

令和元年6月18日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19587

研究課題名(和文)腫瘍細胞の可塑性の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of plasticity in tumor cells

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):乳がんは、前がん病態に炎症が関与することが知られているがその分子機構は不明である。我々は今回、ErbB受容体チロシンキナーゼファミリーに結合して、ERKの活性化をフィードバック抑制するFRS2betaが、前がん病態における炎症を惹起させるためにクリティカルであることを見出した。FRS2betaは、がん予防の標的となり得る。

後半ではFRS2beta欠損によりERKによる転写誘導能が上昇した結果、時間はかかるが微小環境に依存しない悪性の癌が形成されることを示した。ERKによりTGFbetaの発現が上昇し、その下流でEMTが起きることが、悪性の癌を形成する分子機構の一つであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FRS2betaは、超早期乳がんのバイオマーカーとなりえる(特許取得済み)。マンモグラフィーなどで精密検査となった症例に針生研が行われるが、このときにFRS2beta抗体で免疫染色を行うことにより、FRS2betaの発現が高ければがんの可能性が高くなる。私どもは、FRS2betaに対するモノクローナル抗体をすでに開発している。FRS2betaを標的とした予防策も期待できる。

研究成果の概要(英文): Although it is known that inflammation is involved in the precancerous mammary tissues, the molecular mechanisms remain unknown. We have elucidated that FRS2beta, an adaptor for feedback inhibition of ErbB-ERK signaling, plays critical roles for evoking inflammation in the precancerous mammary tissues.

We further show that tumor cells without FRS2beta cannot grow fast due to lack of inflammation in the mammary tissues, however, they gradually adapt the condition and finally obtain ability to grow in the absence of inflammation. Epithelial-mesenchymal transition mechanisms are involved.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳癌 前癌状態 癌微小環境 ErbB 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ここ約 20 数年の幹細胞生物学の進歩により、生体内の組織を構成する細胞集団は、組織幹細胞が分化増殖した結果、様々な段階に分化した階層性をもつ細胞からなることが明らかになっている。組織幹細胞は、周囲のニッチ細胞と相互作用して生体内のホメオスタシスの中で生存している。申請者は、がん幹細胞がその発生母地である組織の構築をある程度保持し、周囲のニッチ細胞を利用して、生体内に棲みついていることを示してきた。

一方、腫瘍細胞に可塑性があるという発見は、正常の幹細胞を頂点とする整然とした組織構築の考え方とは全く異なる。しかし、これこそが未だ見逃されていたがんの本態である可能性が高い。生物学における可塑性とは、例えば「神経細胞の可塑性」のように、外界の刺激などにより常に機能的、構造的な変化を起こし適応することをいう。がん細胞は、正常細胞とは全く異なり、様々な微小環境に七変化して適応するという特徴を持ち合わせているのである。

申請者は世界に先駆けて、がん幹細胞がサイトカインを産生して炎症シグナルを活性化し、周囲の微小環境を構成するニッチ細胞を操り、利己的に増殖して大きながん組織を構築することを示してきた (*Cancer Res*, 76, p974, 2016; *Oncogene*, on line publication, 2016; *Curr. Opin. Pharmacol.*, 10, p650, 2010; *Br. J. Cancer*, 102, p206, 2010; *PNAS*, 109, p6584, 2012)。最近では、肺がんのドライバー変異ががん幹細胞を生み出すことを世界で初めて報告している (*Cancer Res*, 76, p974, 2016)。

別の研究で申請者は FRS2beta アダプター分子を 17 年前にクローニングし、その後一貫して FRS2 分子に関して世界をリードした研究を続けている。FRS2beta がサイトカイン依存性がん幹細胞マーカーであることを見出し、国際特許が成立している(特許成立、日米欧, 2014, 2013, 2012; *Encyclopedia of signaling molecules*, 2011; *Cancer Sci.*, 104, p345, 2013; *Oncogene*, 29, p3087, 2010; *Cancer Sci.*, 99, p1319, 2008; *Oncogene*, 25, p6457, 2006; *PNAS*, 102, p15983, 2005; *FEBS lett.*, 564, p14, 2004)。FRS2beta は、乳腺など一部の細胞にのみ非常に限局した発現を示す。FRS2beta ノックアウトマウスを申請者が作出したところ、大きな表現型は認められなかった。腫瘍化における役割を調べるために、MMTV-HER2 マウスとの掛け合わせを行った。その結果思いがけず、腫瘍細胞の可塑性の分子機構を解明するための理想的なツールを得た。

