

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461972

研究課題名(和文) ヒト初代培養乳癌幹細胞における浸潤・転移能獲得の分子機構解明

研究課題名(英文) Isolation of primary culture of human breast cancer cells and analysis of molecular mechanism of tumor progression and metastasis

研究代表者

坂東 裕子 (Bando, Hiroko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00400680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホルモン受容体陽性、HER2陰性のいわゆる luminal type 乳癌における癌幹細胞(CSCs)にを中心としたbiologyの解明は急務である。本研究では、乳癌細胞株およびヒト乳癌組織より樹立した乳癌細胞におけるCSCsの機能解析を行い、幹細胞性に影響する要因および薬物療法の影響を検討した。患者検体由来細胞においては、細胞株と異なりheterogeneityが保たれており、治療及び転移再発の過程でER発現の不安定性が認められた。FOXA1はLuminal type乳癌幹細胞のホルモン耐性及び増殖能に関与している可能性が示唆された。また低酸素環境がHIF1を介し、癌幹細胞性の増強に寄与する。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that ER positive and HER2 negative breast cancer patients, so called luminal type breast cancer, can lead to late recurrence compared to other BC subtypes, possibly due to the presence of dormant tumor cells. The mechanisms that maintain cancer stem cells (CSCs) in luminal breast cancer remains obscure. We established luminal breast cancer cells derived from patient tissue and analyzed the potency of CSC and related factors with established luminal breast cancer cell lines. Our findings showed that the CSC population in luminal breast cancer induces ectopic expression of FOXA1. The expression of FOXA1 appears to be involved in the proliferation of immature breast cancer cells. Hypoxic stimuli promote the induction of ALDH activity, suggesting the function of hypoxia on tumor environment may influence BCSC fate.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：乳癌 腫瘍幹細胞 エストロゲン受容体 Luminal type FOXA1 低酸素 HIF1 ホルモン治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の乳癌罹患率の上昇は著しい。近年の乳癌治療は、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2 発現もしくは遺伝子増幅、Ki67 発現状況に基づく臨床的 subtype に細分化され、一定の局所奏効率や予後延長効果をみとめているが、なお死亡率は上昇傾向にある。その背景として、有効な再発転移後の治療が確立していないこと、ホルモン受容体陽性、HER2 陰性乳癌である luminal A と luminal B サブタイプの判別が困難であり、適切な治療選択に至っていないことなどがあげられる。また、近年固形癌における癌幹細胞(CSCs)の概念が注目されており、これらの有する高い腫瘍形成能及び転移能、治療抵抗性により再発転移後の治療が困難となっている可能性が考えられる。乳癌における CSCs のマーカーとしてはこれまで CD44+/CD24-, aldehyde dehydrogenase (ALDH) などが報告されており、CSCs に対する化学療法・放射線療法抵抗性についての報告は数多くされているが、その多くがトリプルネガティブ乳癌細胞株を対象としたものであり、luminal type 乳癌における CSCs に関する検討は未だ不十分である。ホルモン受容体陽性乳癌は全乳癌の約 70%とされる、晩期再発が比較的多いことも明らかとなっている。今後乳癌の多くを占める luminal type 乳癌への治療戦略を考慮するにあたり、CSCs を中心とした biology の解明は急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳癌手術検体または再発乳癌症例の胸水より初代培養した乳癌細胞における CSCs の機能解析を行い、ホルモン治療及び抗癌剤、分子標的薬剤の位置づけを行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究には、細胞株を用いた実験では ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞株である MCF7 及び HCC1500 を用いた。さらに乳癌手術検体または再発乳癌症例の胸水より初代培養した原発性乳癌細胞の株化を試みた。CSCs の機能解析検討では、本研究で樹立したホルモン陽性乳癌再発患者胸水由来細胞 BC#1 を用いた。樹立された BC#1 の

characterize には、細胞免疫化学染色によるホルモン受容体、HER2、サイトケラチン(CK)8 及び 5/6、並びに qPCR における ER 発現を用いて評価した。

癌幹細胞マーカー解析：Aldefluor を用いた FACS での ALDH 発現解析を行った。遺伝子発現解析には quantitative RT-PCR を、タンパク発現解析には western blot またはセルブロックに対する免疫組織化学染色を用いた。

4-hydroxytamoxifen(4-OHT)の幹細胞性に対する影響の検討：MCF7 cell 及び BC#1 を用いて 4-OHT 添加 mammosphere 培養を行った。添加 4-OHT 濃度は growth inhibition curve を作成し 5  $\mu$ M とした。これにより生成された mammosphere に対しても RNA 抽出を行い、qPCR により TAM 添加/非添加における多能性遺伝子及び ER、FOXA1 の発現を比較した。

FOXA1 の幹細胞性への影響の検討：shFOXA1 MCF7 cell 及び shControl MCF7 cell を樹立した。Knock down 効果は FOXA1 protein 発現の低下及び FOXA1 下流遺伝子である ER、AGR2 遺伝子の抑制により確認した。これらの細胞を用いて、mammosphere assay, colony-formation assay を用いて CSCs の自己複製能及び増殖能を評価した。

