

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700968

研究課題名(和文) 乳癌幹細胞およびニッチにおけるEGFシグナル伝達制御の解析

研究課題名(英文) Regulation of EGF signaling transduction in breast cancer-initiating cells and their niches

研究代表者

水谷 アンナ (MIZUTANI, ANNA)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30615159

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)：乳がん幹細胞において、EGF、FGFシグナルの他、TGF- $\beta$ シグナルが関与していることが示唆されるデータが得られた。さらにその標的因子であるESRPについて分子生物学的な解析を行った。ESRPについては、これまで転写レベルでの報告しかないが、本研究によりESRPがタンパク質レベルで機能制御されている可能性を示唆するデータを得た。ESRPはスプライシング制御因子としてさまざまな分子のスプライシングに関わる重要な因子であることから、がん細胞における選択的スプライシングの機序解明の糸口となるデータを得ることができたと考える。

研究成果の概要(英文)：Recently cancer-initiating cells have been considered to be important targets in chemotherapy. Our data using breast cancer cell lines shows transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling is involved in cancer-initiating like cell maintenance in addition to epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF) signaling. We previously showed that epithelial splicing regulatory protein (ESRP) was transcriptionally down-regulated by TGF- $\beta$ . ESRPs are involved in mRNA splicing widely. We investigated the regulatory mechanisms of ESRPs. Here we obtained the data which could be a clue to understand the regulatory mechanism of ESRPs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 乳がん

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん組織内に、幹細胞様の性質を持つ少数の細胞集団が存在し、これらが自己複製するとともに、分化しながら増殖することにより、階層性と多様性を備えたがん組織全体が作られるという「がん幹細胞説」が唱えられるようになった。この癌幹細胞に着目した研究は、世界中の研究者が研究し、非常に注目を集めている研究分野である。

歴史的には、はじめに白血病などの血液腫瘍においてがん幹細胞の存在が示されたが、最近では乳癌などの固形がんにおいても、がん幹細胞の存在が示唆されている。しかしながら、がん幹細胞が自己複製し、がん組織内で維持されるメカニズムについては epidermal growth factor (EGF)シグナルや fibroblast growth factor (FGF)シグナルの関与が言われているものの、依然不明な点が多い。

EGF シグナルは、乳腺上皮細胞の組織幹細胞の自己複製能や分化の制御に関わっていることが報告されている (Dontu G et al. Gene. Dev. 2003, 17, 1235-1270)。近年、乳腺組織幹細胞と乳がん幹細胞が一部近い性質を持っていることが示されている (Mani S. A. et al. Cell 2008, 133, 704-715)。これらのことから、EGF シグナルが乳がん幹細胞にも関与し、重要な役割を果たしている可能性がある。また、transforming growth factor (TGF)-beta ファミリーシグナルなどのシグナルも未分化性に関わると言われていることから、がん幹細胞にも関与している可能性がある (Graf T. and Enver T. Nature 2009, 462, 587-594)。

がんの化学療法において、少数残ったがん幹細胞様の細胞ががんの再発の原因ではないかと考えられてきている。がん幹細胞様の細胞がどのように維持され、そこから娘細胞と考えられる細胞群が増殖してくるのかということの詳細に明らかにすることは、がんの

再発を防御し、がんの根治を目指すものとして、がん治療の標的の研究において重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

がん幹細胞の維持に EGF シグナルや FGF シグナルが重要であると言われているが、未解明な部分も多い。本研究は、乳がん幹細胞および乳がん幹細胞ニッチにおける EGF シグナルの役割について、EGF シグナルの制御因子である fibroblast growth factor receptor substrate (FRS) 3 やその他の EGF シグナル制御因子に着目し、明らかにすることを目的とする。

また、本研究は、EGF シグナルや FGF シグナルに加え、iPS 細胞において幹細胞性の維持との関わりが示唆されている TGF-beta シグナルをはじめ、Wnt シグナルやがんにおいて炎症との関わりがある TNF-alpha などのシグナルに着目し、幹細胞様の性質との関わりについて明らかにすることを目的とする。乳がん細胞株を用いて、EGF シグナルや TGF-beta シグナルががん幹細胞の自己複製能に与える影響の評価を行う。また EGF シグナルや TGF-beta シグナルの制御因子ががん幹細胞の自己複製能に与える影響についても評価する。

さらに、EGF シグナルや TGF-beta シグナルが乳がん幹細胞のニッチに与える影響についても解析を行う。シグナル伝達については、研究が進み、ある分子の活性化持続時間で下流のシグナルの意味が変化するなど、シグナルの微調整が非常に大事であることがわかってきた。本研究では、がん幹細胞におけるシグナル制御機構の詳細な検討を行い、がん幹細胞様の性質を規定するシグナル伝達の微調整のキーファクターを探索するとともに、シグナル間のクロストークについても検討を行う。

