

増殖因子による乳がん幹細胞制御の分子機構

著者	後藤 典子
雑誌名	金沢大学十全医学会雑誌 = Journal of the Juzen Medical Society
巻	123
号	3
ページ	84-85
発行年	2014-09-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/40221

【研究紹介】

増殖因子による乳がん幹細胞制御の分子機構

Growth factor signaling for breast cancer stem cells

金沢大学がん進展制御研究所・分子病態研究分野

後 藤 典 子

はじめに

少数の癌幹細胞が癌組織を構成する癌細胞全体のものとであるという「癌幹細胞説」は、ここ数年の癌の分野における最大のトピックスのひとつである。遺伝子に変異をおこした癌幹細胞は、比較的ゆっくりと分裂する。しかし、この癌幹細胞の分裂により生み出された分化途中の細胞の増殖能は、遺伝子変異のために一時的に非常に高まる。分化途中の癌細胞集団は分裂を繰り返すうちにさらに分化すると同時に増殖能を下げていく。その結果、様々な分化段階の癌細胞を含む進行癌が形成される。従来、開発されてきた抗癌剤の多くは、増殖能の高い細胞を死滅させる薬剤であった。しかし、癌幹細胞説によれば、抗癌剤を投与しても、増殖能の高い分化途中の細胞は死滅するが、癌幹細胞は死滅しにくいことになる。そのために、癌が再発してしまうという問題が起きている可能性がある。癌幹細胞説は、まだ完全には証明されていないが、これまでの癌の成り立ちや治療の考え方の基本をゆるがす考え方であるため、注目されている^{1,2)}。一部の急性白血病において癌幹細胞の存在が示されたことに始まり、現在では、一部の脳腫瘍、乳癌、大腸癌などの固形癌においても、癌幹細胞が存在すると考えられつつある。

私どもは、増殖因子による癌幹細胞の制御機構に焦点をあてて、解析を続けており、本稿においてその一端をご紹介します。

乳癌幹細胞とその *in vitro* アッセイ系：スフェア培養

ヒト乳癌組織が、癌幹細胞とそこから分裂派生した分化細胞からなるとするなら、癌幹細胞は同定できるのか。癌幹細胞を識別できるマーカー、特に表面抗原の探索が精力的に行われてきた。ヒト乳癌組織の細胞をバラバラにしCD24^{-low}/CD44^{high}なる分画に分けたとき、ここに入るごく少数 (<1%) の細胞集団に、癌幹細胞様の性質が認められると報告された³⁾。しかし、マーカーを複数用いても、癌幹細胞をより純化することが不可能であることもわかってきた。つまり、癌幹細胞はこれ、という形で純化するのは不可能であるというコンセンサスになりつつある。このことは、癌幹細胞様の性質をもつ細胞は、ある一定の特徴はもつものの、依然ヘテロな細胞集団であることを強く示唆している。

癌幹細胞説は、主に正常の幹細胞に関する「幹細胞生物学」の発展のもとに唱えられるようになった。正常の組織幹細胞を解析する際、培養皿中で幹細胞の性質を保ったまま培養できる手法として、スフェア培養が開発され、現在広く用いられている。私どもも、マウス神経幹細胞の解析のために、このスフェア培養を

用いてきた²⁾。通常、神経組織や乳腺組織など、上皮組織は、相互に細胞が接着した状態で安定な組織を構築している。これは、細胞間相互に、接着シグナルを送り合っているからであり、通常の上皮細胞はこの接着シグナルを失うとアポトーシスに陥る。この現象を「anoikis (アノイクシス)」という。実験的には、培養皿の底面にコーティングがないため、荷電がない、浮遊細胞専用の培養皿で、トリプシンによってバラバラにした細胞を培養することにより、スフェア培養ができる。細胞を一定以下の密度にすると、ほとんどの分化した細胞はアノイクシスにより死滅するが、幹細胞とその娘細胞である一部の前駆細胞はアノイクシスというストレスに抵抗であるため、生きながらえる。増殖因子のはいった培地で培養すると、一個の幹細胞から分裂した細胞塊「スフェア」を形成してくる (図2)。増殖因子は、epidermal growth factor (EGF) と basic fibroblast growth factor (bFGF)、さらにいくつかのホルモンなどのカクテルで細胞を培養する。