### 2. 研究の目的

乳がんの罹患数は急速にふえており、今や日本人女性の 12 人に 1 人が一生のうち一度は乳がん罹患する。特に再発がんは、多くの抗がん剤に抵抗性であり、がんの死亡率が下がらない主な原因である。近年、幹細胞様の性質をもつがん細胞(いわゆるがん幹細胞)が、初発がんのみならず再発がんの原因として、世界的に注目されている。(*Nat. Cell Biol.*, 15, p338, 2013; *Lancet Oncol.*, 13, e43, 2012)。ごく最近、がん幹細胞を含む腫瘍細胞は、様々な微小環境に適応し、その性質を変容させてしぶとく生きながらえる「可塑性」をもつことがわかってきた(*Cell Stem Cell*, 14, p275, 2014)。この「可塑性により生み出されたがん幹細胞」こそが再発がんのがん幹細胞であり、従来型の抗がん剤に抵抗性を示し、がんが治らない最大の原因であることがわかってきている。腫瘍細胞の可塑性によりがん幹細胞が生み出される分子機構はほとんどわかっていない。世界的にみても良いモデルマウスが存在せず、研究が進んでいない。

本研究では、可塑性により生み出されるがん幹細胞の分子機構を明らかにすることを大きな目的とする。そのため、申請者が作出した独創的な乳がんモデルマウスを用いる。さらに、解明した分子機構を基盤に、がん幹細胞の可塑性を標的とするがん根治療法の開発を目指す。臨床検体乳がん細胞のがん幹細胞を濃縮できるスフィア培養やヒト乳がん組織片を免疫不全マウスの乳腺部に移植する異種移植モデル patient-derived xenograft (PDX) を用いて検証する。

### 3. 研究の方法

乳腺特異的に HER2/ErbB2 を過剰発現する乳がんモデルマウス MMTV-HER2 と、申請者が作出した FRS2beta アダプター分子のノックアウトマウスとの交配マウス (MMTV-HER2/FRS2beta<sup>-/-</sup>) が、可塑性乳がん幹細胞のモデルマウスである。FRS2beta は、乳腺においては乳腺前駆細胞にのみ発現する。MMTV-HER2 マウスでは、この乳腺前駆細胞

胞ががん幹細胞化するとともに、FRS2beta 依存性にサイトカインを産生、CXCL12 はニッチとなる間質細胞を増殖させ、IGF1 はオートクラインに作用してサイトカイン依存性のがん幹細胞を急速に増殖させる。一方、MMTV-HER2/FRS2beta<sup>-/-</sup>マウスには小さい腫瘍が形成されるものの暫く全く増大を見ないが、約3ヶ月の潜伏期間ののち FRS2beta 欠損によるサイトカイン欠乏状態という与えられた微小環境に適応した、サイトカイン非依存性のがん幹細胞が生み出され急速に増殖する。

乳がんモデルマウスの解析を相互に比較しながら行う。経時的に乳腺及び腫瘍をサンプリングし、がん幹細胞を濃縮できるスフィア培養を行う。トランスクリプトーム、メタボローム、エピゲノム解析を行い、多層的オミクス解析結果を統合させる。この解析からがん幹細胞の可塑性を制御する鍵分子を同定し、がん細胞株や、臨床検体のスフィア培養及び PDX の系を用いて検証する。がん幹細胞の可塑性を標的とするがん根治の新規分子標的を見出す。

