

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790357

研究課題名(和文) 乳癌幹細胞鍵分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of key molecule of breast cancer stem cells

研究代表者

日野原 邦彦 (Hinohara, Kunihiro)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50549467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん幹細胞を制御する重要な分子メカニズムのひとつとして、HRG/ErbBシグナルを同定した。ErbBシグナルはPI3K/NF- $\kappa$ Bを介して乳がん幹細胞の維持に関わっていることを見出し、増殖因子と炎症応答パスウェイのクロストークが重要であることを示した。さらにPI3K下流ではIGF2シグナルが活性化することが乳がん幹細胞の維持に必要なことを明らかにした。また、HRGおよびIGF2によって発現誘導される遺伝子signatureは乳がん悪性度や転移/再発等の予後と強く関連したことから、これらの増殖因子シグナルにより乳がん幹細胞が維持されることで乳がん悪性化につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified HRG/ErbB signaling as a key molecular mechanism on regulating breast cancer stem cell properties. ErbB signaling maintains breast cancer stem cell properties via PI3K/NF- $\kappa$ B pathway, suggesting that crosstalk between growth factor signaling and inflammatory response pathway is important for such regulation. Moreover, IGF2 signaling is required for maintenance of the breast cancer stem cell properties as a downstream mediator of PI3K signaling. Also, HRG signature and IGF signature identified by microarray analysis is strongly associated with both breast cancer grade and prognosis such as metastasis or relapse. These observations suggest that these growth factor signaling have important roles on malignant progression of breast cancer through maintenance of breast cancer stem cell properties.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：breast cancer cancer stem cells HRG ErbB PI3K IGF

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始する前年までに、われわれは乳がん幹細胞において NF-κB をはじめとする炎症性免疫応答パスウェイが活性化していることを見出していたが、なぜそれらが活性化しているのかは不明であった。また増殖因子やサイトカインシグナルと乳がん幹細胞の関わりについても十分な解析がなされていない状況であった。

2. 研究の目的

乳がん幹細胞において炎症性免疫応答がなぜ活性化しているのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

炎症性免疫応答を誘導すると考えられるサイトカインおよびケモカインを乳がん細胞にふりかけ、その後形成されてくる sphere (浮遊球状細胞塊) を詳細に解析することで、乳がん幹細胞におけるその役割を明らかにする。同様の系に適応可能な増殖因子等のリガンドについても併せて検討を行なう。見出した新規リガンド分子による遺伝子発現制御パターンを解析し、下流の鍵分子を同定することで、乳がん幹細胞の維持に関わる新たなパスウェイを明らかにする。

4. 研究成果

IL8, CCL5 等のケモカイン、TNFα 等のサイトカイン、EGF, bFGF, HRG 等の増殖因子を乳がん細胞株にふりかけ、その後の sphere 形成を検討したところ、HRG のみが多く乳がん細胞株の sphere 形成を誘導することがわかった (図 1)。これらの細胞株は HRG の受容体である ErbB3 とそのパートナー分子である ErbB2 の発現レベルがそれぞれ異なる (MCF7 は ErbB2 低発現、HCC1954 は高発現など) が、この受容体レベルと sphere 誘導効率に相関性は見られなかった。

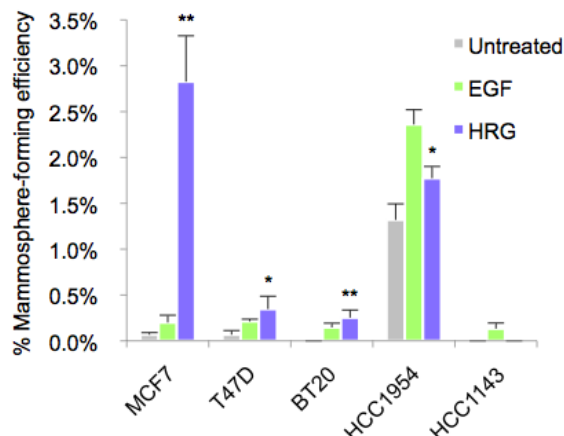


図 1. HRG 刺激により誘導される乳がん細胞株の sphere 形成

またこれらの知見は患者由来の乳がん幹細胞

の培養においても同様に観察されたが、非がん幹細胞の培養においては sphere の形成が認められなかったため、HRG による sphere 形成誘導はがん幹細胞に特異的なものと考えられた (図 2)。

