巢山 久実、乳癌細胞におけるCD24分子を介したHedgehog経路制御の可能性、2013年4月12日、第113回日本外科学会定期学術集会、マリンメッセ福岡（福岡市）

永松 伊織、トリプルネガティブ乳癌に

対する新たな治療標的の同定：Notch シグナル、2013年4月12日、第113回日本外科学会定期学術集会、マリンメッセ福岡（福岡市）

巢山 久実、CD24-乳癌細胞は、Hedgehog経路を介して浸潤能、腫瘍形成能に関与する、2012年12月13日、第25回日本バイオセラピー学会学術集会、倉敷市芸文館（倉敷市）

甲斐 昌也、半定量的蛍光免疫染色法の開発と乳癌組織中CD44+CD24-細胞解析への応用、2012年4月12日、第112回日本外科学会定期学術集会、幕張メッセ（千葉市）

巢山 久実、乳癌におけるCD44+CD24-細胞は治療標的となり得るか？：CD44+CD24-細胞の生物学的特性の解析、2012年4月12日、第112回日本外科学会定期学術集会、幕張メッセ（千葉市）

巢山 久実、乳癌の浸潤能、腫瘍形成能に対するCD24分子の関与、2011年12月1日、第24回日本バイオセラピー学会学術集会、ダイワロイネットホテル和歌山（和歌山市）

甲斐 昌也、乳癌幹細胞制御療法を考慮した半定量的蛍光免疫組織染色法の開発、2011年12月1日、第24回日本バイオセラピー学会学術集会、ダイワロイネットホテル和歌山（和歌山市）

甲斐 昌也、細胞幹細胞制御療法へ向けた半定量的蛍光免疫染色法の開発：乳癌幹細胞解析への応用例、2011年9月3日、第19回日本乳癌学会学術集会、仙台国際センター（仙台市）

宗崎 正恵、非浸潤性乳管癌から浸潤性乳管癌への進展防止の為の新たな治療戦略Hedgehog signal系、2011年9月3日、第19回日本乳癌学会学術集会、仙台国際センター（仙台市）

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院 先端医療医学部門 腫瘍制御学分野

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 晴生 (TANAKA, Haruo)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90585746

(2) 研究分担者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10145203

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30553276

中野 賢二 (NAKANO, Kenji)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ

研究拠点・教授

研究者番号：00315061

白羽根 健吾 (SHIRAHANE, Kengo)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号：10529803

宗崎 正恵 (SOHZAKI, Masae)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：40610613

（平成23年度まで）

久保 真 (KUBO, Makoto)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60403961

（平成24年度より）