

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870729

研究課題名(和文) 乳癌幹細胞の由来の解明 乳腺幹細胞可視化マウスの生体深部イメージングを通して

研究課題名(英文) Identification of the origin of breast cancer stem cells through live cell imaging of the mice for visualization of mammary stem cells

研究代表者

厚海 奈穂(ATSUMI, Naho)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90612151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：2006年にShackletonらとStinglらはそれぞれ初めて、移植時に乳腺組織の再構築が可能である細胞集団の単離方法を報告した。しかし乳腺幹細胞の局在はよくわかっておらず、特異的な幹細胞マーカーの同定が必要であった。本研究では、当研究室で作出した多色細胞系譜追跡法を用いて、乳腺組織幹細胞マーカーを探索・同定する方法を開発した。さらに、乳がん自然発症モデルマウスを組み合わせることで乳がん発症過程を通して観察し、がん幹細胞マーカーの候補を見出した。この乳腺幹細胞可視化法を用いて解析を進めることで、癌幹細胞の元になる細胞についての知見が深まり、乳癌の発癌メカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The cell population containing mammary stem cells, which reconstitutes the whole mammary tissues when allotransplanted into fat pad, was identified by Shackleton et al. and Stingl et al. in 2006. However, it was largely unknown about the localization of mammary stem cells due to absence of specific stem cell marker. Here we developed the methodology for the identification of mammary stem cell marker by multicolor lineage tracing using Rosa26-rainbow mice we previously developed. In addition, combining with model mice for breast cancer, we found the candidate markers for breast cancer stem cells. This study will lead to the elucidation of the mechanism for breast cancer development through identification of the origin of breast cancer stem cells.

研究分野：幹細胞生物学、分子細胞生物学、腫瘍細胞生物学

キーワード：乳腺幹細胞 がん幹細胞 細胞系譜追跡

1. 研究開始当初の背景

【乳癌幹細胞とその由来を同定する重要性】  
 - 近年がん幹細胞仮説が提唱され、白血病に続いて様々な種類の固形癌幹細胞が存在することが報告されてきた。がん幹細胞は、高い腫瘍形成能を持ち、がんの増殖や維持に必要な細胞と定義される (Reya et al., Nature, 2001)。がん幹細胞を攻撃すればがん細胞全体を死滅させることができ、新しい治療戦略に繋がる可能性がある。

【癌幹細胞を同定する手法の問題点】- これまでのがん幹細胞は次のような方法で同定されてきた。まず、がん細胞集団全体から、特定の分子を発現する細胞集団をセルソーターにより単離する。これを免疫不全マウスに移植して腫瘍形成能を評価する。いくつかの乳癌幹細胞マーカーもこの方法によって報告されている。この時の固形癌幹細胞の“腫瘍形成能”は、レシピエントマウス基質細胞との接着能や、移植部位での増殖能は反映していると考えられる。しかし、実際の発癌あるいは癌進展の過程を完全に再現しているかは疑問である。この欠点を補うために既存の移植モデルでは次の点を確認してきた。癌幹細胞を移植して形成された腫瘍の組織型が、癌細胞集団全体を移植して形成された腫瘍の組織型を再現するという点である。しかしこの方法も、形成された後の癌組織のみを評価しているにすぎず、癌幹細胞が生体内で実際にどのようにふるまって癌組織を形成したかはわからない。

【正常乳腺幹細胞】- 正常乳腺組織は次のように形成されると考えられてきた。乳腺幹細胞が前駆細胞を経て筋上皮前駆細胞や管腔上皮前駆細胞に分化し、-1 筋上皮前駆細胞は筋上皮細胞へ、-2 管腔上皮前駆細胞は管腔上皮細胞や腺房細胞に分化する。しかし、乳腺幹細胞や前駆細胞が存在するか自体が曖昧であった。2011年に Keymeulen らは、胎仔 (Embryo; E) 期に K14 を発現する細胞が乳腺前駆細胞であると新たに報告した。また、以前からの予想通り、この乳腺前駆細胞が筋上皮前駆細胞と管腔上皮前駆細胞に分化することを確認した。乳腺の発育は胎仔期の後は一旦休止し、思春期、妊娠期に再び増加して新たな乳腺分岐を形成する。Keymeulen らは、思春期以降の乳腺では、筋上皮前駆細胞と管腔上皮前駆細胞がそれぞれ増えることで発育していると報告した。この時乳腺幹細胞が、ごく稀であっても存在するかどうかは不明である。乳腺幹細胞が発達段階で存在するかも不明であった。