#### 4. 研究成果

MMTV-HER2/FRS2beta<sup>+/+</sup>(WT)マウスモデルと、MMTV-HER2/FRS2beta<sup>-/-</sup>(KO)マウスモデルの解析を行った。がん発症直前と、腫瘍増大過程において乳腺およびがん組織を採取し、スフィア形成後、細胞を回収し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

Gene set enrichment analysis (GSEA)を行ったところ、FRS2beta<sup>+/+</sup>マウス前癌乳腺及びがん細胞において、炎症シグナルが過剰に発現していることがわかった。IGF1 や CXCL12 などのサイトカインの産生が実際に上昇していることを、免疫組織染色でも確認できた。その原因として、NFκB の活性が上昇することもわかった。腫瘍形成過程において、IGF1R の阻害剤もしくは CXCL12 阻害剤を投与することにより、腫瘍形成が著明に抑制された。

マウス乳腺において、FRS2beta は、ルミナル前駆細胞に限局的に発現することがわかった。乳腺内で、FRS2beta 依存性のがん幹細胞ニッチが形成され、この中でがん幹細胞が発生することがわかった。乳腺内前駆細胞ががん微小環境形成に重要な役割をはたすことがわかった。

これまで、がん微小環境を構成する細胞群のうち、がん間質細胞、血管内皮細胞、免疫細胞が注目されてきたが、癌発生の母地となる乳腺前駆細胞とのものががん微小環境を形成する重要な役者であることを世界で初めて示した。

一方、遅れて増大してくる FRS2beta<sup>-/-</sup>の乳癌は、炎症性サイトカイン豊富な乳腺環境に反応しにくいと考えられる。

次に、FRS2betaKO の腫瘍が増大したのちに、肺転移を HE 染色で調べた。その結果 FRS2betaWT で 40%、KO で 60%のマウスに肺転移が確認され、驚いたことに KO の方が高頻度の転移率を示した。炎症性サイトカイン豊富な乳腺環境を排除するため雄マウスの皮下に FRS2betaWT と KO の乳癌細胞を移植すると、FRS2betaWT の腫瘍は増大をみない一方、KO の腫瘍は急速に増大した。さらに、FRS2betaKO の腫瘍は tumor initiating activity も高く、癌幹細胞性も高いことが示された。これらのことから FRS2betaKO の乳癌は FRS2betaWT 乳癌とは異なり、乳腺環境に非依存的で、癌幹細胞性や転移能が高く、より悪性であると言える。この原因を調べるため、癌発症前乳腺細胞、primary の癌細胞、移植癌細胞を用いてマイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を行った。パスウェイ解析の結果、FRS2betaKO の癌発症前乳腺細胞で TGFbeta シグナルが高くなっていること、また、primary の癌細胞と移植癌細胞で上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) シグナルが亢進していることが示唆されたこれらの結果は、qRT-PCR、ウェスタンブロッティングを用いて確認された。FRS2betaKO 正常乳腺細胞では、FRS2beta による ERK の核移行抑制が解除されるため、ERK により転写誘導される遺伝子発現は上昇すると考えられる。FRS2betaKO によって ERK を介する転写が活性化して乳腺細胞内で TGFbeta が発現上昇し、その下流で EMT マーカーの発現が上昇すると考えられる。これが FRS2betaKO マウスに悪性の癌が形成される原因の一つと考えられる。

本研究の前半では乳腺前駆細胞が、炎症性サイトカイン産生を介して腫瘍を強く増大させる微小環境を構築することを示した。これまで腫瘍増大を支持する微小環境として、CAF や血管細胞などが知られていたが、組織を構成する前駆細胞が、微小環境構築に重要な役割を果たす事は、本研究が初めての報告となる。前駆細胞が産生する炎症性サイトカインを標的とする新たなコンセプトの治療戦略が期待される。

