

エストロゲン受容体陽性乳癌細胞における抗エストロゲン薬と mTOR 阻害薬エベロリムスの細胞増殖及び 癌幹細胞制御に対する効果

山下 哲正¹⁾, 紅林 淳一¹⁾, 鹿股 直樹²⁾,
下 登志朗¹⁾, 森谷 卓也²⁾, 園尾 博司¹⁾

1) 川崎医科大学乳腺甲状腺外科学, 〒701-0192 倉敷市松島577, 2) 同 病理学2

抄録 乳癌を含め多くの固形腫瘍において, 癌幹細胞 (CSC) が治療抵抗性や再発の原因となることが示唆されている。一方, エストロゲン感受性乳癌における CSC の制御機構に関する研究は少ない。そこで, エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳癌細胞におけるエストロゲンや抗エストロゲン薬 (抗 E 薬) の細胞増殖や CSC 制御に与える影響について検討した。さらに, 内分泌療法抵抗性乳癌に有効性が期待されている mTOR 阻害薬エベロリムス (EVE) と抗 E 薬との併用効果も検討した。ER 陽性乳癌の実験モデルとして, エストロゲン高感受性 (HS) の MCF-7, T-47D 乳癌細胞株, エストロゲン低感受性 (LS) の KPL-1, KPL-3C 乳癌細胞株を用いた。薬剤は, 17 β -estradiol (E2), 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), fulvestrant (FUL), EVE を用い, 細胞増殖, 細胞周期, アポトーシス, CSC 比率に与える影響を検討した。CSC の同定には, CD44/CD24/EpCAM 抗体を用いたフローサイトメトリー法及び mammosphere assay を用いた。ER- α , PgR および ER 関連転写因子 (GATA3等) の発現は免疫細胞化学的に検討した。結果として 1) LS 細胞株では, PgR の発現が認められなかった。それ以外の ER 関連因子は, HS 細胞株, LS 細胞株ともに高発現が認められた。2) HS 細胞株は LS 細胞株に比べ, E2による細胞増殖の促進効果, CSC 比率の増加効果が, ともにより顕著であった。3) HS 細胞株は LS 細胞株に比べ, 抗 E 薬による細胞増殖の抑制効果, CSC 比率の低下効果がより顕著であった。4) EVE と抗 E 薬の併用は, LS 細胞株において相加的な細胞増殖抑制効果を示した。両薬の併用により, 一部の細胞株では CSC 比率の減少効果が増強された。以上の結果は, LS 乳癌において, 抗 E 薬の増殖抑制効果ばかりでなく, CSC 比率の低下効果も減弱していることを示唆している。抗 E 薬抵抗性獲得のメカニズムの一つとして, CSC 制御機構の異常が関わっている可能性がある。また, 一部の乳癌細胞株において, 抗 E 薬と EVE 併用の結果から, 内分泌抵抗性乳癌における EVE の有用性が示唆された。
(平成25年2月12日受理)

キーワード: 乳癌, 癌幹細胞, エストロゲン受容体, 抗エストロゲン薬, エベロリムス

緒言

1997年に Dick らが白血病における癌幹細胞 (cancer stem cell, CSC) の存在を示して以来¹⁾,

固形腫瘍においても CSC の研究が進められ, 2003年には Clarke らにより乳癌幹細胞の存在が示された²⁾。

別刷請求先
紅林淳一
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学乳腺甲状腺外科学

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (462) 1199
Eメール: kure@med.kawasaki-m.ac.jp

2006年のAmerican Association for Cancer Research (AACR) のワークショップにおいて、CSCは「腫瘍内に存在し、自己再生能および腫瘍を形成する様々な系統の癌細胞を生み出す能力を併せ持つ細胞」と定義されている³⁾。またCSCは、化学療法や放射線療法に抵抗性を持ち、癌治療後にみられる再発や転移の原因となっていることが基礎研究により示唆されている⁴⁾。

一方、エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) 陽性乳癌におけるCSCの制御機構に関する研究は少ない⁵⁻⁷⁾。ER陽性乳癌は一般的に術後の予後は良好であるが、時に晩期再発をきたす特徴がある。この晩期再発の原因として、術後薬物療法に抵抗性を持ち、自己再生を繰り返して長期生存するCSCの存在が推測される。そこで我々は、ER陽性乳癌細胞におけるエストロゲンや抗エストロゲン薬の細胞増殖、CSC制御などに与える影響について検討した。

また近年、臨床試験において mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬エベロリムス (EVE) の内分泌療法抵抗性乳癌に対する有効性が報告されている^{8,9)}。しかし、EVEがER陽性乳癌細胞株のCSCに与える影響について検討した報告はない。そこで、EVEと抗エストロゲン薬の同時併用の細胞増殖、CSC制御に与える影響も検討した。

材料と方法

ヒト乳癌細胞株

4種類のER陽性乳癌細胞株MCF-7, T-47D, KPL-1, KPL-3Cを乳癌の実験モデルとして用いた。KPL-1, KPL-3C細胞株は内分泌療法耐性となった再発乳癌患者の癌性胸水から当科で樹立した細胞株である^{10,11)}。MCF-7, T-47D細胞株は、Georgetown大学の故Robert B. Dickson博士から供与された。ヌードマウスへの移植実験やエストロゲン除去培地における細胞増殖の検討結果から、MCF-7, T-47D細胞株はエストロゲン高感受性 (high estrogen-sensitivity, HS)、KPL-1, KPL-3C細胞株はエストロゲン低感

受性 (low estrogen-sensitivity, LS) と考えられた¹⁰⁻¹⁴⁾。

試薬と培養条件

17 β -estradiol (E2), 非ステロイド系抗エストロゲン薬4-hydroxytamoxifen (4-OHT), ステロイド系抗エストロゲン薬fulvestrant (FUL), mTOR阻害薬EVEは、Sigma-Aldrich Japan (日本) から購入した。E2と4-OHTは100%エタノール、FULとEVEはジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、ストック溶液を作製した。培地中のエタノールやDMSOの最終濃度が0.2%以下になるようにストック溶液を培地に添加した。

すべての細胞株は、通常、Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Sigma-Aldrich, 米国) に10%牛胎児血清 (fetal bovine serum [FBS], Sigma-Aldrich Japan, 日本) を添加した培地を用い、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂下で培養した。薬剤の細胞増殖に与える影響を調べる実験では、ウェル当たり2-5 \times 10³個の各種乳癌細胞を24穴マルチウェルプレート (IWAKI, 日本) に播き、D-MEM + 10% FBSで2日間培養した。その後、培地を除去し、各ウェルをphosphate-buffer saline (PBS) で洗浄した。その後、フェノールレッド無添加RPMI1640 (Sigma-Aldrich Japan) に2% dextran-coated charcoal (DCC)-stripped FBSを添加した培地 (エストロゲン除去培地) に各試薬を指定濃度に加え、3日間培養した。その後、培地を除去、PBSで洗浄し、0.05%トリプシン + 0.02% EDTA入りPBS (細胞分散液) を用いて細胞を分散し、Coulter counter (Coulter Electronics, 英国) を用い細胞数を計測した。再現性をみるため、2回以上同様の実験を行った。

