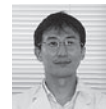


乳癌細胞における adjuvant 治療から stem cell 治療への translational research

白川一男 (右写真)、吉本賢隆、林原紀明、
辻 英一、金内 一、小川利久、上西紀夫、瀬戸泰之
東京大学代謝栄養内分泌外科学講座、公立昭和病院、国際医療福祉大学三田病院乳腺センター



1. はじめに

乳癌における血管内皮細胞 (EC) の存在なく癌細胞に直接取り囲まれた腫瘍内血管・血流を血管擬態 (VM) と称して報告してきた (*Cancer Res.* 61 445-51, *Cancer Res.* 62 560-6, *Cancer Res.* 62 860-6. *Breast Cancer Res.* 5 136-9)。現在は、腫瘍内リンパ管・リンパ流を加えて、lymphovascular mimicry (LVM) と再定義している。今回は、LVM を腫瘍内微小環境として捉え、cancer stem cell (CSC) あるいは、epithelial to mesenchymal transition (EMT) の概念から本形態の解析を試みた。Table 1のごとく、CSC の存在はさまざまな癌種で報告されており、臨床においては癌再発の温床とされる。特に、乳癌における CSC 解析は bench level では相当に進んでおり、分子標的剤など

臨床応用が期待される域に達している。

これまで、LVM 提示乳癌細胞は再発率が高く、予後不良であることを報告し、同細胞内における autocrine VEGF-Flt-1 pathway に注目して、同 signal block による抗腫瘍効果と新規分子標的薬の可能性について報告してきた (*Br J. Cancer.* 87 1454-61. *Int J. Cancer.* 99 821-8. *Int J. Cancer.* 99 344-51)。本形態を EMT の一亜型としてとらえると CSC の側面を解析してきたとも考えられる。同臨床像は CSC に酷似しており CSC Therapy の概念と重なる可能性がある。2009年3月より「進行再発乳癌に対する腫瘍血管新生関連遺伝子 VEGFR1、VEGFR2由来 HLA-A2402または A0201拘束性エピトープペプチドを用いたがんワクチン免疫療法第1・2相臨床試験」を開始した。遊走する活性化 EC・EPC を標的とした抗血管新生脈管新生治療としてのワクチン療法であるが、乳癌の20%程度を占める LVM 症例に対しては乳癌細胞自体を標的とした抗 LVM 治療である。すなわち、同ワクチン療法が CSC Therapy の概念と重なる領域があるとすれば、clinical level では癌細胞根絶を目指した飛躍的進歩となる可能性がある。

Table 1. Concept of Cancer Stem cell and Breast Cancer Stem Cell

Cancer stem cell:

1. Leukemia, myeloma, breast-, colon-, prostate-, and pancreas cancer, brain malignant tumor
2. Self-replication and anaplastic potential
3. $1/5.7 \times 10^4$ of cancer cells
4. EMT (epithelial to mesenchymal transition) ability resistance to apoptosis, promotion of migration activity
5. Difficult to completely eradicate and prevent to be recurrent

Breast cancer stem cell:

1. CD44+CD24 low/-
2. CD133 and/or c-kit, expression, EGFR highly expression
3. Ability of heterogeneous cluster
4. EMT or tumor micro circumstances?
5. Upregulation of TGF-beta

2. 方法

- (1) RT-PCR followed by laser-captured microdissection (LCM) 法による乳癌細胞における CSC 関連分子発現検討

LVM+8症例と LVM-8症例において乳癌細胞を LCM の後、CSC マーカーである *c-kit*、*CD34*、*CD133*、*FGF4*、*HER1*、*HER2*分子を標的として RT-nested PCR を行い、各々正常乳腺細胞との発現比率を検討した。

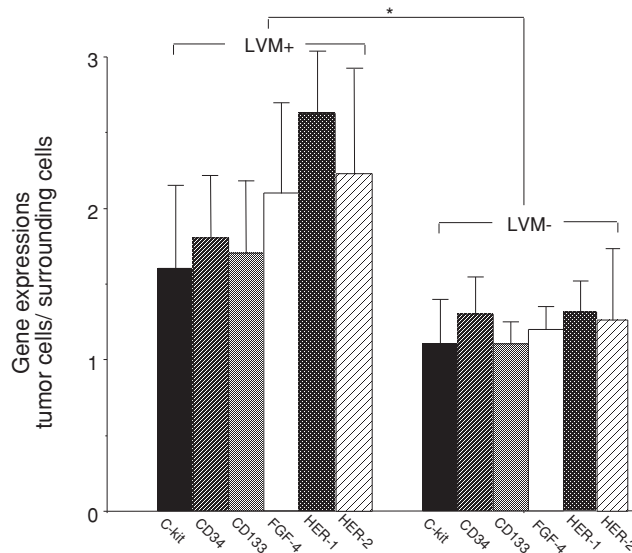


Fig. 1 CSC markers expression ratios in both of LVM positive or negative cases (8 cases in each)

(2) Flow cytometer 法による LVM 移植動物モデルを用いた CSC 関連分子発現検討

LVM 移植動物モデルマウス (WIBC-9) より骨髓細胞 (BM)、末梢血 (PBC)、腫瘍内浸潤単核細胞 (TI) を採取し、CSC マーカーである CD34、Flt-1 と顆粒球、赤血球マーカーである CD45、TER、Mac-1 を標的として細胞群解析を行った。CD34 + Flt-1 共陽性群または、CD34 陽性 + CD45、TER、Mac-1 陰性群を CSC 候補予備群とした。さらに、CSC 候補予備群は EC・EPC を除外するため Di-I 染色を行い非染色性細胞群を CSC 候補群とした。コントロールとして非 LVM 乳癌移植動物モデルマウス (MC-2、MC-5、MC-18)、mock として移植前 BALB/c ノードマウスを使用した。