後半では乳腺前駆細胞内で FRS2beta 欠損により ERK による転写誘導能が上昇した結果、時間はかかるが微小環境に依存しない悪性の癌が形成されることを示した。ERK により TGFbeta の発現が上昇し、その下流で EMT が起きることが、悪性の癌を形成する分子機構の一つであると考えられる。FRS2betaKO マウスは、治療抵抗性の悪性の乳癌の良いモデルであり、今後新たな治療標的を探索するよいツールとしての活用も期待できる。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- 1) Gotoh N.: Elucidation of Breast Cancer Tissue Diversity by Comprehensive Analysis of Minimum Unit Omics. *Impact*, on line publication 1 March, 2019, vol. 2019, Number 3, 30-32, 2019. doi: <https://doi.org/10.21820/23987073.2019.3.30>
- 2) Tominaga K, Minato H, Murayama T, Sasahara A, Nishimura T, Kiyokawa E, Kanauchi H, Shimizu S, Sato A, Nishioka K, Tsuji E, Yano M, Ogawa T, Ishii H, Mori M, Akashi K, Okamoto K, Tanabe M, Tada K, Tojo A, Gotoh N.: Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, on line publication 26 December, 2018; 116, 625-630, 2019. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1806851116>
- 3) Tamari K, Konno M, Asai A, Koseki J, Hayashi K, Kawamoto K, Murai N, Matsufuji S, Isohashi F, Satoh T, Goto N., Tanaka S, Doki Y, Mori M, Ogawa K, Ishii H.: Polyamine flux suppresses histone lysine demethylases and enhances ID1 gene expression in cancer stem cells. *Cell Death Differ.*, on line publication 13 November, 2018; 4, 1-9, 2018. doi:<https://doi.org/10.1038/s41420-018-0117-7>
- 4) Nishimura T, Nakata A, Chen X, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S-I, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, Gotoh N.: Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene*; online publication 7, December 2018. doi: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0589-1>
- 5) Asai A, Koseki J, Konno M, Nishimura T, Gotoh N., Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H.: Drug discovery of anti-cancer drugs targeting methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2. *Helion*, 4, e01021, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01021>
- 6) Garg A, Bansal M, Gotoh N., Feng G-S, Zhong J, Wang F, Kariminejad A, Brooks S, Zhang X.: Alx4 relays sequential FGF signaling to induce lacrimal gland morphogenesis. *PLoS Genet*, 13, e1007047, 2017. doi: [10.1371/journal.pgen.1007047](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007047).
- 7) Yamamoto M, Sakane K, Tominaga K, Gotoh N., Niwa T, Kikuchi Y, Tada K, Goshima N, Semba K, Inoue J-I.: Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*, 108, 1210-1222: 2017. doi: [10.1111/cas.13246](https://doi.org/10.1111/cas.13246)
- 8) Kitajima S, Yoshida A, Kohno S, Suzuki S, Nagatani N, Li F, Nishimoto Y, Sasaki N, Muranaka H, Wan Y, Thai T, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N., Suzuki M, Ewen M, Barbie D, Hirose O, Tanaka T, Takahashi C.: The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene*, 26. 5145-5157, 2017; May 8. doi: [10.1038/onc.2017.124](https://doi.org/10.1038/onc.2017.124).
- 9) Gotoh, N. FRS2. *Encyclopedia of Signaling Molecules, 2<sup>rd</sup> Edition, Springer, Heidelberg, Germany, 2017.*
- 10) Sasahara A, Tominaga K, Nishimura T, Yano M, Kiyokawa E, Noguchi Miki, Noguchi Masakuni, Kanauchi H, Ogawa T, Minato H, Tada K, Seto Y, Tojo A, Gotoh N.: An autocrine/paracrine circuit of growth differentiation factor (GDF) 15 has a role for maintenance of breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, 8, 24869-24881, 2017;