本研究は、シグナル伝達の調節機構の解明という基礎的な研究であるが、がん幹細胞の性質についての理解を深め、がんの根治を目標に、がん治療の新たな標的の探索を目指すものである。

### 3. 研究の方法

がん幹細胞様の性質を評価できる実験系の構築を行う。さまざまなシグナルについて検討を行うため、スクリーニングとして効率的で実用的な方法である必要がある。がん幹細胞様の性質の評価には、マウスを用いた限界希釈法によるがん細胞の移植を行いがん細胞の生着とがん組織全体の構築を見る必要がある。しかしながら、これは時間と費用がかかる方法であり、一次スクリーニングとしては効率的ではないと考えられる。そこで、簡易な一次スクリーニングとして、スフィア培養を行うことにした。スフィア培養では、スフィアの数のがん幹細胞の数を表し、スフィアの大きさは娘細胞の増殖を表していると考えられている。

本研究では、Luminal 型の細胞として MCF7 細胞を、Basal 型の細胞として MDA-MB-231 細胞を用いた。Basal 型の乳がん細胞の由来については、さかんに議論が行われているところである。しかしながら、MDA-MB-231 細胞は、上皮系のマーカーの発現が低下していること、間葉系のマーカーを発現していることから、間葉系の性質を獲得した細胞であると考えられている。

TGF-beta シグナルにより、乳腺上皮細胞が上皮 間葉転換を起こすことから、乳がん幹細胞について上皮 間葉転換の観点からも検討を行う。

### 4. 研究成果

がん幹細胞様の性質を評価できる実験系の

構築として、スフィア培養の系を立ち上げた。またスフィア培養できるヒト乳がん細胞株の選定を行った。Luminal 型のヒト乳がん細胞株として MCF7 細胞を、Basal 型のヒト乳がん細胞株として MDA-MB-231 細胞を用いて、スフィア培養を行った。

また、TGF-beta シグナルは乳がんの転移において、上皮 間葉転換に関わり、転移を促進していることが言われている。この上皮 間葉転換ががん幹細胞の維持に関わっていることが示唆される報告がある。これを踏まえ、TGF-beta で上皮 間葉転換を起こすことが知られているマウス乳腺上皮細胞である NMuMG 細胞を用いて、スフィア培養を行った。TGF-beta または TGF-beta の阻害剤である SB431542 を添加して、スフィア培養を行ったところ、TGF-beta 刺激下でスフィアの数が増加し、スフィアのサイズが大きくなった。また SB431542 の添加により、スフィアの数が増加した。このことから、TGF-beta シグナルはがん幹細胞の数にも、娘細胞の増殖にも関与していることが示唆された。

NMuMG 細胞で TGF-beta 刺激を行うと、発現が著しく増加する転写因子として ZEB1 と ZEB2 がある。Basal 型のヒト乳がん細胞株である MDA-MB-231 細胞は、転写因子 ZEB1/2 の発現が高い。また当研究室から乳がんにおいて、ZEB1/ZEB2 によって発現が抑制されている因子として epithelial splicing regulatory protein (ESRP) を報告している。

ESRP は上皮系の細胞で発現しているスプライシング制御因子であり、上皮細胞型のスプライシングを制御している。ESRP は各種がんの予後との関わりが報告されているが、がん幹細胞との報告はわずかである。また、ESRP の制御については、ZEB1 や Twist による転写抑制の報告しかない。そこで、ESRP の制御について、詳細な検討を行った。生化学的な検討により、ESRP がタンパク質レベルで機能制御されている可能性を示唆するデータを得

た。

ESRP はスプライシング制御因子としてさまざまな分子のスプライシングに関わる重要な因子である。このことから、がん細胞における選択的スプライシングの機序解明の糸口となるデータを得ることができたと考える。

## 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 1件)

Minegishi Y, Shibagaki Y, Mizutani A, Fujita K, Tezuka T, Kinoshita M, Kuroda M, Hattori S and Gotoh N. Adaptor protein complex of FRS2b and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation. Cancer Science 104, 345-352, 2013 査読あり DOI 10.1111/cas.12086.

[学会発表](計 2件)

Anna Mizutani, Daizo Koinuma, Kohei Miyazono, An E3 ligase regulates ESRPs. TGF-betaファミリーシグナル国際共同研究拠点第3回国際シンポジウム(2013年10月28, 29日、愛媛、松山)ポスター発表

水谷 アンナ、鯉沼 代造、宮園 浩平、Regulatory mechanism of ESRP1 and ESRP2 proteins、第86回日本生化学会大会(2013年9月11日~13日、神奈川、横浜)ポスター発表

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷 アンナ (ANNA MIZUTANI)

東京大学大学院 医学系研究科 特任研究員

研究者番号 : 30615159

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし