

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461373

研究課題名(和文) 乳癌の可塑性、ホルモン療法耐性の起源と癌幹細胞性

研究課題名(英文) Plasticity of breast cancer, origin of hormonal therapy resistance and cancer stemness.

研究代表者

林 慎一 (Hayashi, Shin-ichi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60144862

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)：これまでERE-GFP導入ER陽性乳癌細胞から樹立した8種類のホルモン療法耐性モデル細胞の研究から、ドライバーシグナル経路の変化による複数の耐性機序の関与を明らかにした。そこでAI耐性株、fulvestrant耐性株等を用いて、その癌幹細胞性を、スフェア形成能、SP画分解析、CD44/CD24発現のFACS解析などから検討したところ、ER発現を有するホルモン療法耐性株は一様に高い癌幹細胞性を示すのに対して、ER発現を失ったホルモン療法耐性株は従来の癌幹細胞性マーカーは低いことが明らかとなった。進行再発乳癌の新規治療法開発に重要な知見と思われる。

研究成果の概要(英文)：We have established 8 kinds of hormonal therapy resistant cell lines from ER-positive breast cancer cells which were stably introduced ERE-GFP reporter plasmid. The analysis of these cell lines revealed individual molecular mechanisms of hormonal therapy resistance. Then, we analyzed cancer stemness property of these resistant cell lines (AI-resistant and fulvestrant resistant cell lines) in terms of sphere formation, side population, CD44/CD24 expression etc. The resistant cell lines which have high ER expression showed high cancer stemness property, but cell lines which lost ER expression indicated low cancer stemness marker expression. These findings will provide useful information to develop new therapeutic strategy for metastatic breast cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ER発現 ホルモン療法耐性 シグナル経路 癌幹細胞性 乳がん

1. 研究開始当初の背景

乳癌の罹患率は我が国において急速に上昇している。乳癌の発生・進展にはエストロゲンが深く関与しており、またエストロゲンとその受容体(ER)がホルモン療法の標的となっており、進行再発癌、術後補助療法、術前治療と、幅広い局面で施行され、良い成績を上げている。そのホルモン療法の中心となっている薬剤が AI 剤である。しかし近年、その耐性が問題となっている。

エストロゲンは各種標的臓器においてリガンド依存性転写因子でもある ER を介して標的遺伝子の発現を制御することにより、細胞の増殖分化を調節しており、その機序が乳癌の増殖・進展にも関与している。特に閉経後乳癌においては癌部周囲の間質繊維芽細胞内のアロマトラーゼによって E2 が生合成され癌細胞に供給されており、これが AI 剤の標的となっている。また、以前から培養細胞を用いた基礎的な研究からも ER の活性化はリガンドのみでなく、リン酸化などの蛋白修飾によっても起こることが示唆されており、これがホルモン療法耐性と関係していると考えられている。

我々はこれまでの ER に関する様々な研究から、乳癌における ER の機能と重要性を明らかにし、その臨床応用を目指してきた(総説 Cancer Sci., 100: 1773-1778, 2009)。それらの研究の中で細胞に ERE-GFP を安定導入した ER 陽性乳癌細胞を樹立して生細胞の ER 活性をモニターできるレポーター細胞として用いた(原著論文 Cancer Res., 65: 4653-4662, 2005)。先の文科省科研費(平成 23 年-25 年)の支援を受け、この細胞を親株として、長期エストロゲン枯渇状態や in vivo に近い、アンドロゲン添加状態や AI 剤添加状態で生き残ったコロニーを ER 活性による GFP 蛍光を指標にして複数株を単離・樹立することによって 6 種類の耐性機序の異なった耐性モデル細胞を作製した。そしてそれらの characterization を詳細に行った結果、従来も報告されていた PI3K-Akt 経路を介した ER のリガンド非依存的活性化による耐性細胞が得られたが、他にもエストロゲン様活性を有するアンドロゲン代謝産物を産生して利用する耐性株(原著論文 Breast Cancer Res. Treat. 139: 731-740, 2013)やアンドロゲンそのものに依存してアンドロゲン受容体を介して増殖促進するものなど、これまでに知られていない複数の新規耐性機序を明らかにした。

今後、さらに研究を進めて、それぞれの機序を識別するバイオマーカーを明らかにし再発乳癌の個別化を可能にすることで 2 次治療の奏効性を上げ得るかもしれない。しかし一方で、実臨床においては、これらの複数の多様な耐性機序に完全に対応するのはかなり困難と思われる。また、2 次治療においてもシグナルの可塑性を利用して他の耐性機序を容易に獲得する可能性が高い。そこで、

より根本的な耐性克服の解決策が望まれる。

我々はこの間の研究の中で、ホルモン療法耐性細胞のスフェロイド培養や FACS 解析の結果から、ER 陽性細胞のホルモン耐性獲得に癌幹細胞性が関係することを示唆する観察結果を得ている。そこで、この乳癌幹細胞性とホルモン耐性の関係を分子生物学的レベルで明らかにし、そこを標的とした治療戦略を見出すことでホルモン療法耐性獲得を根本的に回避する方法を確立したい。また、現在臨床開発中の ER 陽性進行再発乳癌を対象とした新規分子標的薬についてもホルモン療法耐性に関する乳癌幹細胞性について検討していきたい。

2. 研究の目的

近年の閉経後乳癌の内分泌治療の中心である第 3 世代のアロマトラーゼ阻害剤(AI)が臨床に用いられるようになって 10 年以上が経過し、近年ではその再発や耐性が大きな問題となっている。これまで我々は ERE-GFP 導入 ER 陽性乳癌細胞から樹立した各種耐性モデル細胞の研究から、細胞内エストロゲンシグナル経路の変化による複数の機序が本耐性に関与していることを明らかにした。その中で、ホルモン耐性と乳癌幹細胞性との関係も疑われた。そこで、この乳癌幹細胞性とホルモン耐性との関係を分子生物学的に明らかにし、耐性克服のための根本的解決策を得るヒントとしたい。

3. 研究の方法

ERE-GFP レポーター遺伝子を安定導入した ER 陽性乳癌細胞 MCF7(MCF7-E10) や T47D(T47D-TE8) から生細胞中のエストロゲン活性をモニターしながら樹立した機序の異なる 6 種のホルモン療法耐性細胞を用いて、各種の方法によってその幹細胞性を解析する。それによって ER 陽性乳癌細胞の幹細胞性とエストロゲンシグナルの多様性との関係、シグナルの可塑性の原因を探る。仮説として luminal 型乳癌の癌幹細胞の存在が、alternative エストロゲンシグナルの起源となっているのではないかと考えている。まずこのことを明らかにしたい。そしてその luminal 型乳癌幹細胞由来の可塑性を遮断する戦略を見出したい。さらに ER 陽性乳癌の臨床検体(手術試料)を用いて、幹細胞性と ER 活性や各耐性と関連する因子の解析から培養細胞で得た結果の検証を行う。

- (1) 6 種のホルモン療法耐性細胞の FACS 解析による SP 画分の解析、CD44/CD24 発現の FACS 解析、スフェア形成能解析、各種幹細胞関連遺伝子、EMT 関連遺伝子の mRNA 発現解析等を行い、幹細胞性に関する基本的データを集める。
- (2) SP 画分の見られるものからは、SP 細胞を分取し、上記と同様の解析を行い、その character を明らかにする。
- (3) 6 種の耐性細胞の耐性機序の特徴によっ

