

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640072

研究課題名(和文) 乳癌臨床検体の初代スフェア培養系を用いた癌根治のための変異診断システムの構築

研究課題名(英文) Development of diagnostic system of mutations in breast cancer by using primary spheroid cells derived from patients

研究代表者

後藤 典子 (Gotoh, Noriko)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：10251448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん臨床検体よりの初代培養細胞を用いて、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析とRNAシーケンス解析を行った。その結果、既知のがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異を確認、さらにはがん幹細胞様細胞の新規分子標的候補が複数得られた。詳細な機能解析により、がん幹細胞を根治する新規分子標的をさらに絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：We performed exome sequence and RNA sequence by using primary cultured cells derived from tumor tissues of breast cancer patients. We analyzed luminal type A, luminal type B and triple negative type breast cancer tissues. We found several novel molecular targets in breast cancer stem-like cells. Functional analysis of these molecules, we identified promising molecular targets of breast cancer stem-like cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現代の日本人の死因の第一位は癌であり、癌の克服は差し迫った課題である。特に、乳癌は近年欧米のみならず日本でも罹患数がふえ、女性の癌としてその克服が大きな問題である。ここ数年、次世代シーケンサーの発達とともに、ヒト癌組織を用いた網羅的解析から、癌の真の分子標的足り得る遺伝子に起こったドライバー変異を探索する研究が、世界的に行われている (Nat. Rev. Cancer, 12, p572, 2012)。しかし、乳がんのドライバー変異については、際立った成果が得られていないのが現状である。その大きな問題点として、ヒト乳がん組織は間質が多いこと、また癌組織そのものが不均一であることの二点が考えられる。

ここ数年、「癌幹細胞」が癌根絶の真の治療標的として、世界的なトピックスとなっている (Nat. Cell Biol., 15, p338, 2013; Lancet Oncol., 13, e43, 2012)。癌組織は、癌幹細胞とそこから分裂分化した癌細胞からなるという考え方で、乳癌などの固形癌においても、そのような考え方が浸透しつつあり、それが癌組織の不均一性の少なくとも一部を説明していると考えられつつある。癌幹細胞とそこから分裂した前駆細胞のみの集団を純化し、その細胞集団のみを用いて解析すれば、ドライバー変異を見いだしやすいと考えられる。その方法として、癌細胞の「スフェア培養系」が提唱され、世界的に試みられている。しかし、特に乳癌において、癌患者の手術検体そのものを用いた初代スフェア培養は、技術的に難しいとされている (Eur. J. Cancer, 48, p2104, 2012)。

2. 研究の目的

申請者は、「初代乳癌細胞のスフェア培養」の系を立ち上げた (PNAS, 109, p6584, 2012)。本研究では、これを用いて、革新的ながん根治療法につながる分子標的を見いだすことを大きな目的とする。次世代シーケンサーを用いた解析に加えて、先端的バイオインフォマティクスも駆使して、ドライバー変異や、癌幹細胞のアキレス腱やハブとなる鍵分子を同定する。それら分子の中には、がん根治療法につながる分子標的候補たりえるものが多数あると期待されるので、その評価を様々な手法によって行う。本培養系を用いたドライバー変異診断システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

乳癌臨床検体の初代スフェア培養を行い、次世代シーケンサーを用いた解析を行う。得られた候補のドライバー変異遺伝子、ハブ遺伝子、アキレス腱遺伝子をコードする分子の機能解析を詳細に行う。癌根治の分子標的候補として、評価、創薬を目指す。

1) 乳癌臨床検体初代スフェア培養の次世代シーケンサーを用いた解析

手術日に博士課程大学院生3名もしくは中田が、病院から2時間以内の研究室(東京大学医科学研究所・分子療法分野もしくは金沢がん研)へ新鮮臨床検体を氷冷状態で運搬する。東大病院、公立昭和病院、南町田病院からは、医科研へ搬送、金大病院からは金沢がん研へ搬送する。