薬剤による増殖抑制効果の評価には、50%細胞増殖阻止濃度 (IC₅₀) を用いた。また、EVE (10 nMに統一) と抗エストロゲン薬 (4-OHTは0.01-10 μ M, FULは0.01-1 μ M) の併用効果の評価には、EVEと併用時の抗エストロゲン薬のIC₅₀を単剤の抗エストロゲン薬のIC₅₀で割って求めたcombination indexを用い、0.5未満を相加効果ありと判定した¹⁵⁾。

細胞周期、アポトーシス、CSC比率を分析

する際には, 各種乳癌細胞を6ウェルマルチプレート (IWAKI) に播種し, D-MEM + 10% FBS 培地を用い2日間培養した. その後, 培地を除去し, 各ウェルをPBSで洗浄し, エストロゲン除去培地に1 nM E2と各種薬剤を指定濃度加え, 3日間培養した. その後, 培地を除去, PBSで洗浄し, 細胞分散液を用いて細胞を分散し, 直ちに各々の分析を行った.

免疫細胞化学的検討

各種乳癌細胞を75 cm²フラスコ (IWAKI) に播種し, D-MEM + 10% FBS 培地で2日間培養した. 培地を除去し, 各ウェルをPBSで洗浄, エストロゲン除去培地でさらに3日間培養した.

その後, 培地を除去, PBSで洗浄し細胞分散液を用い細胞を分散した. その細胞浮遊液からHOLD GEL110 (アジア器材, 日本) を用い細胞ペレットを作製した. この細胞ペレットを10% 中性ホルマリン (岩井化学薬品, 日本) で固定した. 脱水後パラフィン包埋し, ブロックを作製し, 5 μ m の薄切切片を作製. 脱パラフィンおよび水和後に, ホットバスによる抗原賦活をTarget retrieval solution (pH9.0, Dako, デンマーク) を用い, 95°Cで40分間行った. 続いて, 内因性ペルオキシダーゼ活性は3% 過酸化水素で5分かけて不活化した. その後, 各種一次抗体と室温で30分間反応させた. EnVision+ System (Dako) を用いて二次抗体を反応させ, トリス緩衝液で洗浄後, ジアミノベンチジンをういて発色させた. 対比染色としてヘマトキシリン染色を用いた¹⁵⁾. 抗体の種類や反応条件を表1に示す.

表1 免疫細胞化学的検索方法

一次抗体	製造会社	希釈率
抗 ER- α 抗体 (Clone: 1D5)	Dako	1:800
抗 PgR 抗体 (Clone: PgR 636)	Dako	1:800
抗 GATA-3 抗体 (Clone: HG3-31)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY.	1:100
抗 FOXA1 抗体 (Clone: 2F83)	Abcam	1:2000
抗 XBP-1 抗体 (Polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY.	1:100

細胞周期分析

回収した細胞を Cell Test Plus DNA Reagent kit (Becton Dickinson, 米国) を用い DNA を染色後, FACS Calibur (Becton Dickinson) でフローサイトメトリーを施行した. DNA ヒストグラムは, CellQuest Pro (Becton Dickinson) を用い分析した¹⁵⁾. 再現性をみるため, 2回以上同様の実験を行った.

アポトーシス分析

回収した細胞を *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics GmbH, ドイツ) を用いて処理し, FACS Calibur でフローサイトメトリーを施行した. 解析には CellQuest Pro を用いた¹⁵⁾. 再現性をみるため, 2回以上同様の実験を行った.

フローサイトメーターによる癌幹細胞比率の分析

回収した細胞を2 \times 10⁵ずつ分注し, 抗 CD44 抗体 (PE 標識マウス抗ヒトイムノグロブリン抗体, Becton Dickinson) 20 μ l, 抗 CD24抗体 (FITC 標識マウス抗ヒトイムノグロブリン抗体, Becton Dickinson) 20 μ l, 抗 EpCAM 抗体 (PerCP-Cy5.5標識マウス抗ヒトイムノグロブリン抗体, Becton Dickinson) 4 μ l を順次反応させ, FACS Caliber を用いてフローサイトメトリーを施行した. その後, CellQuest Pro を用いて分析した. CD24^{low}/CD44⁺/EpCAM⁺ を CSC と同定した^{15, 16)}. 再現性をみるため, 2回以上同様の実験を行った.

Mammosphere assay

各種癌細胞株を60 mm 径の培養皿 (Becton Dickinson) に播種し, D-MEM + 10% FBS 培地で2日間培養した. その後, 培地を除去し, 細胞をPBSで洗浄, エストロゲン除去培地に各試薬を指定濃度加え, 6日間培養した. その後, 培地を除去, PBSで洗浄し, 細胞分散液を加え, 21G 針を用い十分に細胞分散した. 細胞浮遊液を MammoCult medium (Veritas, 米国) を用いて1,000個/2 ml になるよう調整し, Ultra Low Cluster Plate (COSTER, 米国) に播き, 7日間培養した. その後, 位相差顕鏡 CKX41

(OLYMPUS, 日本) で観察し, 60 μ m 以上の大きさのコロニーを mammosphere と判定し, コロニー数を計測した^{6,7)}. 再現性を見るため, 2 回以上同様の実験を行った.

統計学的処理

計測データは StatView ソフトウェア Version 5.0 (HULINKS, 日本) を用い統計学的処理を行い, 平均値 \pm 標準誤差で提示した. 連続変数の群間比較は分散分析を用いた. P 値が 0.05 未満を統計学的に有意差があると判定した.

結果

ER 関連蛋白の発現

LS 細胞株の KPL-1, KPL-3C では, PgR の染色陽性率は 0% であった. 一方, HS 細胞株の MCF-7 では, PgR は低発現, T-47D は高発現

を示した. それ以外の ER 関連蛋白質 ER- α , GATA3, FOXA1, XBP1 は, すべての細胞株において高発現がみられた (表 2).

E2 による細胞増殖促進効果

1 nM E2 を添加し, 3 日間培養した後の細胞増殖促進率は, HS 細胞株の MCF-7, T-47D では各々, 464.2 \pm 76.0%, 443.7 \pm 36.9% に対し, LS 細胞株の KPL-1, KPL-3C では各々, 165.8 \pm 15.5%, 218.3 \pm 15.7% であり, HS 細胞株は LS 細胞株と比較し, 増殖促進率が有意に高かった (図 1).