ていくつかのカテゴリーに分類し、上記のすべてのデータをカテゴリー間に着目することによってその特徴を詳細に解析する。特に ER の有無、そして ER 活性の強弱 (GFP 蛍光のモニタリングによって容易に追跡可能) は、Luminal 型乳癌においては重要な指標となるので、この点を重視する。他には、細胞内リン酸化シグナル経路依存性のもの、ステロイド代謝経路の変化による耐性などがあり、それらが幹細胞性とのような関係にあるのか推察する。必要に応じ、それらの経路に関わる遺伝子の発現を検討する。

- (4) これら耐性株の *in vitro* での浸潤能などのバイオアッセイやスフェア培養下での各種薬剤感受性などを検討し、前年度に得られた各種幹細胞性の指標と比較検討を行う。特に各種ホルモン療法剤のみでなく、耐性機序との関係が推察される細胞内リン酸化シグナル因子を標的とした分子標的治療薬の効果と、その幹細胞性に与える影響を検討する。
- (5) これら耐性株の *in vitro* での浸潤能などのバイオアッセイやスフェア培養下での各種薬剤感受性などを検討し、前年度に得られた各種幹細胞性の指標と比較検討を行う。特に各種ホルモン療法剤のみでなく、耐性機序との関係が推察される細胞内リン酸化シグナル因子を標的とした分子標的治療薬の効果と、その幹細胞性に与える影響を検討する。

4. 研究成果

乳癌幹細胞分画の指標として、細胞表面マーカーの CD44+/CD24- の発現パターンを解析した。その結果、各種ホルモン療法耐性株は親株とは大きく異なる発現パターンを呈した。ER 陽性の AI 耐性株では高く、ER 陰性の AI 耐性株では低かった。SP 分画の解析でも下図のようにほぼ同様の結果を示した。

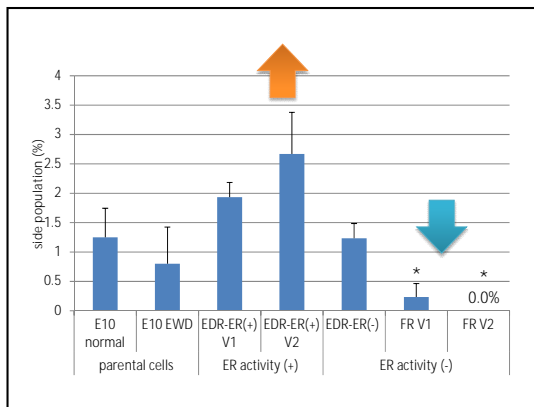


図 1. 各種耐性株の SP 画分

一方、ALDH 活性は ER 活性陰転化の耐性株において高かった。すなわち、耐性株においては ER 発現の有無によって癌幹細胞性が異なることが示唆された。これらの結果をまとめると次の表のようになる。

	ER	Cell line	CD44+/CD24-	Side population	ALDH1 活性
Luminal	ER(+)	E10	L	L	L
ホルモン療法耐性	ER(+)	EDR-ER(+)	H	H	IM
	ER(+)? (-)	EDR-ER(-)	L	L	H
		FR	L	L	H
Basal-like	ER(-)		H	-	H

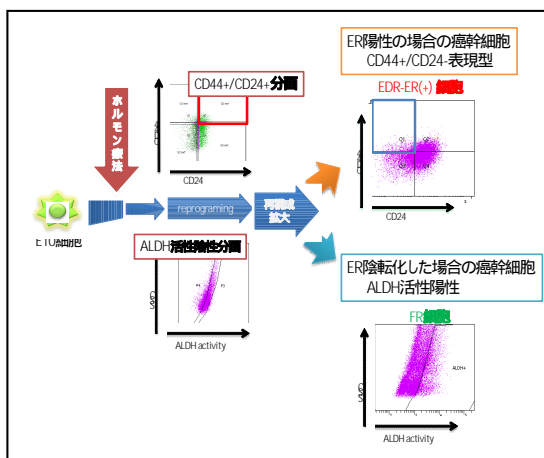
次に、親株 E10 細胞と各種ホルモン療法耐性細胞株について細胞遊走能、浸潤能を検討した。その結果、ER が陰転化した細胞、ならびに fulvestrant 耐性細胞において細胞遊走能、浸潤能ともに親株や ER 陽性耐性株に比べて低かった。