検体を、酵素などで処理してシングルセルにし、ビーズ処理により、血球や間質細胞を取り除き、スフェア培養を行う。当日シングルセルにするのが困難な場合は、一旦接着培養させたのちに、数日以内にスフェア培養に持ち込む。残った組織は-80度で凍結保存し、後日、免疫不全マウスに移植するなどの実験を行う。十分にスフェアが形成されたところで、細胞を回収し、RNA、DNAを抽出し、次世代シーケンサー解析を行う。

得られたデータのバイオインフォマティクス解析は、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)やMeta-GPなどの解析を追加、駆使して解析する。

2) 乳癌臨床検体初代培養の解析

臨床検体は、スフェア培養もしくは接着培養により、増えることが確認できれば、数代継代して、シングルセルのストックをたくさん作る。また、免疫不全マウスの乳腺皮下部に移植し、xenograft腫瘍を作らせる。

3) 得られた候補のドライバー変異、ハブ遺伝子、アキレス腱遺伝子の機能解析

得られた遺伝子をコードする分子のcDNAを用いた過剰発現、siRNAやshRNAを用いたノックダウンを、乳癌細胞株ならびに、2で収集した臨床検体乳癌細胞を用いて行う。スフェア培養、細胞増殖、xenograft等を用いた実験等、詳細に行う。癌幹細胞の実験において、臨床検体由来の癌細胞を用いることは、きわめて重要である。種々の分子生物学、細胞生物学的解析に加えて、臨床検体のパラフィン切片などを用いた免疫染色なども使い、癌や正常組織での発現、予後や病期との関連はじめ、種々の解析を行う。

4. 研究成果

ルミナルタイプA2例、ルミナルタイプB6例、トリプルネガティブタイプ3例について、解析を行った。核酸を抽出したあと次世代シーケンサー解析に供した。

現在のところ、ルミナルタイプA1例、ルミナルタイプB1例、トリプルネガティブタイプ1例について、エクソームシーケンサー

と RNA シークエンス後、バイオインフォマテイクス解析まですべての解析が一通り終了している。

この3検体については、スフィア培養と接着培養両方の条件で、解析を行っている。その結果、以下のことがわかった。

(1)RNA シークエンスの結果。

GSEA により、スフィア培養と接着培養の RNA レベルの違いを解析した。スフィア培養細胞中で発現している遺伝子群と、接着培養細胞中に発現している遺伝子群を比較した。

スフィア培養細胞には、Epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関わる遺伝子群や、Oncogene に関わる遺伝子群がより濃縮していた。これは、スフィア培養するとがん幹細胞様の細胞がより濃縮されるというこれまでの結果と一致した。

個々の遺伝子発現をみると、スフィア培養細胞では、Ras, PI3K のような既知のがん遺伝子の発現が高く、一方、p53, PTEN のようながん抑制遺伝子の発現は低かった。

がん幹細胞様の細胞は、接着培養のがん細胞より、よりがん遺伝子の機能を必要とし、がん抑制遺伝子の機能は必要としないことが示唆された。

(2)エクソームシークエンスの結果。

エクソームシークエンスより、変異のある遺伝子を解析した。スフィア培養細胞のみで確認される遺伝子、接着細胞のみで確認される遺伝子、両方の培養条件でも確認される遺伝子が存在し、それぞれ数十ずつあり、分類された。融合遺伝子も数十同定されたが、ドライバー変異の候補は得られなかった。

変異が同定された数十の遺伝子について、prognoscan を用いて多くのがん患者の予後との関連を調べた。OncoPrint を用いて、がん組織と正常組織の発現レベルについて解析した。

(3)がん幹細胞の新規分子標的候補の機能解析

スフィア培養のほうで変異が同定された遺伝子のうち、いくつかを癌幹細胞の分子標的候補として、機能解析を行っている。候補としては、prognoscan で予後の悪い患者に多く発現する分子や、がん組織にはよく発現する一方で正常組織の発現が少ない分子である。また、機能的にもがんとの関連が推測されるものの優先順位をあげた。

