

原 著

ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 の CD44 陽性細胞において microRNA-17, microRNA-93 は p21 発現を抑制する

昭和大学医学部薬理学講座 (医科薬理学部門)

飯島堅太郎* 佐々木晶子 古屋 貫治
小山田英人 土屋 洋道 難波 北人
牛腸 俊彦 木内 祐二

亀田総合病院乳腺科

角田ゆう子

抄録：ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を，チューブリン阻害剤である paclitaxel, eribulin, および白金製剤 cisplatin に曝露し，サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質である p21 の発現抑制における microRNA (miR) の役割を検討した。MDA-MB-231 細胞を，cancer stem-like cell (CSC) のマーカーである CD44 の発現の有無によって CD44 発現細胞 (CD44⁺) と非発現細胞 (CD44⁻) に分離した。MDA-MB-231 細胞を cisplatin に曝露した後分離した CD44⁺ における p21 発現は，CD44⁻ よりも有意に低下しており，CD44⁺ では CD44⁻ よりも細胞周期が進行していることが示唆された。MDA-MB-231 細胞を cisplatin に曝露した後分離した CD44⁺ におけるグルタチオン酸化率は CD44⁻ より有意に低下しており，cisplatin の CD44⁺ に対する細胞障害性は低下していることが示唆された。さらに MDA-MB-231 細胞を cisplatin に曝露した後分離した CD44⁺ における caspase-3 の活性は CD44⁻ よりも有意に低下しており，CD44⁺ では cisplatin によって誘導されるアポトーシスが抑制されていることが示唆された。MDA-MB-231 細胞を miR-17 ならびに miR-93 に対する阻害剤で処理した後，分離した CD44⁺ における p21 を測定すると，上記2つの microRNA 阻害剤で p21 の発現が有意に増加したことから，miR-17 ならびに miR-93 は p21 発現を抑制していることが示唆された。以上より，cisplatin に対する MDA-MB-231 細胞の抗がん剤抵抗性に CD44 が関与すること，また miR-17 ならびに miR-93 は薬剤抵抗性の要因となっている p21 発現を抑制していることが示唆された。

キーワード：トリプルネガティブ乳がん，マイクロ RNA，CD44 陽性細胞，p21

緒 言

乳がんは，女性で最も罹患率が高いがんである。Triple-negative breast cancer (TNBC) は，エストロゲン受容体 (ER)，プロゲステロン受容体 (PgR) と上皮成長因子受容体 (HER2) のホルモン受容体がない。TNBC は乳がん全体の症例の 10～15% を占めるサブタイプで，TNBC の 30% が再発や遠隔転移を伴う予後不良な症例である。再発や遠隔転移の要因の一つが cancer stem-like cell (CSC) であ

る¹⁾。Cancer stem cell と cancer stem-like cell は明確に区別して使用されていないのが現状であるが，本稿ではがん幹細胞の特性は単独ではないという視点から後者を使用する。

CSC は自己複製能と多分化能を有するがんの源となる細胞で，がん微小環境 (ニッチ) によって動態が制御されている。ニッチはサイトカインやカルシウムイオンそして酸素分子を介して CSC を静止期に維持させるため，CSC は細胞周期の進行を標的とする化学療法や放射線治療に対して抵抗性を有す

*責任著者

る^{2,3)}。TNBC 組織の中に散在する CSC は、細胞表面の CD44 抗原や薬剤排出活性の高い細胞集団 side population (SP 細胞) で認識され、腫瘍再発の原因になることが報告されている⁴⁾。CSC を標的細胞とした治療の試みは多く報告されているが、いまだ研究段階で臨床応用には至っておらず、TNBC の CSC に対する治療方法の確立が急務とされている。

2015 年、CSC 薬剤抵抗性の要因として p21 遺伝子発現の上昇が報告された⁵⁾。CSC はニッチに制御されながら MAPK シグナルの JNK や p38 を介して p21 発現調節を行う⁶⁻⁸⁾。CSC を調節するニッチは MAPK のシグナル伝達を阻止するために p21 発現は恒常的に高くなり細胞が休止期に入るため増殖期にある細胞をターゲットとした化学療法に抵抗性を示すようになる。一方 microRNA (miR) は、標的 mRNA の seed 配列と呼ばれる 5' 末端の 7~8 塩基と 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) の相補的塩基配列の間での塩基対形成によってヌクレオチド補完的に組み合わさり、タンパク発現を抑制する働きを持つ。microRNA による mRNA からタンパク質への翻訳抑制は、新しい治療方法として臨床応用への可能性を含んでいることが報告されている⁹⁻¹³⁾。さらに、microRNA は抗体医薬や低分子化合物が到達し得ない細胞核内にも届くドラッグデリバリーシステムを有するため、あらたな創薬ターゲットとして注目されている¹⁴⁻¹⁷⁾。