4-OHT, FUL による細胞増殖抑制効果

4-OHT の IC₅₀ は, HS 細胞株の MCF-7, T-47D では 1 μ M 未満に対し, LS 細胞株の KPL-1, KPL-3C では 2 μ M 超であった (表 3). HS 細胞株は LS 細胞株に比べ, 4-OHT による細胞増

表 2 4 種類の乳癌細胞株における ER 関連蛋白質の免疫染色陽性率 (単位: %)

標的/細胞株	MCF-7	T-47D	KPL-1	KPL-3C
ER- α	90.0 \pm 10.0	70.0 \pm 30.0	52.5 \pm 42.5	35.0 \pm 15.0
PgR	3.5 \pm 3.5	90.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
GATA-3	92.5 \pm 2.5	97.5 \pm 2.5	100.0 \pm 0.0	72.5 \pm 22.5
FOXA1	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
XBP-1	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	95.0 \pm 5.0

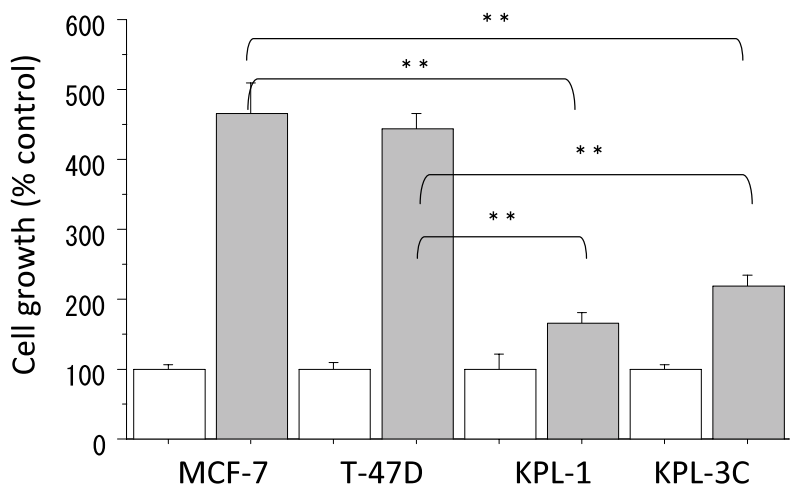


図 1 E2 による細胞増殖促進効果

MCF-7 細胞と T-47D 細胞の間, KPL-1 細胞と KPL-3C 細胞の間では, E2 による細胞増殖促進効果に有意差は見られなかった. 一方, MCF-7 細胞と KPL-1 細胞及び KPL-3C 細胞間には有意差を認めた ($P < 0.0001$). 同様に, T-47D 細胞と KPL-1 細胞及び KPL-3C 細胞間にも有意差を認めた ($P < 0.0001$). 白抜き棒は E2 非添加時の平均値, 灰色棒は E2 添加時の平均値. エラーバーは標準誤差. **, $P < 0.01$.

殖抑制効果が強い傾向であったが, 統計学的有意差は認められなかった. FUL の IC50 は, HS 細胞株の MCF-7, T-47D では 0.05 μ M 未満に対し, LS 細胞株の KPL-1, KPL-3C では 0.20 μ M 超であった (表 3). HS 細胞株は LS 細胞株に比べ, FUL による細胞増殖抑制効果が有意に強かった (MCF-7 vs. KPL-1, $P < 0.0001$; MCF-7 vs. KPL-3C, $P = 0.0120$; T-47D vs. KPL-1, $P = 0.0201$; T-47D vs. KPL-3C, $P = 0.0455$).

E2, 4-OHT, FUL の細胞周期, アポトーシスに与える影響

4 細胞株すべてにおいて, E2 により G1-S 細胞周期移行が促進され, 抗エストロゲン薬によりその促進が阻害された (図 2). また, 4 細胞株すべてにおいて, E2 はアポトーシスを減少し, 抗エストロゲン薬はその減少を阻害した (図 3).

E2, 4-OHT, FUL による CSC 比率の変化

フローサイトメトリー法による CSC 比率

の検討では, 4 細胞株すべてにおいて, E2 は CSC 比率を増加させた (MCF-7 で 7.73 \pm 1.34 倍, T-47D で 13.80 \pm 2.80 倍, KPL-1 で 2.86 \pm 0.21 倍, KPL-3C で 2.26 \pm 0.25 倍). LS 細胞株は HS 細胞株と比べ, E2 による CSC 比率の増加効果が有意に弱かった (図 4 A, 4 B).

Mammosphere assay では, 4 細胞株すべてにおいて, E2 により有意に mammosphere 数の増加が見られた (MCF-7 で 2.50 \pm 0.50 倍, T-47D で 1.84 \pm 0.70 倍, KPL-1 で 1.92 \pm 0.20 倍, KPL-3C で 2.00 \pm 0.29 倍). しかし, LS 細胞株と HS 細胞株との間に有意の差は認められなかった (図 5 A, 5 B).

フローサイトメトリー法では, 4-OHT, FUL 投与により 4 細胞株すべてにおいて, E2 により増加した CSC 比率が有意に低下した (図 6). また, mammosphere assay では, 4-OHT, FUL 投与により 4 細胞株すべてにおいて, E2 による mammosphere 数の増加が抑制された (図 7).

表 3 各種薬剤の 50% 細胞増殖阻止濃度 (単位: μ M)

試薬/細胞株	MCF-7	T-47D	KPL-1	KPL-3C
4-OHT	0.706 \pm 0.101	0.148 \pm 0.036	2.337 \pm 0.184	2.695 \pm 1.504
FUL	0.036 \pm 0.002	0.029 \pm 0.008	0.220 \pm 0.061	0.225 \pm 0.068
EVE	6.301 \pm 1.540	0.811 \pm 0.312	27.914 \pm 10.339	6.309 \pm 1.630

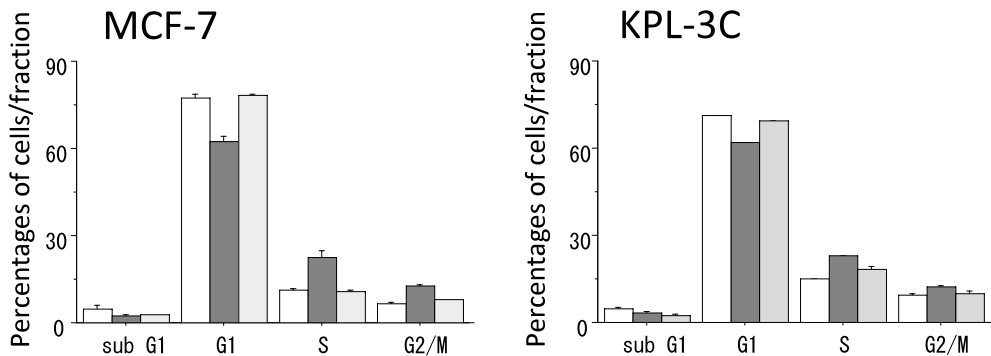


図 2 E2 及び抗エストロゲン薬の細胞周期に与える影響

すべての細胞株において E2 による G1-S 移行促進 (G1 期細胞比率低下, S 期細胞比率の増加) 及び抗エストロゲン薬による E2 の効果の阻害が認められた. 代表的な結果として, MCF-7 細胞における E2 及び 4-OHT の効果, KPL-3C 細胞における E2 及び FUL の効果を提示する. 白抜き棒は E2 非添加時, 黒い棒は E2 添加時, 灰色棒は E2 + 抗エストロゲン薬添加時. エラーバーは標準誤差.