具体的には、市販の抗体を用いて様々な細胞株や、臨床検体由来の初代培養細胞のライセートのウエスタンブロットを行って、発現を解析した。また、Taqman probe を用いて、qRT-PCR にて、mRNA の発現量も調べた。

shRNA や siRNA を用いてノックダウンを行い、細胞増殖、スフィア形成、細胞運動、足場非依存性増殖に対する影響を調べた。正常細胞としては、HEK293 細胞、MCF10A 細胞を用いて、ノックダウンにより細胞増殖に大きな影響がないことを確認した。

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 14 件)

1. Sasaki S, Baba T, Nishimura T, Hayakawa Y, Hashimoto S, Gotoh N, Mukaida N.: Intra-bone fibroblasts promote breast cancer bone metastasis by producing connective tissue growth factor/CCN2 under the influence of cancer cell-derived chemokine, CCL4. *Cancer Lett*, 378, 23-32, 2016. 査読有

2. Murayama T, Nakaoku T, Enari T, Nishimura T, Tominaga K, Nakata A, Tojo A, Sugano S, Kohno T, Gotoh N.: Oncogenic fusion gene CD74-*NRG1* confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit, *Cancer Res*, 76, 974-983, 2016. 査読有

3. Hasegawa S, Nagano H, Konno M, Eguchi H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Nishida N, Koseki J, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H.: Cyclin G2: A novel independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncol Lett*, 10, 2986-2990, 2015. 査読有

4. Konno M, Ishii H, Koseki J, Tanuma N, Nishida N, Kawamoto K, Nishimura T, Nakata A, Matsui H, Noguchi K, Ozaki M, Noguchi Y, Shima H, Gotoh N, Nagano H, Doki Y, Mori M.: Pyruvate Kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. *Regenerative Therapy*, 1, 63-71, 2015. 査読有

5. Ogawa H, Wu X, Kawamoto K, Nishida N, Konno M, Koseki J, Matsui H, Noguchi K, Gotoh N, Yamamoto T, Miyata K, Nishiyama N, Nagano H, Yamamoto H, Obika S, Kataoka K, Doki Y, Mori M, Ishii H.: MicroRNAs Induce Epigenetic Reprogramming and Suppress Malignant Phenotypes of Human Colon Cancer Cells. *PLoS One*, 10, e0127119, 2015. 査読有

doi : 10.1371/journal.pone.0127119.

6. Konno M, Koseki J, Kawamoto K, Nishida N, Matsui H, Dewi DL, Ozaki M, Noguchi Y, Mimori K, Gotoh N, Tanuma N, Shima H, Doki Y, Mori M, Ishii H: Embryonic MicroRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming. *PLoS One*, 10, e0132789, 2015. 査読有

7. Nadal E, Truini A, Nakata A, Lin J, Reddy RM, Chang A, Ramnath N, Gotoh N, Beer DG, Chen G: A novel serum 4-microRNA signature for lung cancer detection. *Sci Rep*, 5, 12464, 2015. doi: 10.1038/srep12464. 査読有

8. Nakata A, Yoshida R, Yamaguchi R, Yamauchi M, Tamada Y, Fujita A, Shimamura T, Imoto S, Higuchi T, Nomura M, Kimura T, Nokihara H, Higashiyama K, Kondoh K, Nishihara H, Tojo A, Yano S, Miyano S, Gotoh N.: Elevated beta-catenin pathway as a novel target for patients with resistance to EGF receptor targeting drugs. *Sci Rep*, 5, 13076, 2015. doi: 10.1038/srep13076. 査読有

9. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yoda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Gotoh N, Akashi K.: The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. *Exp Hematol*, 42, 955-965, 2014. 査読有