本研究ではわれわれは薬剤抵抗性を持つ CSC を細胞死に導くために p21 に着目し、TNBC の non-basal like type である MDA-MB-231 細胞を用いて、抗がん剤である eribulin, cisplatin, paclitaxel 曝露後の CD44 陽性細胞 (CD44⁺) におけるグルタチオン代謝と、CD44⁺ において治療抵抗性の要因である p21 発現を調節する microRNA を明らかとすることを目的とした。

研究方法

1. 使用細胞と培養条件

TNBC の non-basal like type である MDA-MB-231 (MSL, non-basal like type) ヒト乳がん細胞株 (Japanese Cancer Resources Bank, Osaka, Japan) を使用した。CD44⁺ と CD44⁻ が共存する生理的ながん微小環境を細胞培養上で再現するため、予め分離した CD44⁺ と CD44⁻ ではなく、MDA-MB-231 細胞に各

種抗がん剤および microRNA 阻害剤を曝露した後に CD44⁺ と CD44⁻ 分離した細胞を用いた。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Oberhaching, Germany) に 10% 非動化ウシ胎児血清 (Gibco Life Technologies, CA, USA) と 100 mg/ml streptomycin を添加して培養液として用い、37°C に設定した 5%CO₂ インキュベーターにて細胞培養を行った。予備実験では、10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10⁶) を 10 cm dish に播種し 24 時間培養すると細胞数は 4×10⁶ に増加した。

2. CD44⁺/CD44⁻細胞分離

CD44⁺ と CD44⁻ を分離するために、磁気細胞分離 (MACS[®]; Miltenyi Biotec K.K. Westfalen, Germany) を使用した。MDA-MB-231 細胞 (2×10⁷) を PBS(-) でピペティングし浮遊させた後、CD44 MicroBeads で磁気による Biotin 標識を行った。磁気細胞分離装置に LS カラムを装着して標識ラベルのない細胞 CD44⁻ と Biotin 標識ラベルが付いた細胞 CD44⁺ を分離した。抗がん剤を曝露していない MDA-MB-231 細胞で CD44⁺ が含まれる割合は 14% で、CD44⁻ は 86% であった。

3. 免疫蛍光染色

CD44⁺ と CD44⁻ を分離後、非特異反応ブロッキング試薬 (Code No.X0909) で 5 分間反応させた後、1 次抗体 Monoclonal Mouse Anti-Human CD44, Phagocytic Glycoprotein-1 (M7082) (DAKO, CA, USA) で 1 時間反応させた。2 次抗体は AlexaFluor 555 goat anti-mouse IgG (A21422) (Molecular Probes, MA, USA)、核染色は Bisbenzimidazole H33342 (DOJINDO, Tokyo, Japan) を用いて 30 分間反応させた後、倒立顕微鏡 (ECLIPSE, Ti-U) (Nikon, Tokyo, Japan) で観察した。

4. 細胞周期の解析

10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10⁶) を 10 cm dish, 10 枚に播種して 24 時間培養し、10 枚の dish を合体し、2×10⁷ の細胞をカラムにかけて CD44⁺ と CD44⁻ に分離した。分離した CD44⁺ 5 ml, CD44⁻ 0.5 ml を 300×g で 5 分間遠心した。細胞ペレットは PBS(-) で洗浄後、70% のエタノールで固定した。Muse cell cycle reagent を 200 μl ずつ入れて 30 分間インキュベート後、Muse Cell Analyzer を用いて分析を行った (MERCK, Tokyo, Japan)。

5. 抗がん剤への曝露

MDA-MB-231 細胞 (1×10^5 /ml) を, 96-well plate に 0.1 ml または 10 cm dish に 10 ml 播種して 24 時間培養後, さらに 1 nM の paclitaxel (Paclitaxel[®], Nihon-Kayaku Co.,Ltd. Chiyoda-ku, Tokyo, Japan), eribulin mesylate (Halaven[®], Eisai Co.,Ltd. Tokyo, Japan) または cisplatin (Cisplatin[®], Yakult Co.,Ltd. Chuo-ku, Tokyo, Japan) に 24 時間曝露した. eribulin mesylate は Eisai Co.,Ltd から提供された. 予備実験では, 24 時間, cisplatin, paclitaxel, または eribulin に曝露すると, 培養液 10 ml (10 cm dish) 中に含まれる細胞数は, それぞれ, 0.98×10^5 , 1.74×10^5 , 4.8×10^5 であったので, アッセイに必要な細胞数を確保するために, 同じ条件で 10 cm dish を 10 枚作成し, 合体して実験に供した.

6. 増殖抑制試験

96-well plate に対数増殖期の MDA-MB-231 細胞 100 μ l (1×10^4) を播種し培養した. 24 時間培養した後 1 nM の eribulin, cisplatin, paclitaxel を 24 時間曝露させ, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) アッセイにて生存率を評価した. MTT アッセイには MTT assay kit (CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (G4100), Promega, Madison, USA) を使用して, 各種抗がん剤を曝露させた細胞に 15 μ l の Dye Solution (5 mg/ml MTT 含有) を加え, 4 時間インキュベートした. その後可溶化溶液である Solubilization/Stop Solution (0.04 N HCl) を 100 μ l 添加し, 570 nm における吸光度を測定した. 結果は抗がん剤無添加のコントロールを 100% とした生存率 (%) で算出した.