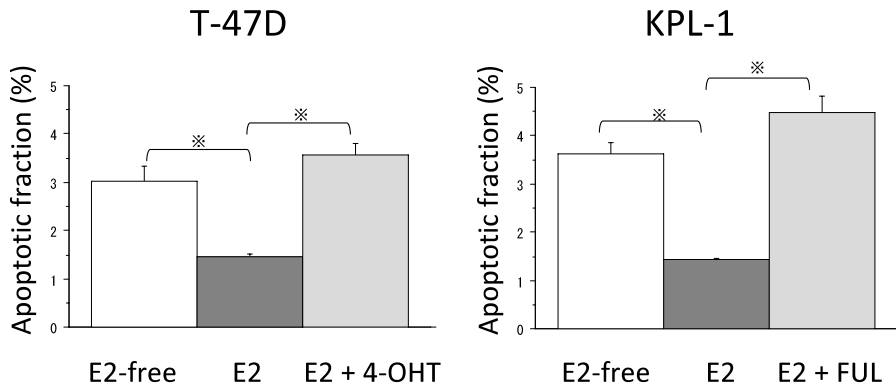


図3 E2及び抗エストロゲン薬のアポトーシスに与える影響

すべての細胞株においてE2によりアポトーシス分画比率の低下が認められ、抗エストロゲン薬による増加が認められた。代表的な結果として、T-47D細胞におけるE2及び4-OHTの効果、KPL-1細胞におけるE2及びFULの効果を示す。白抜き棒はE2非添加時、黒い棒はE2添加時、灰色棒はE2+抗エストロゲン薬添加時。エラーバーは標準誤差。*, P < 0.05。

図4 A

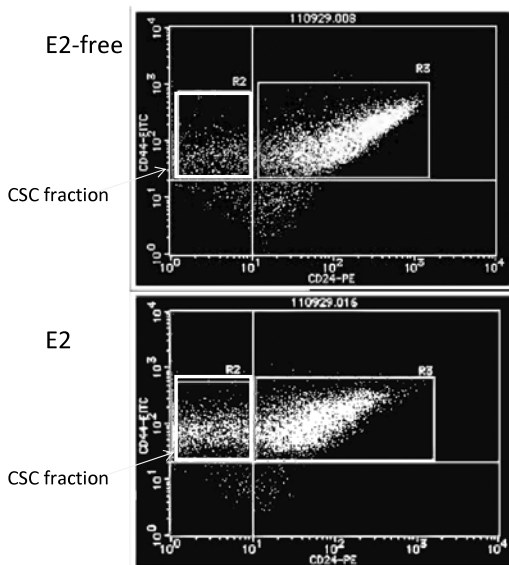


図4 B

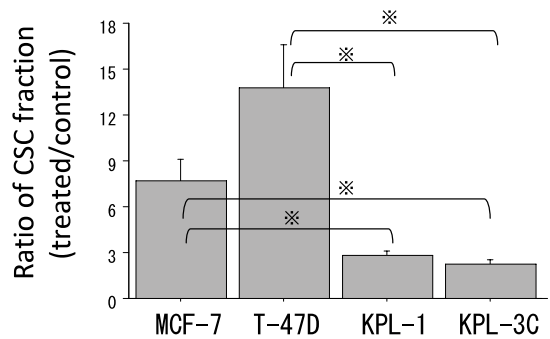


図4 E2によるCSC比率の増加効果(フローサイトメトリー法)

すべての細胞株においてE2によりCSC比率の増加が認められた。A: MCF-7細胞におけるフローサイトメトリーによるCD24-/low/CD44+/EpCAM+分画の変化。B: CSC比率のE2による変化率。灰色棒は平均値。エラーバーは標準誤差。*, P < 0.05。

図5 A

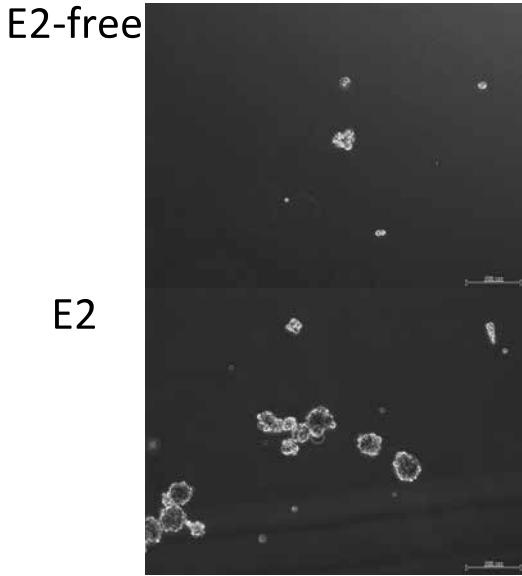


図5 B

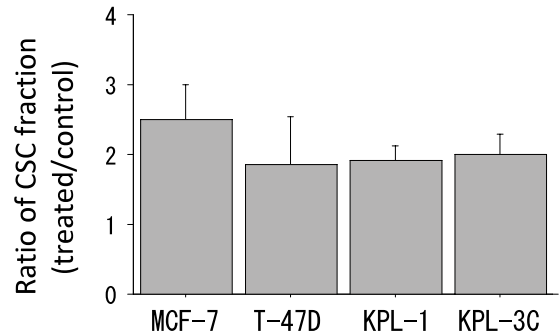


図5 E2による mammosphere 数の増加効果 (Mammosphere assay)

すべての細胞株において E2 により mammosphere 数の増加が認められた。A: T-47D 細胞における mammosphere の変化 (位相差顕微鏡写真, スケールは 200 μ m); E2 により mammosphere 数が増加し, 大きさも増大した。B: Mammosphere 数の E2 による増加率。灰色棒は平均値。エラーバーは標準誤差。

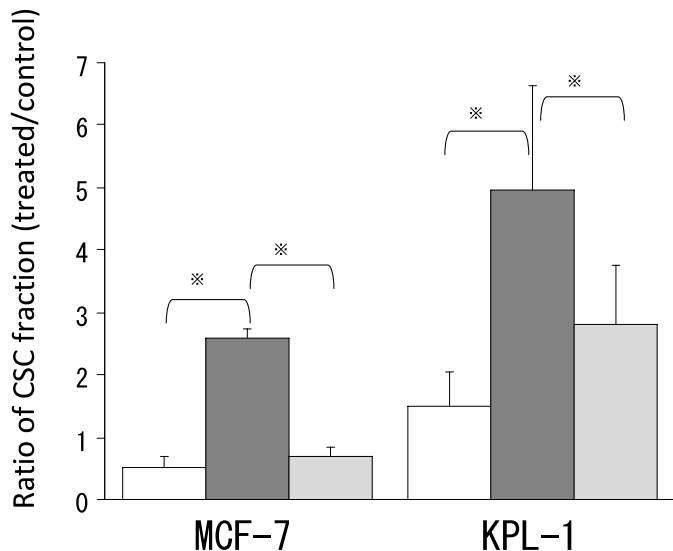


図6 抗エストロゲン薬による CSC 比率の変化 (フローサイトメトリー法)