10. Hamabe A, Konno M, Tanuma N, Shima H, Tsunekuni K, Kawamoto K, Nishida N, Koseki J, Mimori K, Gotoh N, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H.: Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 111, 15526-31, 2014. 査読有

11. Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Nishida N, Koseki J, Nishimura T, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H.: MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 111, 1572-80, 2014. 査読有

12. Kohsaka S, Hinohara K, Wang L, Nishimura T, Urushido M, Yachi K, Tsuda M, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Gotoh N,

Tanaka S.: Epiregulin enhances tumorigenicity activating ERK/MAPK pathway in glioblastoma. *Neuro. Oncol.*, 16, 960-70, 2014. 査読有

13. Ono K, Kita T, Sato S, O'Neill P, Mak S-S., Paschaki M, It, M, Gotoh N, Kawakami K, Ladher RK.: Fgfr1-Frs2/3 Signalling Maintains Sensory Progenitors during Inner Ear Hair Cell Formation. *PLoS Genetics.*, 10, e1004118, 2014. 査読有

14. Li H, Ta, C, Cai Z., Hertzler-Schaefer K, Collins TN, Wang F, Feng G-S, Gotoh N, Zhang X.: Frs2alpha and Shp2 signal independently of Gab to mediate FGF signaling in lens development. *J. Cell Sci.*, 127, 571-582, 2014. 査読有

[学会発表](招待講演 計17件)

1. Stem cells, progenitor cells and cancer stem cells in breast tissues

第89回日本内分泌学会総会シンポジウム「内分泌器官の組織幹細胞と腫瘍幹細胞」

2016年4月 京都

2. 「癌幹細胞の幹細胞性維持シグナルと創薬標的」

日本薬学会第136回年会シンポジウム：乳癌幹細胞の制御機構と治療への展開

2016年3月 横浜

3. CD74-NRG1, an oncogenic fusion gene product, leads to insulin-like growth factor 2 autocrine/paracrine circuit and confers cancer stem cell properties

The 20th Korea-Japan Cancer Research Workshop

2015年11月30日～12月1日 東京

4. Molecular targets in the signaling and metabolism in cancer stem cells and their niche

第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会・合同大会ワークショップ「がん治療抵抗性にむけた新しいアプローチ」

2015年12月 神戸

5. 「増殖因子によるシグナル制御から得られた耐性克服のための新規分子標的」

第56回日本肺癌学会学術集会シンポジウム「肺癌のトランスレーショナルリサーチ(分子標的薬の耐性克服)」

2015年11月 京都

6. 「がん幹細胞-乳がんの癌幹細胞研究と臨

床応用への展望」

第 53 回日本癌治療学会・日本癌学会合同シンポジウム：がん治療のゲノム個別化 Precision Medicine を目指す多様な視点

2015年10月 京都

7. Molecular targets in the signaling and metabolism in cancer stem cells and their niche

第 74 回日本癌学会学術総会特別シンポジウム「女性研究者による癌研究」

2015年10月 名古屋

8. MICAL3 regulates stemness of human breast cancer

第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会シンポジウム「がん幹細胞の分子標的・免疫制御の新展開」

2015年7月 札幌

9. Maintenance of stemness of breast cancer stem-like cells by FRS2beta, a feedback inhibitor for HER, during mammary tumorigenesis.