さらにエストロゲンを追加して ER 活性を上昇させた際に ER 陽性のホルモン療法耐性株の乳癌肝細胞分画においてどのような因子が関与しているかを検討した。その結果、癌幹細胞性との関連が報告されている上皮間葉転換関連遺伝子や幹細胞関連遺伝子のうち、Zeb1 と Snail, KLF4 が誘導された。一方、CD24 の発現は低下した。特に Zeb1 の mRNA のエストロゲン誘導性が CSC 分画の CD44+/CD24- 分画で高く、ホルモン療法耐性細胞の ER を介した癌幹細胞性の上昇に関与する可能性が示された。

一般的に乳癌幹細胞性が高いといわれる ALDH 活性陽性細胞の割合が特に高かった Fulvestrant 耐性細胞 (FR 細胞) に着目して、FR 細胞の ALDH 活性陽性分画の維持に関わる因子の検索を試みたところ、FR 細胞は HER family の発現と Src のリン酸化レベルが高く、Her 阻害剤である Lapatinib と Src 阻害剤である Dasatinib によって増殖が抑制されることがわかった。これらの薬剤の ALDH 陽性分画への影響を検討したところ、Dasatinib と Wnt シグナル阻害剤である XAV939 添加によって ALDH 活性陽性の割合が上昇した。FR 細胞における ALDH 活性陽性分画の維持に HER family, Src, Wnt シグナルが関与しているか更なる検討が必要である。

これまでに結果から ER 陰転化ホルモン療法耐性細胞の癌幹細胞性は CD44+/CD24- の指標では低下が示されるものの ALDH 活性は上昇することが示され、また ER 陰転化乳癌細胞の予後は一般的に悪いことから、予後と関連する悪性化に関する幹細胞性は ALDH を指標とするべきかもしれない。すなわち、ホルモン療法耐性の生じる起源と耐性獲得後の癌幹細胞に下図のように考えられた。

またホルモン療法が期待できない ER 陰転化細胞の新規治療手段として、ER を陽転化させ、予後の良い幹細胞性を回復する手段としてエピゲノム制御の可能性を探った。ER 陰転化 AI 耐性細胞や FR 細胞の ESR1 遺伝子の上流を解析したところ、特に FR 細胞においてプロモーター領域の広範なメチル化が確認



された。HDAC 阻害剤、HMT 阻害剤、EZH2 阻害剤などの各種エピゲノム制御薬の効果を検討したところ、EZH2 阻害剤である DZnep によって AI 耐性 ER 陰転化細胞において ER の再発現が認められた。その機序についてはさらなる検討が必要であるが、このようなエピゲノム修飾薬によってホルモン療法耐性株の幹細胞性を変化させることも可能かもしれない。

また、現在臨床開発中である細胞内リン酸化シグナル制御因子である PI3K や mTOR の阻害薬、また細胞周期阻害薬 CDK4/6 阻害剤の効果についても検討を行い、それぞれ、特定のホルモン療法耐性機序に有効であることが確認されたが、癌幹細胞性との関係は今後さらなる検討を要する。

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 13 件)

Tsuboi K, Nagatomo T, Gohno T, Higuchi T, Sasaki S, Fujiki N, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Niwa T, Hayashi S. Single CpG site methylation controls estrogen receptor gene transcription and correlate with hormone therapy resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 査読あり in press, 2017. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.04.001.

Tsuboi K, Kaneko Y, Nagatomo T, Fujii R, Hanamura T, Gohno T, Yamaguchi Y, Niwa T, Hayashi S. Different epigenetic mechanisms of ER α implicated in the fate of fulvestrant-resistant breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 査読あり 167:115-125,2017.doi:10.1016/j.jsbmb.2016.11.017.