すべての細胞株において E2 により CSC 比率の増加が抗エストロゲン薬により抑制された。代表的な結果として, MCF-7 細胞における E2, 4-OHT の CSC 分画比率の変化及び KPL-1 細胞における E2, FUL の CSC 比率の変化を示す。白抜き棒は E2 非添加時, 黒い棒は E2 添加時, 灰色棒は E2 + 抗エストロゲン薬添加時。エラーバーは標準誤差。*, $P < 0.05$ 。

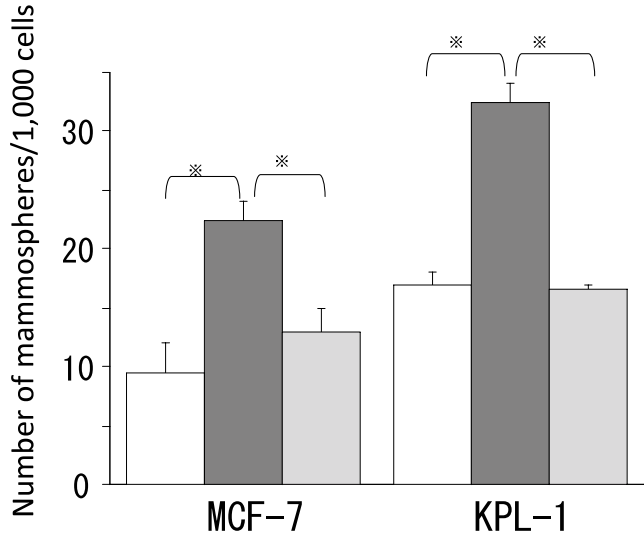


図7 抗エストロゲン薬による mammosphere 数の変化 (Mammosphere assay)

すべての細胞株において E2 により mammosphere 数の増加が抗エストロゲン薬により抑制された。代表的な結果として、MCF-7 細胞における E2, 4-OHT の mammosphere 数の変化及び KPL-1 細胞における E2, FUL の mammosphere 数の変化を示す。白抜き棒は E2 非添加時、黒い棒は E2 添加時、灰色棒は E2 + 抗エストロゲン薬添加時。エラーバーは標準誤差。*, $P < 0.05$ 。

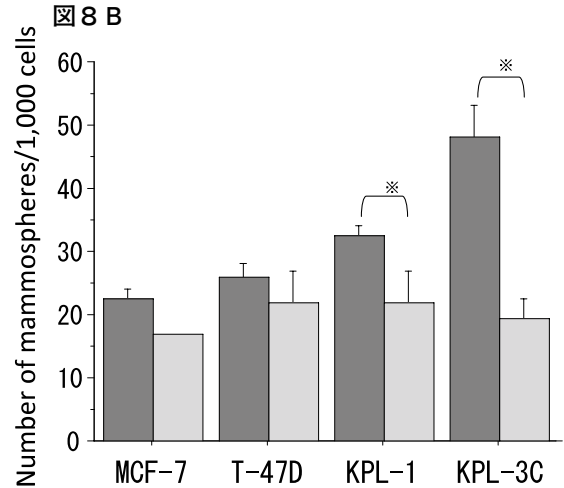
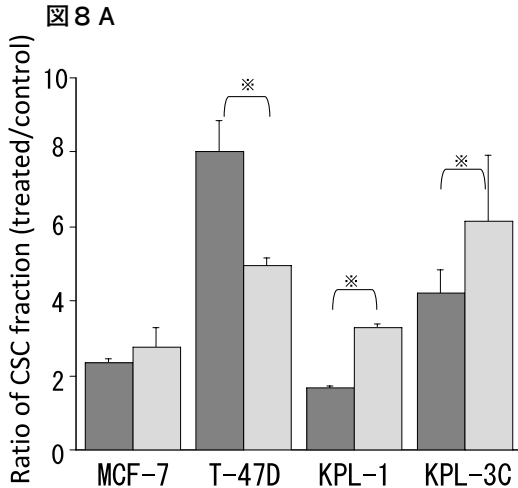


図8 EVE による CSC 比率 (フローサイトメトリー法) 及び mammosphere 数 (Mammosphere assay) の変化

E2 単独及び E2 + EVE 添加時の CSC 比率と mammosphere 数の変化を比較した。A: E2 による CSC 比率の増加が、EVE により抑制される細胞株と促進される細胞株に別れた。B: E2 による mammosphere 数の増加は、すべての細胞株において EVE により抑制された。黒い棒は E2 添加時、灰色棒は E2 + EVE 添加時。エラーバーは標準誤差。*, $P < 0.05$ 。

EVE による細胞増殖抑制効果と CSC 比率の変化

E2 存在下の EVE 単独の IC_{50} は、4 細胞株で $0.81 - 27.91 \mu M$ と幅があり、HS 細胞株と LS 細胞株間で有意差は認められなかった(表 3)。

フローサイトメトリー法による CSC 比率の検討では、EVE により MCF-7 細胞株では有意の変化はなく、T-47D 細胞株では若干の低下、KPL-1, KPL-3C 細胞株では有意の増加がみられた(図 8A)。一方、mammosphere assay

では, EVE により KPL-1, KPL-3C 細胞で有意な mammosphere 数の減少がみられた. MCF-7, T-47D 細胞でも mammosphere 数の減少傾向が認められた (図 8B).

EVE と 4-OHT, FUL との同時併用効果

すべての細胞株において, EVE は抗エストロゲン薬の抗腫瘍効果を増強した (図 9). Combination index を用いた併用効果の分析では, LS 細胞株の KPL-1, KPL-3C では, 相加的效果がみられた (表 4).

フローサイトメトリー法による CSC 比率の検討では, 抗エストロゲン薬に EVE を併用した場合, 抗エストロゲン薬による CSC 比率減少効果は, EVE 併用による有意の影響を受けなかった (データ非提示). 一方,

mammosphere assay では, MCF-7, KPL-3C 細胞株において, 4-OHT または FUL 単剤に比べ, EVE の同時併用で有意に mammosphere 数が減少した (図 10A, 10B).