2. 研究の目的

(1) いくつかの乳腺幹細胞マーカー (候補) 陽性細胞を多色標識できるマウスをそれぞれ作出し、可視化する。さらに、乳腺幹細胞

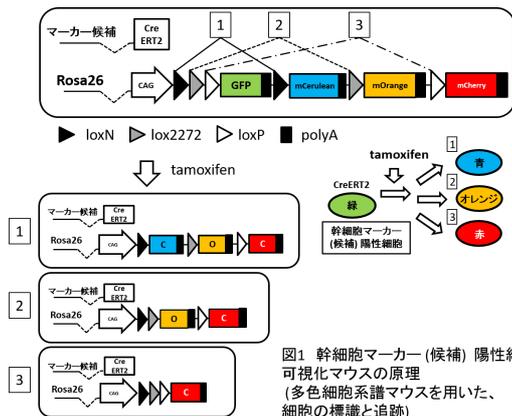
マーカー (候補) 陽性細胞の系譜を追跡することで、成体および胎仔期 (発達段階) で正常乳腺組織幹細胞を同定する。

(2) 乳癌幹細胞を同定する - さらに、同定した乳腺幹細胞を標識した後、その系譜を癌化過程で追跡する。

3. 研究の方法

(1)-1 既存の幹細胞マーカーが正常乳腺においても幹細胞マーカーであるかを検討する - CD44 や CD133 等、異なる組織で共通する正常組織幹細胞マーカーが存在する。このため、乳腺幹細胞マーカーが他組織における幹細胞マーカーと共通である可能性を検討する。

この解析の際に、当研究室で開発した Rosa26-rainbow マウス (Tanaka T et al., Nat Cell Biol, 2013) を用いた多色細胞系譜追跡法を実施する。この方法は、幹細胞だと予測したマーカー遺伝子の下流で CreERT2 を発現するような遺伝子改変マウスと、Rosa26-rainbow マウスとの交配により得られた産仔を使用して行う (図1)。これを「幹細胞マーカー (候補) 陽性細胞可視化マウス」と呼ぶ。Rosa26-rainbow マウスは、最初は全身の細胞が緑色である。Cre による DNA 組換えによって 3 セットの loxP 及び loxP 変異体配列の内の1つがランダムに切り出されると、青/オレンジ/赤のいずれかの蛍光蛋白質を発現するようになるマウスである。従って、幹細胞マーカー (候補) 陽性細胞可視化マウスにタモキシフェンを投与すると、幹細胞と予測した細胞のみが 3 色いずれかの蛍光蛋白質で標識される。標識は、細胞が分裂・分化した後も子孫の細胞に受け継がれる。



(1)-2 他の乳腺幹細胞マーカーを探索する - 既存の幹細胞マーカー分子が乳腺幹細胞マーカーであるとは限らない。また、複数のマーカーを組み合わせることで幹細胞が定義できる可能性もある。そこで、乳腺の発達に重要だと報告がある分子を中心として、幹細胞マーカーであるかを検討する。これらの遺伝子のプロモーター下で CreERT2 を発現する BAC transgenic (BAC Tg) マウス

を作出し、(1)-1 と同様に、多色細胞系譜マウスと交配して解析する。

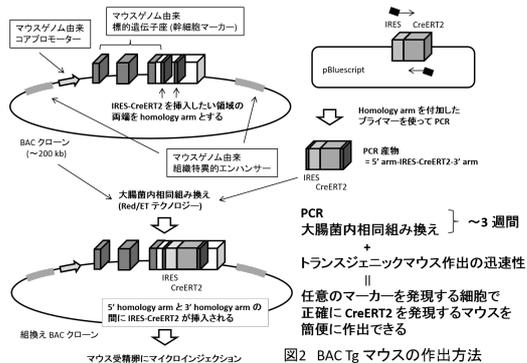
(2) 乳癌幹細胞を同定する — さらに、同定した乳腺幹細胞を標識した後、その系譜を癌化過程で追跡する。この解析のために、上述の乳腺幹細胞可視化マウスと乳癌自然発症マウスとの交配により産仔を得る。乳癌自然発症マウスとしては、次の 3 系統を用いて解析する (MMTV-PyVT, MMTV-Wnt, MMTVneu)。このマウスにおいて腫瘍の発生を確認する前にタモキシフェンを投与することで、乳腺幹細胞を標識することができ、その後の癌化過程を通じた解析ができる。これに加えて、発がん確認後にタモキシフェンを投与した場合は、増殖・進展中のがん組織内でのがん幹細胞の挙動を観察することができる。