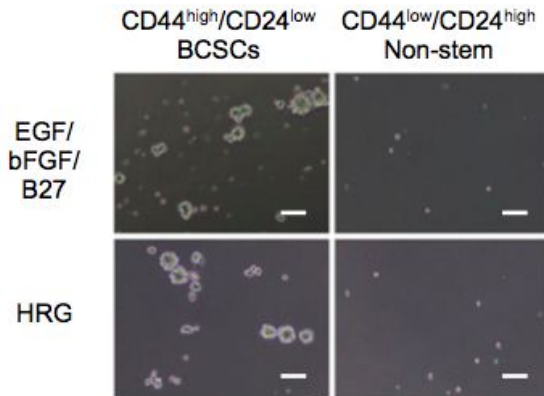


図 2. HRG により誘導される患者由来乳がん幹細胞の sphere 形成

さらに HRG 下流のシグナル伝達について sphere 細胞を用いて解析したところ、ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーを通じて PI3K を活性化し、その下流で NF-κB にシグナルが伝わっていることがわかった (図 3、図 4)。

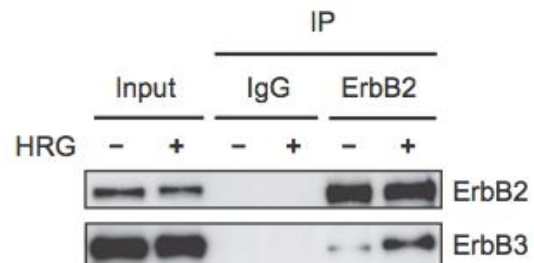


図 3. HRG 刺激による ErbB2/ErbB3 のヘテロダイマー形成

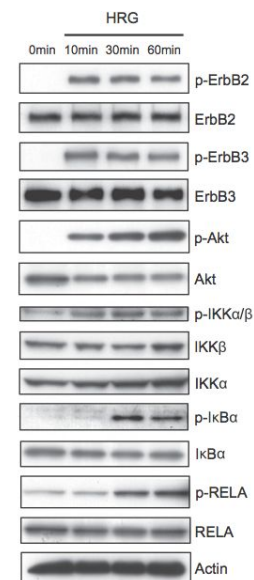


図 4. HRG 刺激による PI3K と NF-κB の活性化

患者由来乳がん細胞を HRG で刺激した際に形成される sphere は、NF-κB inhibitor もしくは PI3K inhibitor 処理によって形成されなくなることから、HRG/PI3K/NF-κB パスウェイが乳がん sphere の形成に必要であることが示唆された (図 5)。

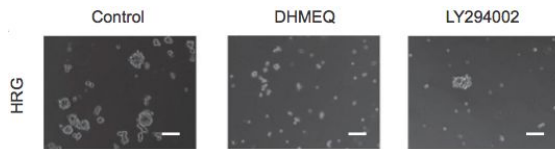


図 5. HRG 刺激による sphere 形成における NF-κB inhibitor(DHMEQ) と PI3K inhibitor(LY294002)の影響

さらに興味深いことに、これらの sphere 形成は ErbB2 の発現が低い患者群においても認められ (図 6) ErbB2 低発現細胞株 MCF7 における結果と一致した。このことは、ErbB2 低発現患者においても、HRG/ErbB2 経路はがん幹細胞の維持において重要な役割を持つ可能性があることを示唆するものである。