3. 結果

(1) RT-PCR followed by laser-captured microdissection (LCM) 法による乳癌細胞における CSC 関連分子発現検討

LVM+8 症例と LVM-8 症例において乳癌細胞を LCM の後、CSC マーカーである *c-kit*、*CD34*、*CD133*、*FGF4*、*HER1*、*HER2* 分子を標的として RT-nested PCR を行い、各々正常乳腺細胞との発現比率を検討した。LVM+ 群は LVM- 群と比較して、有意に 6CSC

マーカーの発現比率の上昇を認めた ($P < 0.05$)。上記記載 6CSC マーカーの発現比率はほぼ一定しており、各々 8 症例ではあるが相関性も認められた。LVM 形成能を獲得した同程度に分化を経た CSC をとらえているのかもしれない。乳癌 CSC マーカーとして頻用される CD44、CD24 については発現レベルが一定ではなく、上記記載 6CSC マーカーとの相関性は認められず検定不能であった。CSC マーカーとして HER1、HER2 の発現レベルについては一定の見解は得られていないが、LVM 形成能としてとらえれば高発現していた。ある程度の分化を経た CSC をとらえているのかもしれない (Fig. 1)。

(2) Flow cytometer 法による LVM 移植動物モデルを用いた CSC 関連分子発現検討

LVM 移植動物モデルマウス (WIBC-9) より BM、PBC、TI を採取し、CSC マーカーである CD34、Flt-1 と顆粒球、赤血球マーカーである CD45、TER、Mac-1 について細胞群解析を行った。CD34 + Flt-1 共陽性群または、CD34 陽性かつ CD45・TER・Mac-1 陰性群を CSC 候補予備群とした。さらに、CSC 候補予備群は EC・EPC を除外するため Di-I 染色を行い非染色性細胞群を CSC 候補群とした。コントロールとして

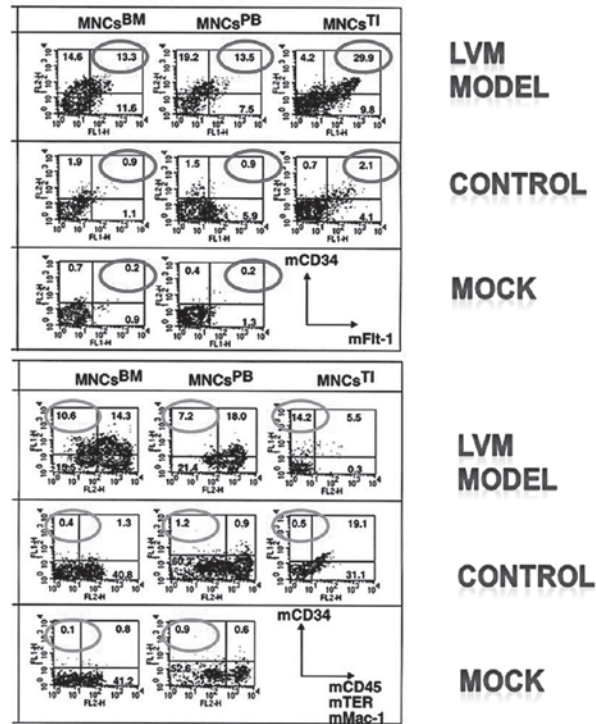


Fig. 2 Putative CSC populations in Breast Cancer Xenografted Mice

非LVM乳癌移植動物モデルマウス（MC-2、MC-5、MC-18）、mockとして移植前BALB/cヌードマウスを使用した。脈管形成と顆粒球・赤芽球分化の2系統の発生からCSCの想定を試みた。LVMモデルにおいては、BM、PBC、TIいずれのレベルにおいてもコントロールと比較して著しいCSC候補群の上昇を認めた。同populationの一部がCSCをとらえていると考えているが、CSCがBM、PBCレベルにおいて発現しているとなればclinical levelでの難治性（根治困難）は容易に想像できる。同populationにおいてCD44+CD24-にゲートをかけて解析を試みたが、subsetとして同定は不可能であった（Fig. 2）。

4. 考察

LVMについての解析結果は、Flt-1、Tie-2、CD34、CD133、HER1、HER2、c-kit分子発現など乳癌CSCの概念と重なる分子が多い。1. 高い遊走・変形能、2. EMT能（外胚葉由来の癌細胞が中胚葉由来のEC様

構造を形成）、3. 乳癌細胞中 5.7×10^4 個に1個程度存在する、4. CSC単独での培養は困難、などCSCの形態を捉えている可能性がある。

临床上、薬物抵抗性で根治困難とされるCSCの一亜型がLVMであったとすれば、同signal blocking（VEGF、angiopoietin）がbench levelでは有効であり、抗血管・脈管形成治療として既存の抗癌剤と併用されることによりCSC治療に繋がるものと信じている。実際には、進行再発乳癌に対するVEGF抗体（AVASTIN）と既存抗癌剤（XERODA）・分子標的薬（HERCEPTIN）との併用療法の高い有効性が報告されている。当院においても、2009年3月より「進行再発乳癌に対する腫瘍血管新生関連遺伝子VEGFR1、VEGFR2由来HLA-A2402またはA0201拘束性エペトープペプチドを用いたがんワクチン免疫療法第1・2相臨床試験」を開始したばかりであるが、今後、CTL誘導率、有効性、有害事象を検討した上でLVMとの関連性について報告したい。