2015 SNUCRI Cancer Symptomium

2015年4月3日 韓国

10. 「がん幹細胞とニッチ相互作用によるがん進展メカニズム」

第 26 回加藤記念研究助成贈呈式 特別講演会

2015年3月6日 東京

11. Novel molecular targets for breast and lung cancer stem cells

第 8 回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム

2015年2月6日 岡山

12. Novel molecular targets in breast cancer stem cells in patient-derived sphere cells

14th Japanese-German Workshop

2014年11月14日 ベルリン、ドイツ

13. 「乳がん幹細胞を標的とした治療戦略」

腫瘍別シンポジウム、第 73 回日本癌学会学術総会

乳がん研究の新展開：基礎科学から臨床医学へ

2014年9月25日 横浜

14. 「臨床検体乳がんスフィア培養を用いたがん幹細胞の新規分子標的の探索」

シンポジウム、第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会

オーガナイザー

2014年8月30日 東京

15. Novel molecular targets in breast cancer stem cells in patient-derived sphere cells

2014 Annual Meeting of KSSCR

2014年8月29日 韓国

16. 「エリプリンの作用メカニズムとその臨床応用」

ランチョンセミナー 第 23 回日本がん転移学会学術集会

2014年7月11日 金沢

17. Insulin-like growth factor regulates breast cancer stem cell properties

2014 SUNCRI Cancer Symposium

2014年4月15日 韓国

〔図書〕(英文 計1件)

Gotoh N and Tsuchida N.: Membrane-linked docking protein. *Encyclopedia of Cancer, 3rd Edition, Springer, Heidelberg, Germany, in press.* 査読有

(日本文 計6件)

1. 「乳癌の癌幹細胞」

富永香菜、後藤典子 Surgery Frontier, vol. 22. P61, 2015.

2. 「乳がん幹細胞とニッチの増殖因子シグナル」
後藤典子 p712

「がん幹細胞研究の歴史および治療への展望」

後藤典子、佐谷秀行 p676

実験医学、vol. 33(5), 2015.

3. 「カラー図説：がん幹細胞研究とシステム生物学」

後藤典子 がん幹細胞 日本臨床 vol. 73(5), 2015.

4. 「EGF 受容体」「FGF 受容体」「HER2」

後藤典子 サイトカイン、増殖因子キーワード事典 羊土社 2015年3月

5. 「がん幹細胞の研究と治療への応用」座談会

後藤典子 がん分子標的治療 vol. 12(3), 2014.

6. 「がんにおける遺伝子発現ネットワーク解析」

後藤典子 医学のあゆみ vol. 249(10), p1113, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

1. 特許出願 出願日：2015年6月30日 特願 2015-132122
発明者：後藤典子、富永香菜、東條有伸
名称：癌の新規分子標的 MICAL3
出願者：金沢大学法人
2. 特許出願 出願日：2014年12月3日 特願 2014-244956
発明者：東條有伸、後藤典子、土岐忠史
名称：メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ - 2 阻害薬に対する反応性を予測する方法
出願者：東京大学法人、第一三共株式会社

取得状況（計1件）

1. 欧州特許成立（ドイツ、フランス、イギリス）
登録日：2014年2月13日 登録番号：2141231
発明者：後藤典子、黒田雅彦、土田信夫、渡辺誠
国際特許出願：2008年3月24日 出願番号：8722734.4
名称：ErbB2 を介するシグナル伝達阻害方法、それに用いるシグナル伝達阻害剤およびその用途
出願者：東京大学法人、東京医科大学法人、東京医科歯科大学法人

〔その他〕

「乳がんとがん幹細胞」

公開講座「がん研究の最前線」

2015年5月23日

「乳がんの再発に関わるがん幹細胞」

がんについてあなたに伝えたいこと

第23回日本癌学会市民公開講座

2014年5月24日 金沢

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 典子 (GOTOH Noriko)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：10251448

(2) 研究分担者

中田 飛鳥 (NAKATA Asuka)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70597921

鈴木 穰 (SUZUKI Yutaka)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40323646

(3) 連携研究者

吉田 亮 (YOSHIDA Ryo)

統計数理研究所・モデリング研究系データ同化研究開発センター・准教授

研究者番号：70401263

東條 有伸 (TOJO Arinobu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：00211681

小川 利久 (OGAWA Toshihisa)

東京大学・附属病院・准教授

研究者番号：80224111

井口 雅史 (INOKUCHI Masashi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90401918