低酸素環境が乳癌幹細胞性に与える影響の検討：MCF7 cell 及び BC#1 を用いて低酸素環境に対する反応性を FACS による ALDH 発現、その要因を HIF1 ノックダウンモデルにより評価した。

## 4. 研究成果

(1) BC#1 の初発乳癌組織におけるホルモン受容体等の発現は、ER 陽性、PgR 陽性、HER2 陰性乳癌であったが、樹立細胞は ER 陰性、PgR 陽性、HER2 陰性と初発組織と発現状況が異なる結果であった。

ER 発現を qPCR で解析した結果、ER 陰性乳癌株である MDA-MB-231 と比較すると有意に高発現であった。BC#1 と初発乳癌組織におけるホルモン受容体発現の乖離は、転移再発の過程での発現強度の変化または培養環境における ER 発現の不安定性が影響しているものと考えた。ER 下流因子である PgR の発現がみられることから、BC#1 は luminal type 乳癌と考え今回の研究に使用した。サイトケラチン発現解析に関しては、CK8 強陽性、CK5/6 も 5%程度陽性であり、乳癌細胞に一致する結果であるとともに、患者検体由来細胞においては、細胞株と異なり heterogeneity が保たれていることが示唆された。

(2) MCF7, HCC1500, BC#1 の 3 細胞系における癌幹細胞性の検討では、癌幹細胞マーカー発現及び mammosphere assay においていずれも BC#1 が最も癌幹細胞性が高い結果であり、両指標は癌幹細胞の存在に関し相関すると考えられた。また、MCF7 の接着培養細胞及び mammosphere 培養細胞における ALDH 活性の比較により、mammosphere 培養が癌幹細胞を濃縮していることを確認した。

(3) ALDH 活性を指標に flow cytometer で分取した ALDH-high 群と ALDH-low 群における多能性遺伝子及び ER 関連遺伝子発現の比較では、明らかな統計学的有意差は認めなかったが、ALDH-high 群で FOXA1 の発現が高い傾向にあった。接着培養群と mammosphere 培養群における比較では、統計学的有意差をもって mammosphere 培養群において多能性遺伝子及び FOXA1 遺伝子、FOXA1 protein が高発現していた。

(4) 4-OHT 添加 mammosphere assay では、4-OHT 添加群において非添加群と比較し明らかに mammosphere 形成数が低下したが、残存し形成された

mammosphere に対する遺伝子発現解析では、非添加群と比較し 4-OHT 添加群において多能性遺伝子及び FOXA1 遺伝子の高発現が認められた。このことから 4-OHT 耐性 mammosphere が FOXA1 を高発現することが示唆された。

(5) FOXA1 knockdown MCF7 cell を用いた解析では、mammosphere 形成数において 2 群間に差を認めなかったが、colony-formation assay では knockdown cell において明らかな colony 形成低下を認め、mammosphere 特異的な FOXA1 の過剰発現機序の存在及び colony-formation assay に反映される FOXA1 依存性 CSC 増殖能維持が示唆された。

(6) ALDH 陽性細胞は陰性細胞に比較して低酸素応答性が強く、HIF1 のノックダウンにより、幹細胞性の低下が認められた。(論文投稿中)

まとめ：本研究結果より、FOXA1 は Luminal type 乳癌幹細胞のホルモン耐性及び増殖能に関与している可能性が示唆された。Mammosphere 培養系における FOXA1 過剰発現の機序及びその細胞生物学的意義につき更なる検討を行うことで、luminal type 乳癌における乳癌幹細胞及び晩期再発の制御に寄与すると考える。

## 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)

FOXA1 expression affects to the proliferation activity of luminal breast cancer stem cell populations. Kana Tachi, Akira Shiraishi, Hiroko Bando, Toshiharu Yamashita, Ikki Tsuboi, Toshiki Kato, Hisato Hara, and Osamu Ohneda. Cancer Science, Volume 107, Issue 3, pages 281–289, 2016. doi: 10.1111/cas.12870. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

田地 佳那、坂東 裕子、市岡 恵美香、池田 達彦、井口 研子、大根田 修、原 尚人：  
乳癌検体由来細胞における  
characterizationの確立。第24回日本乳癌  
学会学術総会（東京ビッグサイト、東京  
都）6月，2016

池田達彦，澤 文，古屋 舞，市岡恵美香，  
齋藤 剛，清松裕子，井口研子，坂東裕子，  
原尚人： 当院におけるプロゲステロンレ  
セプター陰性乳癌症例の臨床的検討。 第  
22回日本乳癌学会学術総会（大阪国際会  
議場、大阪市）7月，2014

坂東裕子：血管新生から考える乳癌治療。  
第51回日本癌治療学会学術集会（国立京  
都国際会館、京都市）10月，2013

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂東 裕子 (Bando Hiroko)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：00400680

### (2) 研究分担者

大根田 修 (Ohneda Osamu)  
筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：30311872

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

田地 佳那 (Tachi Kana)  
筑波大学大学院 博士課程

白石章 (Shiraishi Akira)  
筑波大学大学院 博士課程