#### 4. 研究成果

(1)-1 検討した候補分子が幹細胞マーカーであった場合、このマーカー候補分子陽性細胞可視化マウス (図1) にタモキシフェンを投与すると、幹細胞のみが3色の蛍光蛋白質のいずれかで標識される。そして、この幹細胞の子孫の細胞も同じ蛍光蛋白質を発現し、成熟・移動する。新たに乳腺分岐が出来る時は、その為に必要な細胞を1個の幹細胞が供給すると仮定すると、新たに出来上がった個々の乳腺分岐はそれぞれ1色の蛍光蛋白質を発現することが予想される。乳腺は E11.5-18.5 に形成された後、休止期を経て、思春期・妊娠時に再び発育する。妊娠・授乳後は退縮し、妊娠のたびに発育と退縮を繰り返す。これを考慮して、成体/胎仔期それぞれにおいて標識と観察のタイミングを決定した。

様々な時期で屠殺して採取した乳腺組織から切片を作製し、標識細胞が分裂してどのような領域を占めるようになったかを調べた。さらに、分化した細胞の種類を解析するために、形態学的観察や、筋上皮細胞/乳管上皮細胞のマーカーに対する免疫組織染色を行った。このようにして、乳腺組織の形成に寄与するような細胞のマーカーとなる分子を探索・同定した。

(1)-2 過去の知見をもとに、いくつかの新規の幹細胞マーカー候補分子を選定した。これらの遺伝子のプロモーター下で CreERT2 を発現するような BAC transgenic (BAC Tg) マウスの作出実験を行った。



BAC Tg マウスは、コアプロモーターのみを使う Tg マウスと異なり、エンハンサーやイントロンなどの周辺配列をすべて組み込むため、より正確に外来遺伝子の発現を制御できて、ノックインマウスの正確性を再現できるという利点があるからである。さらに、Tg マウスと同様のインジェクション方法によって迅速に作出することが出来る (図2)。このようにして、現在、他の幹細胞マーカーについても解析を進めている。

(2) 標識された乳腺幹細胞が乳癌の起源の細胞であるならば、この細胞が発がん過程を通して分裂を繰り返した結果、乳癌組織内で、同じ色の標識をもつ癌細胞が一定以上のまとまった領域を占めるようになると思われる。この予想を検証することにより、標識された細胞が乳腺幹細胞としてふるまうか、すなわち乳腺幹細胞は正常乳腺幹細胞由来であるかを調べることができる。また、発がん確認後にタモキシフェンを投与した場合は、増殖・進展中のがん組織内でのがん幹細胞の挙動を観察することができる (図3A)。

このようにして、がん幹細胞として増殖したことを示すような、同じ色の標識を持つ細胞から成る一定以上のまとまった領域を観察することが出来た (図3B)。現在、このマーカー陽性のがん幹細胞についてさらに解析を進めている。

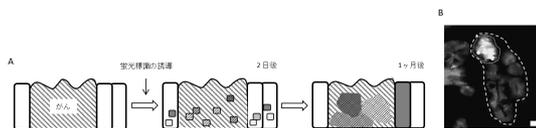


図3 (A) 多色細胞系譜追跡法を用いたがん幹細胞の同定 (B) がん幹細胞が腫瘍 (太点線) 内において、同じ赤色の蛍光標識を持つ細胞からなるクローン (細点線) を形成した例。スケールバー; 10 $\mu$ m。  
厚海奈穂、上野博夫 *Bio Clinica*, 2017 改変

乳腺は性周期や妊娠・授乳の影響を受けて発育と退縮を繰り返す。妊娠回数と乳癌リスクは負の相関にあることがわかっており、乳腺の発育に伴い乳腺幹細胞が枯渇する事で、乳癌の発生が抑制される可能性も提唱されている。このため、成体乳腺組織幹細胞の同定と乳癌の起源の解明は、乳がん発症の機序を理解するにあたって重要である。多色細胞系譜追跡法を用いれば、複数の幹細胞マーカー候補分子を簡便に検討できる。本研究を通して開発された乳腺幹細胞可視化法を用いて解析を進めることで、がん化過程でどの細胞ががん幹細胞になるかについての知見が深まり、乳癌の発癌メカニズムの解明につながる事が期待される。

#### 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 2件)

厚海 奈穂、上野博夫  
多色細胞系譜追跡法を通じた乳がん幹細胞の探索-不均一性を生じるクローン進化の解

明に向けて  
Bio Clinica 32 (2):97-103 2017 (査読有)

厚海 奈穂、上野博夫  
乳がん幹細胞の探索-不均一性を生じるクローン進化の解明に向けて  
Bio Clinica 31 (10):76-82 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/pathol1/index.html#>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

厚海 奈穂 (ATSUMI, Naho)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90612151

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

該当なし