7. p21 測定

10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10^6) を 10 cm dish, 10 枚に播種して 24 時間培養し, さらに, 1 nM の eribulin, cisplatin または paclitaxel に 24 時間曝露後, 10 枚の dish を合体して CD44⁺ と CD44⁻ に分離した. 分離した CD44⁺ または CD44⁻ (1×10^6) を 1.5 ml エッペンチューブに集め, 遠心後 PBS(-) にて洗浄した. 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) と Protease inhibitor cocktail (Sigma P8340, 0.5 μ l/ml) に Cell Extraction Buffer (FNN0011; Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) を加えて氷上で 15 分間インキュベートを行い遠心分離後, 上澄サンプルを採取した. p21 は, p21

enzyme-linked immunosorbent assay kit (ADI-900-161) (Enzo Life Sciences, NY, USA) を使用して蛍光分光光度計プレートリーダーで測定した ($\lambda = 450$ nm) ($n = 4$).

8. グルタチオン酸化率の測定

10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10^6) を 10 cm dish, 10 枚に播種して 24 時間培養し, さらに, 1 nM の eribulin, cisplatin または paclitaxel に 24 時間曝露後, 10 枚の dish を合体して CD44⁺ と CD44⁻ に分離した. 分離した CD44⁺ または CD44⁻ (1×10^6) に 10 mmol/l の HCl を 80 μ l 加え, 凍結と溶解を 2 回繰り返して細胞膜を破壊し, 除タンパク質および還元型グルタチオンの安定化のために 5% SSA (5-スルホサリチル酸) 20 μ l を加えて測定試料とした. 酸化型グルタチオン (GSSG) と還元型グルタチオン (GSH) を使用して (GSSG/GSH Quantification Kit, DOJINDO, Tokyo, Japan), 蛍光分光光度計プレートリーダーの 405 nm のフィルターで測定した (SoftMax[®] Pro, Molecular Devices Corporation, California, USA) ($n = 4$).

9. Caspase-3 活性の測定

Caspase 活性測定のための人工基質として, Ac-DEVD-AFC (Ac(N-acetylene)-DEVD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC), Kamiya Biomedical, USA) を用いた. 10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10^6) を 10 cm dish, 10 枚に播種して 24 時間培養し, さらに, 1 nM の eribulin, cisplatin または paclitaxel に 24 時間曝露後, 10 枚の dish を合体して CD44⁺ と CD44⁻ に分離した. 分離した CD44⁺ または CD44⁻ (1×10^6) を遠心後, 冷温 PBS(-) にて洗浄した. Cell Lysis Buffer4 (80-1339) (Enzo Life Sciences, NY, USA) を加えて氷上で 10 分間反応した後の細胞抽出液をサンプルとした. サンプルに Reaction buffer (0.1 M HEPES buffer, PH7.5 with 20% glycerol, 0.5 mM EDTA, 10 mM DTT 含有) を加え蛍光分光光度計プレートリーダーで測定した (λ excitation = 400 nm/ λ emission = 505 nm) ($n = 4$).

10. microRNA 測定方法

10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10^6) を 10 cm dish, 10 枚に播種して 24 時間培養し, さらに, 1 nM の eribulin, cisplatin または paclitaxel に 24 時間曝露後, 10 枚の dish を合体して CD44⁺ と CD44⁻ に分離し, CD44⁺ (1×10^6) に含まれる microRNA を測

定した。microRNA は miRNeasy Mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) にて抽出した。microRNA 500 ng から miScript II RT kit を使用して cDNA を合成した後、PCR Array を用いて 86 種類の microRNA を測定した (miScript miRNA PCR Array human breast cancer, MIHS-109ZA) (Qiagen, Tokyo, Japan)。PCR 初期活性化ステップ 95°C, 10 分 (1 サイクル), PCR 変性は 95°C 15 秒, アニーリング 60°C 30 秒, エクステンション 72°C 30 秒 (40 サイクル) で PCR を行った (ABI PRISM 7000 Sequence System) (Applied Biosystems Inc, CA, USA)。データ解析は $\Delta\Delta Ct$ 法で行い (Original expression Level = $2^{-\Delta\Delta Ct}$)、抗がん剤を曝露した CD44⁺ 細胞 Ct 値 / 抗がん剤無添加の MDA-MB-231 細胞 Ct 値の比で換算した。

11. microRNA 阻害剤

p21-5' 非翻訳領域 (p21-5'-UTR) の相補的ターゲットである miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93 の microRNA 配列は EXIQON の miRCURY LNA™ microRNA Inhibitors (EXIQON Inc, Vedbaek, Denmark) で作成した (<http://www.exiqon.com/mirna-inhibitors>)。各阻害剤を 100 pmol 添加した。核酸の配列は以下に示す。

Has-miR-17-5p: 5'-CTACCTGCACTGTAAGCAC-3';

Has-miR-20a-5p: 5'-CTACCTGCACTAAGCAC-3';

Has-miR-20b-3p: 5'-TGGAAGTGCCATACTACAG-3';

Has-miR-93-5p: 5'-CAAAGTGCTGTTCGTGCAGGTAG-3'.