考 察

乳癌は, 前立腺癌や子宮内膜癌とともにホルモン依存性癌の一つに数えられ, エストロゲンが乳癌の発生や進展に寄与している. この乳癌のエストロゲン依存性を逆手にとったのが, 乳癌の内分泌療法であり, 抗エストロゲン薬, LH-RH アゴニスト, アロマターゼ阻害薬などが, 術後の再発予防や再発乳癌の治療に広く用いられてきている. しかし, 乳癌のエストロゲン依存性は, 腫瘍の増大・進展や治療の修飾

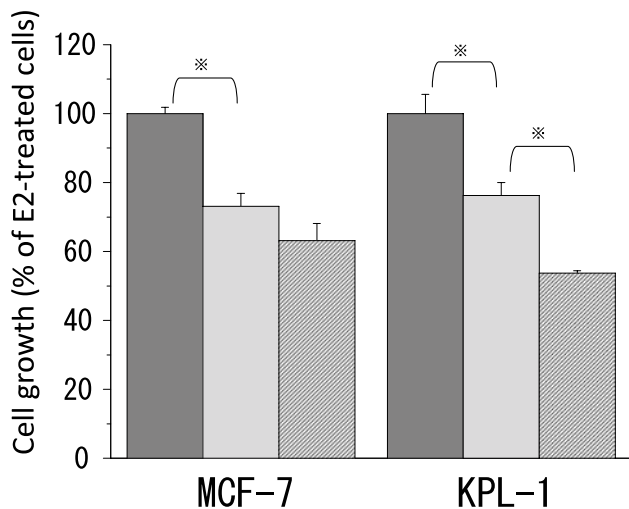


図 9 EVE による抗エストロゲン薬の増殖抑制効果の促進

すべての細胞株において, EVE により抗エストロゲン薬の増殖抑制効果が増強された. 代表的な結果として, MCF-7 細胞に対する 4-OHT と EVE, KPL-1 細胞における FUL と EVE の併用効果を示す. 後者においては, 両薬の併用による相加的増殖抑制効果が示された. 黒い棒は E2 添加時, 灰色棒は E2 + 抗エストロゲン薬添加時, 斜線棒は E2 + 抗エストロゲン薬 + EVE 添加時. エラーバーは標準誤差. *, $P < 0.05$.

表 4 EVE の抗エストロゲン薬に対する Combination index

試薬/細胞株	MCF-7	T-47D	KPL-1	KPL-3C
4-OHT	0.507 ± 0.169	1.082 ± 0.262	0.158 ± 0.045	0.329 ± 0.238
FUL	0.641 ± 0.132	2.770 ± 1.525	0.299 ± 0.095	0.089 ± 0.025

図10A

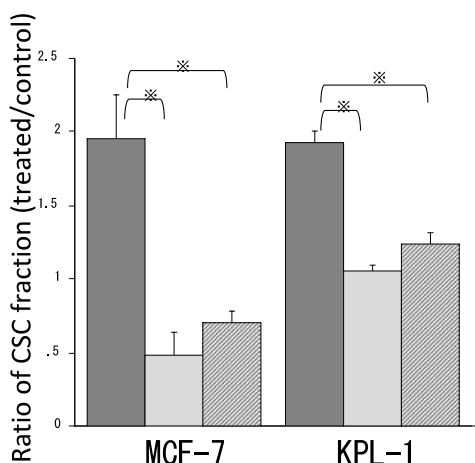


図10B

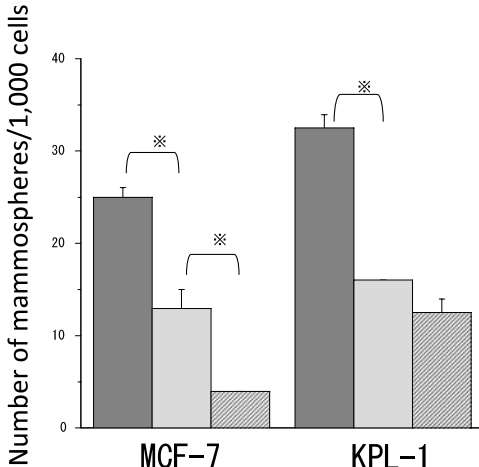


図10 EVE と抗エストロゲン薬の併用による CSC 比率(フローサイトメトリー法)及び mammosphere 数(Mammosphere assay) の変化

E2 単独及び E2 + 抗エストロゲン薬添加時, E2 + 抗エストロゲン薬 + EVE 添加時の CSC 比率と mammosphere 数の変化を検討した. A: E2 による CSC 比率の増加が, 抗エストロゲン薬により抑制されたが, EVE の併用は有意の変化を与えなかった. 代表的な結果として, MCF-7 細胞に対する 4-OHT と EVE, KPL-1 細胞における FUL と EVE の併用効果を示す. B: すべての細胞株において, EVE により抗エストロゲン薬の mammosphere 数減少効果が増強された. 代表的な結果として, MCF-7 細胞に対する 4-OHT と EVE, KPL-1 細胞における FUL と EVE の併用効果を示す. 黒い棒は E2 添加時, 灰色棒は E2 + 抗エストロゲン薬添加時, 斜線棒は E2 + 抗エストロゲン薬 + EVE 添加時. エラーバーは標準誤差. *, $P < 0.05$.

により失われ, 内分泌療法に対する抵抗性を獲得する. 乳癌における内分泌療法抵抗性獲得の分子メカニズムに関しては, 長年に渡り, 数多くの研究が行われてきている¹⁷⁾. しかし, 内分泌療法抵抗性獲得の本体に迫る分子メカニズムは, 未だ解明されていない.

近年, 乳癌を含む固形腫瘍においても CSC が存在し, 化学療法や放射線に対する抵抗性や再発の発生に寄与していることが示されてきている¹⁸⁾. 乳癌の CSC は, ER が陰性であり, 内分泌療法の効果は期待できず, 内分泌療法抵抗性の発生に寄与することが推測されている¹⁹⁾. しかし, E2 や内分泌療法薬による ER 陽性乳癌における CSC の制御機構や抵抗性獲得との関連を調べた研究は少ない. そこで我々は, エストロゲン感受性が高い 2 種類の乳癌細胞株 MCF-7, T-47D と感受性が低い 2 種類の乳癌細胞株 KPL-1, KPL-3C を用い, E2 と抗エストロゲン薬の細胞増殖や CSC 制御機構に関する基礎的な研究を行なった. さらに, アロマトーゼ

阻害薬抵抗性の進行・再発乳癌において, 内分泌療法薬と併用することで相加的抗腫瘍効果が認められている mTOR 阻害薬 EVE^{8,9)} と抗エストロゲン薬との併用の細胞増殖や CSC 制御に与える影響も検討した.