私どもは、ヒト乳癌の臨床検体由来の癌細胞を用いて、スフェア培養する系の確立を試み、成功した (図1)⁴⁾。この系は、技術的な困難さから、世界的にも数少ない研究室でしか行われていない。我々は、ヒト乳癌の臨床検体由来の細胞をトリプシンなどの酵素処理でバラバラにしたのちに、CD24、CD44でソートし、いわゆる癌幹細胞濃縮分画CD24^{-low}/CD44^{high}とそうでないコントロール分画に分けた後、スフェア培養用の培地で、細胞を培養した。その結果、CD24^{-low}/CD44^{high}に含まれる細胞からはスフェアを形成したが、コントロール分画に含まれる細胞からはスフェアが全く形成してこなかった。この結果から、クリアカットに、少なくとも臨床検体由来の癌細胞を用いたスフェア培養においては、癌幹細胞様の性質をもつ細胞のみが、スフェアを形成するということが示された。

ヘレギュリンは、癌臨床検体のスフェア形成を強く誘導し、PI-3 kinase-AKT-NFκB パスウェイの活性化を介してIL-8を産生誘導する

次に、増殖因子のカクテルではなく、単独の増殖因子によって、スフェア培養可能な条件を検討した。その結果、Heregulin (HRG:ヘレギュリン)を用いると、これ単独でスフェア培養ができることを発見した。ヘレギュリンは、Epidermal growth factor (EGF) receptor/HERファミリー分子のうち、HER3に結合する増殖因子である。一方、スフェア培養専用培地に含まれているEGFは、EGF receptor/HER1に結合する増殖因子である。EGF単独では、スフェア形成能は非常に

弱い。HERファミリー分子は、HER1からHER4まで4つの分子からなり、細胞膜上で、各々がリガンドである増殖因子の結合により、ホモ二量体あるいはヘテロ二量体を形成して、細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼ活性を上昇させる。その結果、細胞内で、Ras-ERKパスウェイやPhosphatidylinositol 3 (PI-3) kinase-AKTパスウェイを活性化し、細胞増殖、アポトーシスの抑制をはじめ、様々な細胞機能を制御することが知られている。私どもは、ヘレギュリン刺激にて、HER2/HER3のリン酸化に伴い、AKTの活性化を確認し、その基質であるシグナル伝達下流分子としてNFκBの活性化に注目した。

NFκBは、p65(RELA)とp50なる蛋白質からなるヘテロ二量体の転写因子である。不活性状態では、さらに、IκBなる蛋白質と細胞質内で結合しており、この三量体は、核へは移行しないため、転写因子として機能しない。Aktが活性化すると、IκBのリン酸化がおき、それによりIκBがポリユビキチン化され、リゾソームへ送られて分解される。それにより遊離したp65/p50二量体が、核へ移行し、NFκB転写因子として、様々な遺伝子の転写を活性化する。私どもは、ヘレギュリン刺激により、IκBのリン酸化さらにはRELAのリン酸化、そしてNFκBの活性化を確認した(図4)。臨床検体由来の乳がん細胞をヘレギュリン刺激しながら、同時にPI-3 kinase