12. microRNA 阻害剤の細胞内導入

リポフェクション法で各 microRNA 阻害剤を MDA-MB-231 細胞へ導入した。10 ml の MDA-MB-231 細胞 (1×10^6) を 10 cm dish, 10 枚に播種して 24 時間培養し、Lipofectamine® 2000 を用いて 100 pmol の microRNA 阻害剤を細胞内へ導入した (Thermo Fisher Scientific K.K., Massachusetts, USA)。阻害剤を 4 時間曝露した後、細胞を洗浄し 48 時間培養した。培養後の MDA-MB-231 細胞を 10 dish 合体して CD44⁺ と CD44⁻ に分離後、p21 発現を検討した。

13. 有意差検定

microRNA は、miScript miRNA PCR Array Data Analysis software (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて解析と検定を行った。有意差検定は Bonferroni's method による two-way analysis of variance

(ANOVA) を用いて $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

結 果

1. CD44⁻ と CD44⁺ 細胞の確認

磁気ビーズを用いて分離した細胞の免疫蛍光染色を行い、CD44⁻ と CD44⁺ を確認した。CD44 標識ビーズによって分離した細胞は CD44 強陽性を示し、CD44 で標識されなかった細胞は CD44 陰性を示した (Fig. 1A)。CD44⁻ と CD44⁺ の細胞周期を解析したところ、CD44⁻ では G2/M 期に、CD44⁺ では G0/G1 期に多く存在した (Fig. 1B)。

2. 抗がん剤による増殖抑制試験

MDA-MB-231 細胞 (1×10^4 /ml) を、96-well plate に 0.1 ml 播種して 24 時間培養後、さらに、1 nM の eribulin, cisplatin または paclitaxel を 24 時間曝露させて生存率を測定した。薬剤を添加しない 24 時間培養後の MDA-MB-231 細胞をコントロール (100%) として生存率を換算した。eribulin 曝露後では $53.5 \pm 2.5\%$ で、cisplatin 曝露後では $67.9 \pm 1.4\%$ 、paclitaxel 曝露後では $43.9 \pm 1.0\%$ ($n=4$) であった。eribulin, cisplatin, paclitaxel 曝露後、コントロールと比較して生存率は有意に低下した ($p < 0.05$) (Fig. 2)。

3. 抗がん剤曝露後の p21 発現

抗がん剤に曝露しなかったコントロール CD44⁺ における p21 発現量は 0.048 ± 0.013 pg/ μ g cell protein で、CD44⁻ (0.020 ± 0.000 pg/ μ g cell protein) より有意に高い値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 3)。eribulin, cisplatin, paclitaxel 曝露後の CD44⁻ における p21 発現量は、それぞれ 0.36 ± 0.01 , 0.41 ± 0.03 , 0.36 ± 0.01 (pg/ μ g cell protein) で、いずれもコントロール CD44⁻ より高値であった ($p < 0.05$)。eribulin, cisplatin, paclitaxel 曝露後の CD44⁺ における p21 発現量は、それぞれ 0.30 ± 0.06 , 0.31 ± 0.01 , 0.34 ± 0.05 (pg/ μ g cell protein) で、いずれもコントロール CD44⁺ より高値であった ($p < 0.05$)。

4. グルタチオン酸化率

GSH と GSSG を測定して以下の公式によって酸化率を算出した (Fig. 4) (グルタチオン酸化率 = $GSSG / (GSH + GSSG)$)。抗がん剤を曝露しなかったコントロールのグルタチオン酸化率は、CD44⁻ で $58.0 \pm 0.9\%$ 、CD44⁺ では $59.0 \pm 0.2\%$ を示した ($n=4$)。eribulin と cisplatin 曝露後の CD44⁺ においてグル