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) Critical roles of luminal progenitor cells in creating the cytokine-rich precancerous niche for mammary tumorigenesis  
International Society for Precision Cancer Medicine, 2019. 2019年3月14日  
韓国、ソウル
- 2) Growth factor and cytokine signaling regulates breast cancer stem-like cells and their niche  
**第7回 Cancer Stem Cell Symposium.** 2018年12月14日 九州
- 3) 乳がんの三次元培養とPDXを用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ  
**第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「新たな技術がもたらすがん治療難治性の克服にむけた新しいアプローチ」.** 2018年11月28日 横浜
- 4) Analysis of regulatory mechanisms in breast cancer-stem like cells by using spheroid cultures of patient-derived cancer cells and patient-derived xenograft (PDX) models  
**International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa.** 2018年11月26日 金沢
- 5) 乳がんのアカデミア創薬  
**第77回日本癌学会学術総会 モーニングレクチャー.** 2018年9月28日 大阪
- 6) Maintenance of stemness and niche environment of breast cancer cells by FRS2 $\beta$ , a feedback inhibitor for HER2-ERK pathway, during mammary tumorigenesis  
**The 8<sup>th</sup> FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology.** 2018年9月4日 中国、上海
- 7) 乳がんの三次元培養とPDXを用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ  
**細胞凝集研究会 2018.** 2018年7月27日 山形
- 8) 乳がん幹細胞の制御機構と Patient-derived xenograft (PDX)モデル  
Regulatory mechanisms for breast cancer stem-like cells and patient-derived xenograft (PDX)  
**第65回日本実験動物学会総会 シンポジウム.** 2018年5月18日 富山
- 9) Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division of breast cancer stem-like cells  
**The 1<sup>st</sup> Meeting of International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM)**  
2018年3月16日 Busan
- 10) 乳がん幹細胞の基礎と治療への応用  
**第24回日本産婦人科乳腺医学会.** 2018年3月11日 九州
- 11) がん関連線維芽細胞による乳がん幹細胞維持機構の解析  
**2017 生命科学系学会合同年次総会 (ConBio2017).** 2017年12月 神戸
- 12) 乳がんスフェロイドとがん間質細胞培養を用いた腫瘍微小環境治療標的の探索  
**第1回がん三次元培養研究会.** 2017年12月 東京
- 13) ミトコンドリア1炭素代謝経路とがん幹細胞、薬剤抵抗性  
**第5回がんと代謝研究会.** 2017年7月 札幌
- 14) 増殖因子によるがん幹細胞とそのニッチ制御の分子機構  
**第9回シグナルネットワーク研究会.** 2017年5月 横浜
- 15) 一炭素代謝経路ミトコンドリア内酵素による肺がん幹細胞の維持  
**第27回日本サイトメトリー学会学術集会 難治がん～治療標的の同定と創薬への展望～.** 2017年5月 神戸
- 16) Growth factor signaling controls breast cancer stem-like cells and their niche
- 17) **The Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB)**

**International Conference 2017.** 2017年5月 Busan, 韓国

- 18) Semaphorin signal via MICAL3 induces symmetrical cell division of cancer stem-like cells  
2017 AACR Annual Meeting, Symposium “Tumor Stem Cell Biology” 2017年  
4月 ワシントン D.C. 米国

〔図書〕(計 5 件)

- 1) 「乳腺オルガノイド」  
西村建徳, Chen Xiaoxi, 後藤典子 実験医学増刊 (羊土社), p281-289, 2018.
- 2) 「がん幹細胞を維持する細胞内シグナル伝達系」  
村山貴彦, 後藤典子 病理と臨床: がんの幹細胞性の病理(文光堂) vol. 36(12), p1169-1173, 2018.
- 3) 「乳がんの治療抵抗性のメカニズムと PDX モデル」  
村山貴彦, 後藤典子 細胞: がん治療抵抗性のメカニズム解明(ニューサイエンス社) vol.49(7): p329-332, 2017.
- 4) 「One-carbon metabolism」  
西村建徳, 後藤典子 実験医学増刊: がん代謝 ワールブルグを超えて全容解明に挑む vol. 35(10): p46-51, 2017.
- 5) 「浸潤性粘液腺がん発症メカニズム」  
村山貴彦, 後藤典子 次世代がん治療最前線(NTS) p13-20, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

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

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等 <http://bunshibyotai.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。