今回用いた 4 種類の ER 陽性乳癌細胞株のすべてにおいて, E2 による細胞増殖の促進が認められた. さらに, 細胞増殖促進の共通のメカニズムとして, G1-S 移行促進による細胞回転の加速, アポトーシス分画の減少が示された. これらの結果は, 我々及び他の研究者の研究報告と合致する²⁰⁻²²⁾. 今回の研究結果で興味深いのは, エストロゲン感受性の高い MCF-7, T-47D 細胞株に比べ, 感受性の低い KPL-1, KPL-3C 細胞株では, E2 や抗エストロゲン薬に対する感受性が, 有意に異なることが明らかにされたことである (図 1). さらに, エストロゲン感受性が異なる細胞株間において, ER- α や ER 関連転写因子 GATA3, FOXA1, XBP1 の発現量には, 有意の差がないものの, ER の標

的遺伝子の一つ PgR が, 低感受性細胞株において全く発現が認められなかったのは興味深い(表2)。最近の我々の研究やその他の研究者の報告にもあるように, PgR は ER 陽性乳癌の予後規定因子にも数えられており^{23,24)}, PgR の発現が低下した ER 陽性乳癌では, 内分泌療法に対する感受性が低下していることが推測される。

さらに, 今回の研究では, E2により ER 陽性乳癌の CSC population の拡大(CSC 比率の増大)がみられた。これまで数報において, 同様な結果が報告されている^{6,7,25,26)}。しかし, E2や抗エストロゲン感受性の異なる ER 陽性乳癌細胞株において, 細胞増殖に与える効果とほぼ比例して, CSC 比率の増加がみられる(図4)との研究結果は, これまで報告されていない。これらの結果は, ER 陽性乳癌においては, エストロゲン感受性と CSC の制御機構とが密に関連していることを推測させる。

エストロゲンによる CSC population の制御機構としては, 現在, 2つの作業仮説が提唱されている。一つは, エストロゲンによる ER 陽性 non-stem cancer cells からのバラクリン因子(fibroblast growth factor [FGF]-7が提唱されている)の分泌増加→ER 陰性 CSC の FGF 受容体を介した Tbx3経路の活性化による CSC population の拡大である⁶⁾。もう一つは, エストロゲンによるプロモータ領域の ERE を介した miR-140の発現低下→転写因子 SOX-2の活性化→CSC 自己再生の促進による CSC population の拡大である⁷⁾。今回の研究では, CSC 制御の分子機構に関する検討はできていないが, 今後, 我々も分子機構の解明に着手する予定である。

乳癌の内分泌療法, とくにアロマターゼ阻害薬に対する抵抗性獲得のメカニズムの一つとして, mTOR シグナル伝達の亢進が前臨床研究により示されている²⁷⁾。さらに, 最近行われた二つの臨床試験において, アロマターゼ阻害薬抵抗性進行・再発乳癌に対し, mTOR 阻害薬 EVE とステロイド系アロマターゼ阻害薬 exemestane または抗エストロゲン薬 tamoxifen

の併用が, 各々の内分泌療法単独に比べ, 無病生存率や全生存率を有意に改善することが示されており, 多くの注目を集めている^{8,9)}。そこで, 今回の研究では, エストロゲン感受性が低下した ER 陽性乳癌細胞における EVE の抗腫瘍効果や CSC に与える影響を調べる目的で, EVE を研究対象試薬として加えた。

EVE 単独での ER 陽性乳癌細胞株に対する抗腫瘍効果は, IC₅₀が0.8–28 μ M と幅が広く, エストロゲン感受性と相関は認められなかった(表3)。一方, 抗エストロゲン薬との併用では, エストロゲン低感受性の細胞株においてのみ, 有意の相加的抗腫瘍効果が認められた(表4, 図9)。これらの結果は, 最近の臨床試験結果でみられたように^{8,9)}, 内分泌療法に抵抗性(エストロゲン低感受性とほぼ同義)となった ER 陽性乳癌に対し, EVE と抗エストロゲン薬の併用投与は, 抗エストロゲン薬単独に比べ, より強い抗腫瘍効果をもたらすことと一致した。

EVE 単独の CSC population に与える影響は, エストロゲン感受性との相関はなく, さらに, フローサイトメーター法と mammosphere assay との研究結果に乖離がみられた(図8)。また, 抗エストロゲン薬との併用でも, フローサイトメーター法と mammosphere assay との研究結果に乖離がみられた(図10)。これらの結果は, 1) EVE の抗腫瘍効果と CSC 制御機構には, 明らかな相関がないこと, 2) CSC を検出する2つの方法は, 同一の population を検出しているのではないことを推測させる。1)に関しては, 抗腫瘍効果と CSC 制御機構との関連を ER 陽性乳癌細胞でみた研究報告はこれまでにない。しかし, EVE による細胞増殖抑制と CSC 制御の分子メカニズムが異なることは, 十分に推測可能である²⁸⁾。また, 2)に関しては, フローサイトメーター法が, 薬剤処理直後の CD44/CD24/EpCAM の発現状況を分析するのに対し, mammosphere assay は, 薬剤処理後に分散された細胞の中で, 6日間でコロニー形成能のある細胞数(CSC 細胞数と一致すると考えられている)をみる検査であり, 必ずしも結果

が一致しないことは推測可能である。少なくとも、EVE と抗エストロゲン薬との併用により、CSC population が著明に増加することがなく、また、一部の細胞株では CSC 比率の低下が抗エストロゲン薬単独より増強されることは、臨床における治療効果を推測する上では、有利な変化である。

結 語

(1) ER 陽性乳癌において、抗エストロゲン薬は細胞増殖抑制効果ばかりでなく、CSC 比率を低下させる効果があることが示された。

(2) エストロゲン低感受性乳癌において、抗エストロゲン薬の細胞増殖抑制効果や CSC 比率低下効果が減弱していることが示唆された。内分泌治療法抵抗性獲得のメカニズムに CSC 制御機構の異常が関わっている可能性が示唆された。

(3) エストロゲン低感受性乳癌において、抗エストロゲン薬と mTOR 阻害薬の同時併用投与が有効であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に協力頂きました川崎医科大学乳腺甲状腺外科学研究補助員の萩原 喜美子さん、坪井 薫さん、小郷 愛さんに深謝いたします。また、本研究は、科学研究費補助金基盤研究 (C) (課題番号23591911) 及び川崎医科大学プロジェクト研究 (課題番号23基-18, 24基-5) の援助を受けて実施した。

引用文献

- 1) Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737, 1997
- 2) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983-3988, 2003
- 3) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.

Cancer Res 66: 9339-9344, 2006

- 4) Li X, Lewis MT, Huang J, *et al.*: Intrinsic resistant of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100: 672-679, 2008
- 5) Konduri SD, Medisetty R, Liu W, *et al.*: Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15081-15086, 2010
- 6) Fillmore CM, Gupta PB, Rudnick JA, Caballero S, Keller PJ, Lander ES, Kuperwasser C: Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21737-21742, 2010
- 7) Zhang Y, Eades G, Yao Y, Li Q, Zhou Q: Estrogen Receptor α Signaling Regulates Breast Tumor-initiating Cells by Down-regulating miR-140 Which Targets the Transcription Factor SOX2. *J Biol Chem* 287: 41514-41522, 2012
- 8) Baselga J, Campone M, Piccart M, *et al.*: Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 366: 520-529, 2012
- 9) Bachelot T, Bourcier C, Cropet C, *et al.*: Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *J Clin Oncol* 30: 2718-2724, 2012
- 10) Kurebayashi J, Kurosumi M, Sonoo H: A new human breast cancer cell line, KPL-1 secretes tumour-associated antigens and grows rapidly in female athymic nude mice. *British Journal of Cancer* 71: 845-853, 1995
- 11) Kurebayashi J, Kurosumi M, Sonoo H: A new human breast cancer cell line, KPL-3C, secretes parathyroid hormone-related protein and produces tumours associated with microcalcifications in nude mice. *Br J Cancer* 74: 200-207, 1996
- 12) Shafie SM, Grantham FH: Role of hormones in the growth and regression of human breast cancer cells (MCF-7) transplanted into athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* 67: 51-56, 1981
- 13) Leung CK, Shiu RP: Required presence of both estrogen and pituitary factors for the growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res*, 41: 546-551, 1981