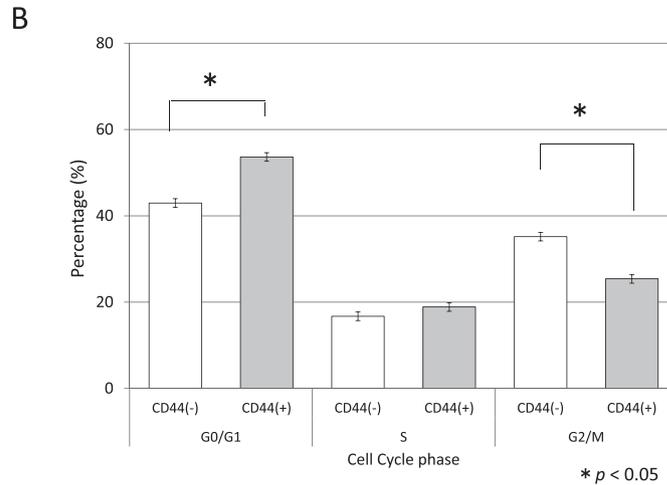
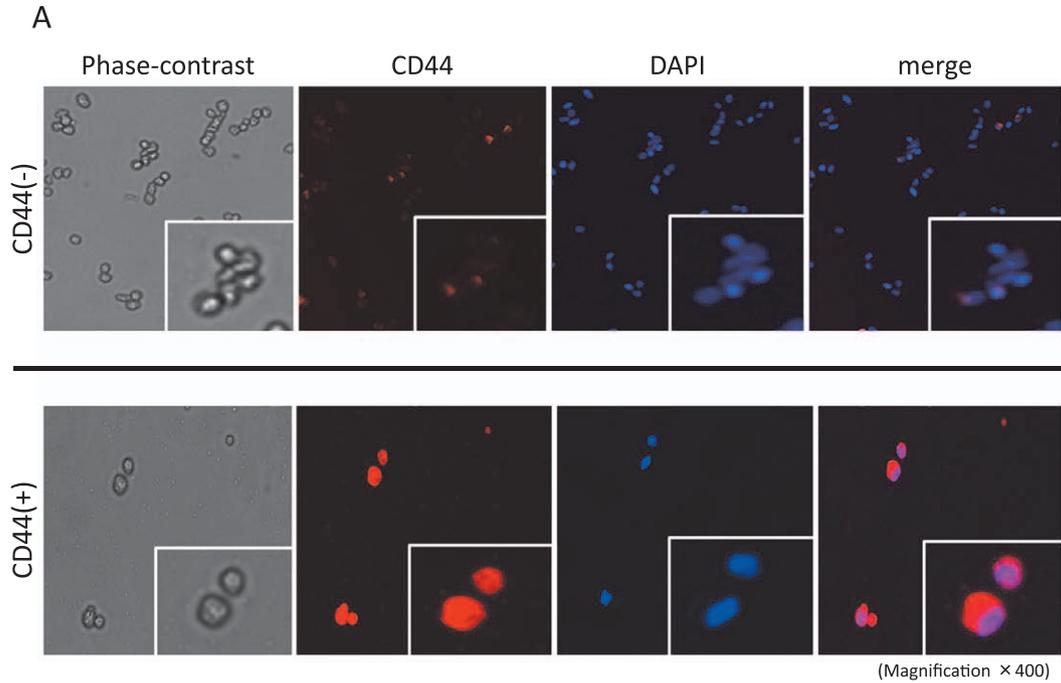


Fig. 1

- (A) Expression of CD44 in CD44⁺ isolated from MDA-MB-231 cells
 (B) Cell cycle analysis of CD44⁺ and CD44⁻ isolated from MDA-MB-231 cells. Data are shown as means ± SD (n=4) from 4 assays of the same sample.

タチオン酸化率は control CD44⁺に比し有意に減少した ($p < 0.05$).

5. Caspase-3 活性の測定

MDA-MB-231 細胞に eribulin, cisplatin または paclitaxel を 24 時間曝露後分離した CD44⁻ と CD44⁺ の caspase-3 活性を Fig. 5 に示す. コントロールの caspase-3 活性は CD44⁻ と CD44⁺ の間では差が認められなかった. eribulin 曝露後の CD44⁺ の caspase-3

活性はコントロールと比べて有意に増加し (145%), cisplatin 曝露後では有意に減少した (89.1%) ($p < 0.05$). cisplatin 曝露後の CD44⁻ と CD44⁺ の caspase-3 活性を比較すると, CD44⁺ は CD44⁻ に比べて 72% に低下した ($p < 0.05$).

6. microRNA 発現解析

MDA-MB-231 細胞に eribulin, cisplatin または paclitaxel を曝露後分離した CD44⁺ に含まれる micro-

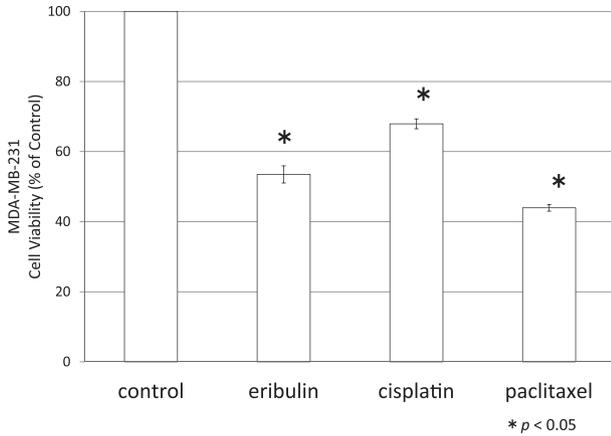


Fig. 2 Viability of MDA-MB-231 cells after exposure to anticancer drugs. Data are shown as means \pm SD (n=4). *p < 0.05 compared with control.