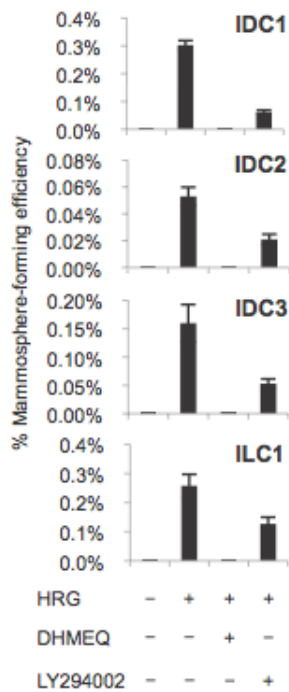


図 6. ErbB2 低発現乳がん患者 (IDC1, IDC2, IDC3, ILC1, 計 4 名) 由来細胞の sphere 形成

次に、PI3K 下流の遺伝子発現変化を解析するために、HRG 刺激および PI3K inhibitor 投与後の乳がん細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果同定した PI3K signature は乳がんのグレードや CD44 乳がん幹細胞 signature と有意に相関した (図 7)。

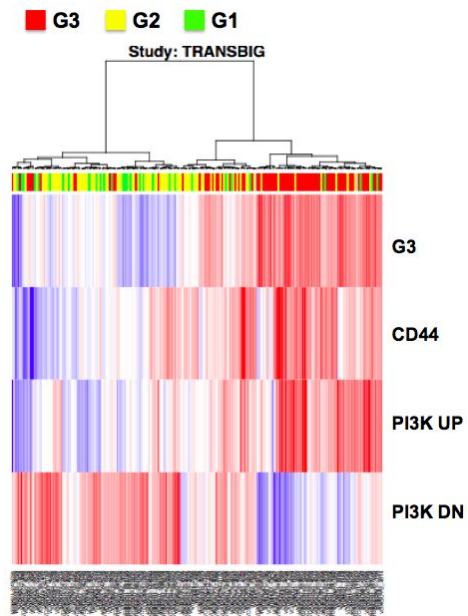


図 7. PI3K signature と Grade3(G3)signature, CD44 signature との相関

この PI3K signature には IGF2 が含まれていたが、IGF2 を中和抗体により阻害すると HRG による sphere 形成が阻害されることから、IGF2 が HRG/PI3K 下流の鍵分子であることが想定された。そこで IGF2 についてさらに詳細な解析を進めたところ、やはり IGF2 も乳がん患者由来細胞の sphere 形成を促進する効果を持つことがわかった (図 8)。

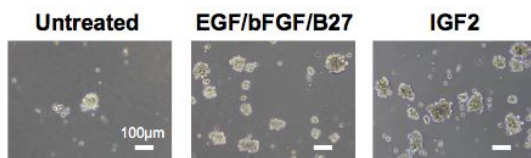


図 8. IGF2 による乳がん患者由来細胞の sphere 形成誘導

また、IGF2 は MCF7 乳がん細胞株の造腫瘍能を高めることもわかった (図 9)。

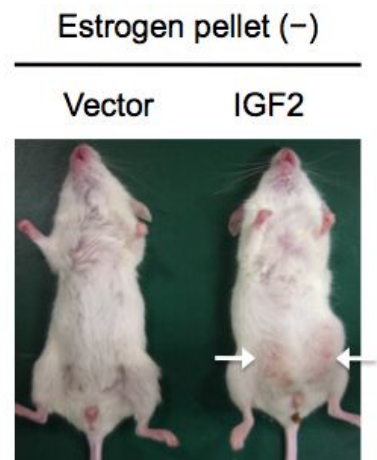


図 9. IGF2 による造腫瘍能の増加

以上より下記の事柄が明らかとなった。

1、HRG は ErbB/PI3K シグナルを介して NF-κB を活性化しており、このシグナル伝達により乳がん幹細胞は維持されている。

2、ErbB2 受容体の発現レベルが低くても、HRG により sphere 形成は誘導されることから、ErbB2 低発現患者においても HRG/ErbB2 経路が重要な役割を持つ可能性が示唆された。

3、HRG/PI3K 経路はダイナミックに遺伝子発現を制御しているが、その発現変化のパターンは乳がんの悪性化やがん幹細胞性との相関を示した。

4、PI3K 下流分子のひとつである増殖因子 IGF2 も乳がん幹細胞の維持において重要な働きをしていることが示された。

これらの知見は、乳がん幹細胞をターゲットとした治療法を確立する上でも重要なものであり、将来的に HRG や IGF2 の免疫染色等を通じた患者の簡便なグループ分けなどを行なうことにより、よりレスポンスのよい治療を行なうことにつながることを期待される。さらには現在 Lapatinib や Herceptin などの適応対象外である ErbB2 低発現患者の中にも、HRG 高発現で治療応答性のグループがいる可能性が示唆されるため、今後臨床的な研究も進めていく事で、さらなる重要な知見が得られることが期待される。

#### 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 4 件)

1, Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB receptor tyrosine kinase/NF-κB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:6584-9.

2, Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Horita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(1):175-81.

3, Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of in vivo administration of reprogramming factors in the mouse liver. *Oncol Lett*. 2013;6(2):323-328.

4, Kohsaka S, Hinohara K, Wang L, Nishimura T, Urushido M, Yachi K, Tsuda M, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Gotoh N, Tanaka S. Epiregulin enhances tumorigenicity by activating the ERK/MAPK pathway in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2014[Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 10 件)

1, Hinohara K, Kobayashi S, Umezawa K, Tojo A, Inoue J, Kanauchi H, Ogawa T, Gotoh N. EGF receptor/ErbB-NFκB signaling for self-renewal of breast cancer stem cells. The 9th Stem Cell Research Symposium, Japan; May 2011.

2, Hinohara K, Kobayashi S, Umezawa K, Tojo A, Inoue J, Masaki Mori, Kanauchi H, Ogawa T, Gotoh N. Heregulin-β1/ErbB signaling regulates self-renewal of breast cancer stem cells through activation of NF-κB. The 70nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Japan; Oct 2011

3, Hinohara K, Kobayashi S, Umezawa K, Masaki Mori, Kanauchi H, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF-κB signaling controls self-renewal of breast cancer stem cells. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Japan; Dec 2011

4, Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Umezawa K, Masaki Mori, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF-κB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. The 10th Stem Cell Research Symposium, Japan; May 2012.

5, Hinohara K, Shimamura T, Kanauchi H, Niida A, Yamaguchi R, Imoto S, Ogawa T, Miyano S, Gotoh N. A PI3K-dependent gene expression program that regulates mammosphere formation of breast cancer cells. The 71nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Japan; Sept 2012

6, Hinohara K, Shimamura T, Fukuda H, Tominaga K, Kanauchi H, Niida A, Yamaguchi R, Imoto S, Tada K, Ogawa T, Miyano S, Gotoh N. A PI3K-dependent gene expression program that regulates mammosphere formation of breast cancer cells. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Japan; Dec 2012

7, Hinohara K, Shimamura T, Fukuda H, Tominaga K, Kanauchi H, Niida A, Yamaguchi R, Imoto S, Tada K, Ogawa T, Miyano S, Gotoh N. ErbB signaling regulates the mammosphere formation of breast cancer. The 10th Japan Research Association For Immunotherapeutics,

Japan; Feb 2013

8, Hinohara K, Shimamura T, Fukuda H, Tominaga K, Kanauchi H, Niida A, Tada K, Ogawa T, Miyano S, Gotoh N. A PI3K-dependent gene expression program that regulates mammosphere formation of breast cancer cells. The 11th Stem Cell Research Symposium, Japan; May 2013.

9, Hinohara K, Shimamura T, Kanauchi H, Niida A, Tuji E, Nishioka K, Tada K, Mori M, Ogawa T, Miyano S, Tojo A, Gotoh N. Insulin-like growth factor signaling regulates breast cancer stem cell properties. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Japan; Oct 2013

10, Hinohara K, Shimamura T, Kanauchi H, Niida A, Tuji E, Nishioka K, Tada K, Mori M, Ogawa T, Miyano S, Tojo A, Gotoh N. Insulin-like growth factor signaling regulates breast cancer stem cell properties. The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Japan; Dec 2013

〔図書〕(計 1 件)

日野原邦彦、後藤典子  
受容体型チロシンキナーゼ ErbB と転写因子  
NF- $\kappa$ B による乳がん幹細胞維持の分子機構  
実験医学 Vol.30 No.14 (9 月号) 2012,  
p2272-2275

〔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 KUNIIHIKO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50549467