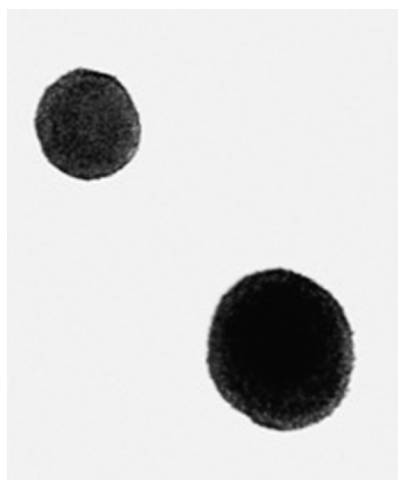


図1. ヒト乳癌臨床検体由来細胞部のスフィア培養

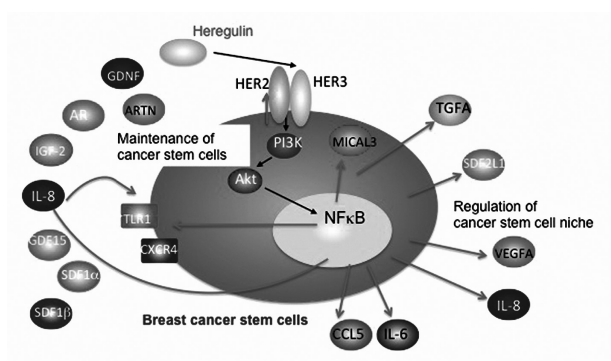


図2. 乳がん幹細胞が生体内に棲みつく分子メカニズム
増殖因子受容体HER2/HER3-PI3Kパスウェイの活性化により、様々なサイトカインや増殖因子が産生される。これらがオートクライン・パラクラインにがん幹細胞の維持や、ニッチ制御に働くと考えられる。

の阻害剤LY294002あるいはNFκBの阻害剤DHMEQを処理した状態で、スフェア形成させたところ、LY294002あるいはDHMEQ処理により、スフェア形成が強く抑制されることがわかった。以上より、ヘレギュリンは、PI-3 kinase-AKT-NFκBパスウェイを活性化して、スフェア形成を誘導することがわかった。

さらに、乳がん細胞をヘレギュリン刺激すると、IL-8が非常に強く発現誘導された。そして、このIL-8の発現誘導は、LY294002あるいはDHMEQ処理により、強く抑制された。この結果から、ヘレギュリンは、PI-3 kinaseそしてNFκB依存性に、IL-8産生を誘導することがわかった。

ま と め

我々は、ヒト乳癌臨床検体の細胞を用いて、スフェア培養する系を立ち上げることに成功し、この乳癌臨床検体のスフェア形成能力を支えるひとつの重要なシグナルとして、ヘレギュリン-PI-3 kinase-AKT-NFκBパスウェイを明らかにした⁴⁾。さらに、その下流でIL-8がオートクライン・パラクラインに乳癌幹細胞の自己複製を維持する可能性を示した(図2)^{5,6)}。NFκBは、私どもの報告を含め、炎症に関わる重要な転写因子で、様々なオートクライン・パラクライン因子として、増殖因子、サイトカイン、ケモカインなどの産生を誘導することが知られている。これらの因子は、乳癌幹細胞の自己複製に関与するとともに、周りのいわゆる「癌幹細胞ニッチ」にも作用していると考えられる。このパスウェイに関わる分子は、乳癌幹細胞の自己複製並びに癌幹細胞ニッチを維持し、乳癌幹細胞が生体内に棲みつくように働く事が示唆される。このように、癌幹細胞は、ニッチを利己的に巧みに操って、生体内に棲み着いていると考えられる。私どもは、この仕組みを明らかにし、鍵となっている分子の同定を目指している。この鍵分子を分子標的とした治療法が開発できれば、癌の根治が期待できると考えられるからだ。同時に、個々の患者の癌の個性を明らかにし、それぞれの分子標的抗癌剤が効果的に治療可能な症例を選んで投与する個別化医療を進めることも重要と考えている。現在、このような癌幹細胞を標的とした個別化医療の実現は、癌の根治を期待できる治療法として注目されており、世界的に精力的に研究が行われている。

文 献

- 1) Reya T, Morrison SJ, Clark MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
- 2) Gotoh N. *Cancer Stem Cells Theories and Practice*, 2011; InTech, Vienna, 261-272.
- 3) Al-Haji M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2003; 100: 3983-3988.
- 4) Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, et al. ErbB receptor tyrosine kinase/NF-κB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2012; 109: p6584-6589.
- 5) Hinohara K, Gotoh N. Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010; 10: p650-654.
- 6) Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M et al. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British J Cancer*, 2010; 102: p206-212.