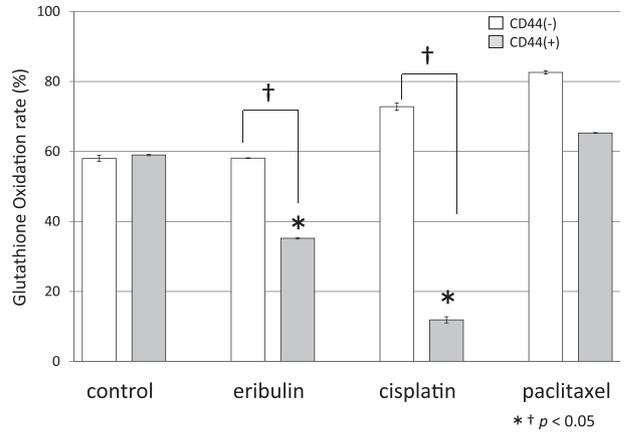


Fig. 4 Glutathione oxidation rates in CD44⁺ and CD44⁻ isolated from MDA-MB-231 cells after exposure to eribulin, cisplatin or paclitaxel. Glutathione oxidation rates (GSSG/GSSG + GSH) after exposure to anticancer drugs for 24 hours are shown and compared with untreated controls. Data are shown as means \pm SD (n=4) from 4 assays of the same sample. *p < 0.05 compared with control CD44⁺, [†]p < 0.05 compared with CD44⁻.

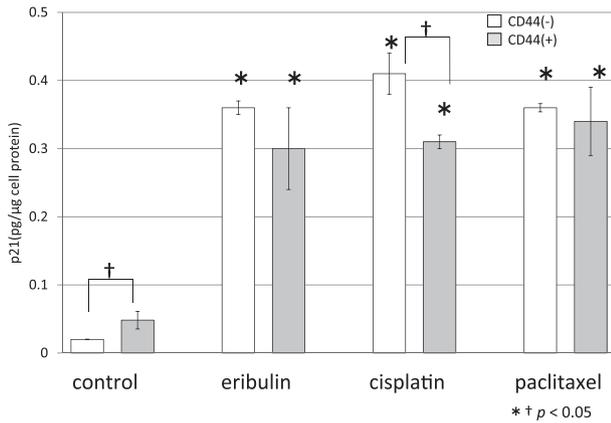


Fig. 3 The p21 expression levels in CD44⁺ and CD44⁻ isolated from MDA-MB-231 cells after exposure to eribulin, cisplatin or paclitaxel. p21 concentrations after exposure to anticancer drugs for 24 hours are shown and compared with untreated controls. Data are shown as means \pm SD (n=4) from 4 assays of the same sample. *p < 0.05 compared with control CD44⁻, [†]p < 0.05 compared with control CD44⁺, *p < 0.05 compared with CD44⁻.

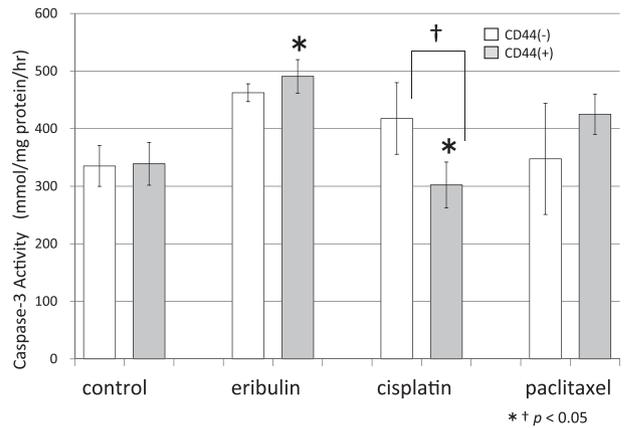


Fig. 5 Caspase-3 activity in CD44⁺ and CD44⁻ isolated from MDA-MB-231 cells after exposure to eribulin, cisplatin or paclitaxel. Caspase-3 activity after exposure to anticancer drugs for 24 hours are shown and compared with untreated controls. Data are shown as means \pm SD (n=4) from 4 assays of the same sample. *p < 0.05 compared with control CD44⁺, [†]p < 0.05 compared with CD44⁻.

