

## 学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 病態生化学研究室  
職・氏名 助教・中辻 匡俊

### 研究テーマ：

癌微小環境下における ER 陽性乳癌細胞の転移機構の解明

### 研究期間：

2024 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日

### 研究担当者：

#### <本学>

研究代表者 中辻 匡俊 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

#### <共同研究機関>

研究分担者 乾 隆 (大阪公立大学 大学院農学研究科・教授)

### 研究目的：

乳癌は、癌細胞におけるエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR) 及び human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) の発現から、ER/PgR 陽性 (luminal)、HER2 陽性及びトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) にサブタイプ分類される。乳癌患者の 7 割以上は ER 陽性乳癌であり、タモキシフェン (TAM) 等を用いた内分泌療法が実施されるが、約 3 割の患者が TAM 耐性となり、癌の転移や再発が生じることが問題となっている。また、癌組織には、癌細胞に加えて線維芽細胞や脂肪細胞等の非癌細胞が共存し、局所に低酸素や低栄養等の微小環境が形成される。これらが、癌細胞の薬剤耐性や転移能の獲得に寄与するとされるが、その詳細は不明である。本研究では、癌微小環境の特徴の 1 つである低栄養環境に着目し、血清及びグルコースが ER 陽性乳癌細胞の遊走に与える影響を調べ、転移能の獲得機構を明らかにすることを目的とした。

### 研究内容および研究成果：

ヒト ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 を 10% fetal calf serum (FCS) 含有培地 (DMEM)、FCS 不含培地 (DMEM-FCS)、またはグルコース不含培地 (DMEM-Glc) で 24 時間培養後、トランスウェルを用いて細胞遊走を評価した。その結果、DMEM と比較して、DMEM-Glc では MCF-7 細胞の遊走に変化はなかったが、DMEM-FCS で培養することにより、細胞遊走が促進されることがわかった。また、ER 陰性の TNBC 細胞株 MDA-MB-231 を DMEM-FCS により培養し、細胞遊走を評価したところ、同様に遊走が促進された。次に、上皮細胞が細胞間接着を失い、運動性の高い間葉系細胞の性質を獲得するプロセスであり、癌の転移過程で重要な役割を果たす上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) マーカーの発現を調べた。DMEM-FCS で培養することにより、MCF-7 細胞及び MDA-MB-231 細胞における上皮細胞マーカーである E-cadherin の遺伝子発現レベルに変化はなかったが、間葉系細胞マーカーである N-cadherin や vimentin、Twist の遺

伝子発現レベルは上昇した。また、MCF-7 細胞におけるタンパク質発現を解析した結果、同様に E-cadherin の発現量は変化しなかったが、N-cadherin の発現量が増加し、EMT が誘導されていることがわかった。また、癌細胞の転移能の獲得に関与するとされ、EMT 誘導によって促進されることが知られている癌幹細胞 (cancer stem cell, CSC) 様形質について調べた。その結果、CSC マーカーである SOX2 及び OCT4 の遺伝子発現レベルは、DMEM-FCS により上昇していた。さらに、CSC の特徴の 1 つである低増殖能について評価するために、フローサイトメーターを用いて MCF-7 細胞の細胞周期を解析したところ、DMEM と比較して、DMEM-FCS により G2/M 期の細胞の割合が減少していた。これらの結果から、血清枯渇により、ER 陽性乳癌細胞は EMT 誘導及び CSC 様形質を獲得し、細胞遊走が促進されることが示唆された。また、TNBC 細胞も同様に細胞遊走が促進されることがわかった。

次に、血清枯渇による ER 陽性乳癌細胞の遊走促進機構を調べるために、癌細胞の EMT 誘導や CSC の維持に関わる解糖系に着目し、解糖系関連分子の遺伝子発現レベルを解析した。DMEM-FCS で培養するにより、MCF-7 細胞において律速酵素であるヘキソキナーゼやホスホフルクトキナーゼ等の遺伝子発現レベルが上昇しており、解糖系が亢進されていることが示唆された。解糖系関連分子の中でも、DMEM-FCS により MDA-MB-231 細胞において、発現が上昇しなかった 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) に着目した。PFKFB4 は、解糖系とペントースリン酸経路のバランスを調節して CSC の生存に関与するとともに、転写共役因子と相互作用することで乳癌細胞の遊走を促進させることが知られている。PFKFB4 に対する阻害剤 (5MPN) を用いて MCF-7 細胞の遊走を評価した結果、血清枯渇による細胞遊走の促進は、5MPN により抑制されることがわかった。さらに、5MPN により N-cadherin 及び SOX2 の遺伝子発現レベルの上昇も抑制された。

以上より、血清枯渇により、EMT 誘導及び CSC 様形質の獲得を伴って ER 陽性乳癌細胞の遊走が促進されることが明らかとなり、その獲得機構に解糖系とペントースリン酸経路の調節に関わる PFKFB4 が関与する可能性が示唆された。

#### 成果発表：

##### <原著論文>

- ・投稿準備中

##### <学会発表>

- ・中辻 匡俊、癌微小環境に着目した乳癌の悪性化機構の解析、関西大学・大阪医科薬科大学 医工薬連環科学教育研究機構 研究発表会、2025 年 1 月
- ・中辻 匡俊、藤森 功、タモキシフェンによるトリプルネガティブ型乳癌細胞の癌幹細胞様細胞形質の獲得、第 97 回日本生化学会大会、2024 年 11 月