- 14) Kurebayashi J, Otsuki T, Yamamoto S, Kurosumi M, Nakata T, Akinaga S, Sonoo H: A pure antiestrogen, ICI 182,780, stimulates the growth of tamoxifen-resistant KPL-1 human breast cancer cells in vivo but not in vitro. *oncology* 55(Suppl.1): 23-34, 1998
- 15) Shimo T, Kurebayashi J, Kanomata N, Yamashita T, Kozuka Y, Moriya T, Sonoo H: Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells. *Breast Cancer*. 2012 Mar 28. [Epub ahead of print]
- 16) Pandey PR, Okuda H, Watabe M, Pai SK, Liu W, Kobayashi A, Xing F, Fukuda K, Hirota S, Sugai T, Wakabayashi G, Koeda K, Kashiwaba M, Suzuki K, Chiba T, Endo M, Fujioka T, Tanji S, Mo YY, Cao D, Wilber AC, Watabe K: Resveratrol suppresses growth of cancer stem-like cells by inhibiting fatty acid synthase. *Breast Cancer Res Treat* 130: 387-398, 2011
- 17) Kurebayashi J: Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 Suppl 1: 39-46, 2005
- 18) Kakarala M, Wicha MS: Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 26: 2813-2820, 2008
- 19) O'Brien CS, Farnie G, Howell SJ, Clarke RB: Breast cancer stem cells and their role in resistance to endocrine therapy. *Horm Cancer* 2: 91-103, 2011
- 20) Kunisue H, Kurebayashi J, Otsuki T, Tang CK, Kurosumi M, Yamamoto S, Tanaka K, Doihara H, Shimizu N, Sonoo H: Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br J Cancer* 82: 46-51, 2000
- 21) Okubo S, Kurebayashi J, Otsuki T, Yamamoto Y, Tanaka K, Sonoo H: Additive antitumour effect of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib (Iressa, ZD1839) and the antioestrogen fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in breast cancer cells. *Br J Cancer* 90: 236-244, 2004
- 22) Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM: Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 63: 8037-8050, 2003
- 23) Kurebayashi J, Kanomata N, Shimo T, Yamashita T, Aogi K, Nishimura R, Shimizu C, Tsuda H, Moriya T, Sonoo H: Marked lymphovascular invasion, progesterone receptor negativity, and high Ki67 labeling index predict poor outcome in breast cancer patients treated with endocrine therapy alone. *Breast Cancer*. 2012 Jun 12. [Epub ahead of print]
- 24) Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM: Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21: 1973-1979, 2003
- 25) Simões BM, Piva M, Iriondo O, Comaills V, López-Ruiz JA, Zabalza I, Mieza JA, Acinas O, Vivanco MD: Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Res Treat* 129: 23-35, 2011
- 26) Ao A, Morrison BJ, Wang H, López JA, Reynolds BA, Lu J: Response of estrogen receptor-positive breast cancer tumorspheres to antiestrogen treatments. *PLoS One* 6: e18810, 2011
- 27) Sanchez CG, Ma CX, Crowder RJ, Guintoli T, Phommaly C, Gao F, Lin L, Ellis MJ: Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* 13: R21, 2011
- 28) Li Y, Lateral J: Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer Res* 72: 576-580, 2012

Effects of antiestrogens and an mTOR inhibitor everolimus on the cell growth and regulation of cancer stem population in estrogen receptor-positive breast cancer cells

Tetsumasa YAMASHITA¹⁾, Junichi KUREBAYASHI¹⁾, Naoki KANOMATA²⁾
Toshiro SHIMO¹⁾, Takuya MORIYA²⁾, Hiroshi SONOO¹⁾

1) Department of Breast and Thyroid Surgery,

2) Department of Pathology 2, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT Recent studies have revealed the existence of cancer stem cells (CSCs) in breast cancer. CSCs may play critical roles in resistance to anticancer agents and radiation, and in the development of metastases. However, the roles of CSCs in estrogen-responsive breast cancer remain to be elucidated. In this study, we investigated the effects of estrogen and antiestrogens (AEs) as well as an inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTOR), everolimus (EVE) on the cell growth and regulation of the CSC population in estrogen-responsive breast cancer cell lines (BCCLs). Two high estrogen-sensitivity (HS) BCCLs, MCF-7 and T-47D, and two low estrogen-sensitivity (LS) BCCLs, KPL-1 and KPL-3C, were used. 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) and a steroidal AE fulvestrant (FUL) and EVE were studied. Expression levels of ER-related proteins, ER- α , progesterone receptor (PgR), GATA3, FOXA1 and XBP1 were immunocytochemically investigated. The effects of the agents on the cell growth, cell cycle progression, apoptosis and regulation of the CSC population, defined as EpCAM-positive, CD44-high, CD24-low or negative cells using flow cytometry or mammosphere assay, were examined.

Experimental results are as follows: (1) The LS BCCLs were negative for PgR but positive for the other ER-related proteins examined. The HS BCCLs were positive for all the ER-related proteins. The LS BCCLs were tumorigenic in female nude mice without estrogen supplementation, but the HS BCCLs were not. (2) The increase in cell growth induced by 17 β -estradiol (E2) was more pronounced in the HS BCCLs. The decrease in cell growth induced by 4-OHT or FUL was more pronounced in the HS BCCLs. The AEs inhibited the G1-S cell cycle progression and induced a slight apoptosis. (3) E2 significantly increased the proportion of CSCs in all the cell lines tested. The increase in the CSC proportion by E2 was more pronounced in the HS BCCLs. The decrease in the CSC proportion by both 4-OHT and FUL was more pronounced in the HS BCCLs. (4) The decrease in the cell growth by EVE was more pronounced in LS BCCLs. Combined treatment of 4-OHT or FUL with EVE showed an additive effect in the LS BCCLs but not in the HS BCCLs. (5) Although EVE alone slightly increased the proportion of CSCs, the combined treatment of 4-OHT or FUL with EVE did not increase it.

In conclusions, the HS BCCLs were more sensitive to estrogen and AEs than the LS BCCLs with regard to the cell growth response and CSC regulation. Thus, the LS BCCLs were more

resistant to AE. It should be noted that EVE was more active in the LS BCCLs. These findings suggest that the combined use of EVE with AEs may be more useful in patients with breast cancer resistant to AEs.

(Accepted on February 12, 2013)

Key words : Breast cancer stem cell, antiestrogen, everolimus

Corresponding author

Tetsumasa Yamashita

Department of Breast and Thyroid Surgery, Kawasaki
Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192,
Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : m99094@med.kawasaki-m.ac.jp