RNAのうち、p21発現に関与しているmicroRNA(miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93およびmiR-182)の発現解析を行った(Fig. 6)。CD44⁺のmicroRNA発現は抗がん剤無添加のコントロールと比較した、eribulin曝露によってCD44⁺のmiR-17とmiR-20bの $\Delta\Delta$ CT値は、それぞれ1.6と4.66に増加した。対照的にmiR-20a, miR-93とmiR-182の $\Delta\Delta$ CT値はそれぞ

れ-2.62, -2.83, -8.94と発現は減少した。cisplatin曝露後のmiR-17とmiR-93の $\Delta\Delta$ CT値は、5.19と2.31であった。対照的にmiR-20a, miR-20bとmiR-

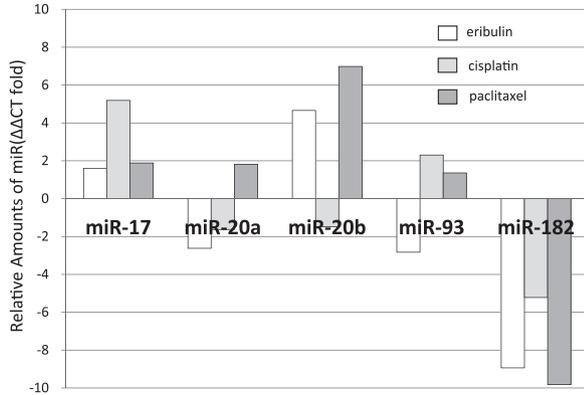


Fig. 6 Changes in microRNA expression in CD44⁺ isolated from MDA-MB-231 cells after exposure to eribulin, cisplatin or paclitaxel. ΔΔCT values for miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93 and miR-182 after exposure to anticancer drugs for 24 hours are shown.

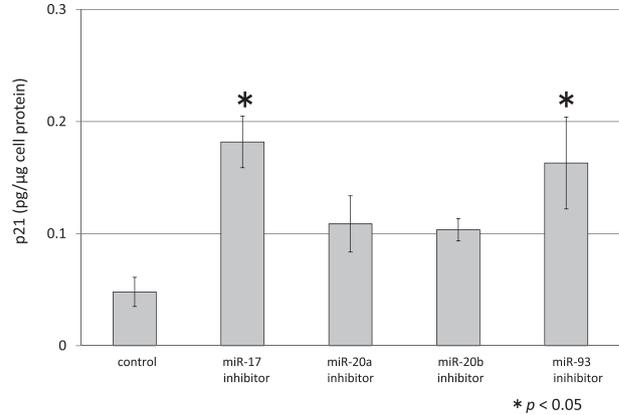


Fig. 7 The levels of p21 expression in CD44⁺ isolated from MDA-MB-231 cells after exposure to each inhibitor for miR-17, miR-20a, miR-20b, or miR-93. Data are shown as means ± SD (n=4) from 4 assays of the same sample. *p < 0.05 compared with control.

182 の ΔΔCT 値は、それぞれ -1.63, -1.48 および -5.22 と減少した. paclitaxel 曝露後の miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93 の ΔΔCT 値は、1.88, 1.82, 6.98 と 1.36 であった. miR-182 の ΔΔCT 値は、-9.82 と減少を示した.

7. microRNA 阻害剤細胞内導入後の p21 発現

抗がん剤に曝露していない MDA-MB-231 細胞に microRNA 阻害剤を導入し、CD44⁺ と CD44⁻ に分離した. microRNA 阻害剤を導入しないコントロール CD44⁺ の p21 発現レベルは 0.04 pg/μg cell protein であった. miR-17, miR-93 阻害剤を導入すると CD44⁺ の p21 発現量はそれぞれ、0.18, 0.16 (pg/μg cell protein) に増加した (p < 0.05). 一方、miR-20a, miR-20b 阻害剤では CD44⁺ の p21 発現量に有意な変化を生じなかった (Fig. 7).

考 察

CSC は治療抵抗性の因子で他のサブタイプより TNBC 組織の中に多く存在することが明らかとなっている¹⁷⁾. CSC は自己複製能と多分化能を有するがんの源となる細胞で、細胞周期の静止期を維持し化学療法や放射線抵抗性を有するため有効な治療法がない^{18,19)}. 薬剤抵抗性の要因であるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害タンパク質 p21 は転写因子 Nrf2 と結合することで Nrf2 を活性化する. その下流にある還元型グルタチオンの合成が促進するこ

とによって、抗がん剤の細胞毒性の原因である活性酸素に対する除去能が増加するとともに、グルタチオン抱合反応の促進による抗がん剤の排出機能が増加する. その結果 CSC を化学療法抵抗性にする²⁰⁾. また p21 はさまざまなストレス、飢餓、老化などで正常な細胞が分裂する際に不都合な状況に陥ると合成されて細胞周期の進行を G1, S, G2/M 期で停止させ、細胞増殖を抑制することが知られている⁵⁻⁷⁾. がん抑制因子の p53 下流シグナルが不活性化状態にあることが、がん細胞を無限に増殖させる要因の一つとなっており、TNBC も p53 に変異を持つものが多いが p21 変異を伴うがん細胞の報告はされていない^{21,22)}. CSC において p21 発現を調節する新しい機能分子である microRNA の同定は、治療抵抗性を得た CSC を細胞死に導き TNBC の CSC 治療へのアプローチになる可能性がある. 本研究では TNBC non-basal like type である MDA-MB-231 細胞を用いて eribulin, cisplatin, paclitaxel の曝露後に治療抵抗性を得る CD44⁺ におけるグルタチオン代謝の働きを明らかにするとともに、CD44⁺ において治療抵抗性の要因である p21 発現を調節する microRNA の同定を行った.