Higuchi T, Endo M, Hanamura T, Gohno T, Niwa T, Yamaguchi Y, Horiguchi J, Takeyoshi I, Hayashi S. Contribution of estrone sulfate to cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant, hormone receptor-positive breast cancer. *PLOS ONE* 査読あり 11(5):e0155844,2016.

doi:10.1371/journal.pone.0155844.eCollection

Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi S. Differences in stemness properties associated with the heterogeneity of luminal-type breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, 査読あり

15(2),e93-103,2015.doi:10.1016/j.clbc.2014.11.002.

Fujii R, Hanamura T, Suzuki T, Gohno T, Shibahara Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Ohnuki K, Kakugawa Y, Hirakawa H, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N, Hayashi S. Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 査読あり 144: 513-522, 2014. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.08.019.

Higuchi T, Gohno T, Nagatomo T, Tokiniwa H, Niwa T, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Hayashi S. Variation in use of estrogen receptor a gene promoters in breast cancer compared by quantification of promoter-specific mRNA. *Clin. Breast Cancer*, 査読あり 14(4): 249-257, 2014. doi:10.1016/j.clbc.2013.10.015.

Yamaguchi Y, Seino Y, Takei H, Kurosumi M, and Hayashi S. Detection of estrogen-independent growth-stimulating activity in breast cancer tissues: implication for tumor aggressiveness. *Cancer Microenvironment*, 査読あり 7: 21-23, 2014. Doi:10.1007/s12307-013-0139-x

Hanamura T, Niwa T, Gohno T, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism pathways in hormone responsive primary breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 査読あり 143(1), 69-80, 2014. doi:10.1007/s10549-013-2788-3.

Fujiki N, Konno H, Kaneko Y, Gohno T, Hanamura T, Imami K, Ishihama Y, Nakanishi K, Niwa T, Seino Y, Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen response element-GFP (ERE-GFP) introduced MCF-7 cells demonstrated the coexistence of multiple estrogen-deprivation resistant mechanisms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 査読あり 139,61-72,2014.Doi:10.1016/j.jsbmb.2013.08.012

[学会発表](計 43 件)

Shunta Sasaki, Kouki tsuboi, Toshihumi niwa, Shin-ichi Hayashi: 乳がんにおけるホルモン療法耐性獲得に伴うヒストン修飾の変化. 日本分子生物学会年会(パンフィコ横浜)2016年11月30日~12月2日

坪井洸樹、長友隆将、金子陽介、藤井里

圭、花村徹、山口ゆり、丹羽俊文、林慎二：Fulvestrant 耐性乳癌における ER 発現のエピジェネティクス制御と可塑性. 第 17 回ホルモンと癌研究会 (倉敷アイビースクエア) 2016 年 6 月 24 日 ~ 25 日

Kouki Tsuboi, Takamasa Nagatomo, Yosuke Kaneko, Mariko Kimura, Tatuyuki Gohono, Toru Hanamura, Rika Fujii, Yuri Yamaguchi, Toshifumi Niwa, Shin-ichi Hayashi：フルベストラント耐性乳癌モデル細胞における ER 発現抑制機構の解明とエピジェネティック治療薬の試み. 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋国際会議場) 2015 年 10 月 8 日 ~ 10 日

内海加奈美、佐藤望、仁平有紀、金子陽介、藤木夏、花村徹、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎二：ホルモン療法耐性乳癌細胞における癌幹細胞性及び耐性の起源. 第 23 回日本乳癌学会学術総会 (東京ビッグサイト) 2015 年 7 月 2 日

内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎二：乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性. 第 15 回乳癌最新情報カンファランス (松本ホテルプエナピスタ) 2014 年 8 月 8 日 ~ 10 日

内海加奈美、佐藤望、山口ゆり、林慎二：乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪国際会議場) 2014 年 7 月 10 日 ~ 12 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 慎一 (HAYASHI Shin-ichi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60144862