本研究で CD44⁻ と CD44⁺ の免疫蛍光染色と細胞周期の解析を行ったところ、CD44 陽性を示す細胞は細胞周期の G0/G1 期に多く存在し細胞周期が停止していることが明らかとなった (Fig. 1A, B).

このことから CD44 陽性細胞は細胞周期の進行が停止した状態で静止期に多く存在する CSC の性質を持っていることが確認された。次に、抗がん剤の有効性を調べるために TNBC 治療で標準的に用いられる薬剤の eribulin, cisplatin, paclitaxel を 24 時間曝露したあとの生存率を測定した。その結果、すべての抗がん剤曝露後で生存率が有意に減少したことから eribulin, cisplatin, paclitaxel において、がん細胞生存抑制効果が明らかとなった (Fig. 2)。抗がん剤無添加であるコントロールの p21 発現レベルは、CD44⁻に比べて CD44⁺のほうが有意に高かった (Fig. 3)。p21 は CDK を阻害して細胞周期が進行するのを阻害するタンパク質である。増殖力を維持しながら休止期である G0 期に存在する CD44⁺は、p21 発現が高くなり、細胞周期の進行が抑制されていることが考えられた。さらに、eribulin, cisplatin, paclitaxel を曝露した後の CD44⁻, CD44⁺における p21 発現を検討すると、抗がん剤無添加のコントロールに比べて各種抗がん剤を曝露したすべての細胞で有意に高く発現が観察された。一方、CD44⁻と CD44⁺の p21 発現を、それぞれの抗がん剤ごとに検討してみると、eribulin と paclitaxel 曝露後で有意差は認められなかったが cisplatin 曝露後は CD44⁻よりも CD44⁺で有意に低く発現が観察された。eribulin は非タキサン系微小管ダイナミクス阻害剤の抗がん剤で、微小管の短縮 (脱重合) には影響を与えず伸長 (重合) だけを阻害する重合阻害薬で、チューブリン単量体を微小管形成に関与しない凝集体に変化させる作用を有する^{23,24)}。paclitaxel は、微小管蛋白重合を促進し脱重合を阻害することで細胞周期 M 期の有糸分裂期に作用して抗腫瘍効果をもたらすことが知られている^{25,26)}。eribulin と paclitaxel は細胞周期の M 期で働き、チューブリンの重合阻害や脱重合によって細胞をアポトーシスに導く。CD44⁺は細胞周期を進行しながら M 期で抗がん剤を取込むことで p21 を活性化して細胞周期を停止させる。その結果、がん細胞はアポトーシスに導かれる。細胞周期が G0 期に存在する CD44⁺は、CD44⁻よりも進行速度は遅いが細胞周期は動くことが報告されている²⁷⁾。そのため CD44⁺は活発に細胞周期が進行し p21 を活性化している CD44⁻よりも発現量は低いが、抗がん剤無添加のコントロールよりも p21 発現は活性化されることが考えられた。

cisplatin は、がん細胞の核にある DNA のプリン塩基 (アデニン, グアニン) と共有結合することで腫瘍細胞の 90% 以上が DNA のプリン塩基に架橋を形成する DNA adduct となり、DNA に損傷を与えて細胞死を引き起こすことが知られている²⁸⁾。cisplatin 曝露後に p21 発現が CD44⁻よりも CD44⁺で有意に低発現した理由として、CD44⁻よりも細胞周期の進行が遅い CD44⁺は cisplatin の DNA 合成阻害による働きで細胞が損傷を受けにくいいため細胞周期を停止させる p21 発現が低いことが考えられた。

eribulin, cisplatin, paclitaxel 曝露後の細胞の生存率は抗がん剤無添加のコントロールと比べて有意に低下する。これは、抗がん剤が活性酸素を産生して細胞毒性を起こすシステムを用いて、がん細胞を細胞死に導いている。本研究は抗がん剤が持つグルタチオン代謝に対する効果に着目し、グルタチオン酸化率を測定した。eribulin と cisplatin 曝露後の CD44⁺を検討するとコントロール CD44⁺よりも酸化率は有意に低く、さらに CD44⁻と CD44⁺を比較しても、CD44⁺は CD44⁻よりも酸化率が有意に低いことが明らかとなった。このことにより eribulin と cisplatin を曝露しても CD44⁺は酸化による細胞障害を免れて抗がん剤抵抗性を得ることが考えられた (Fig. 4)。cisplatin 曝露後の CD44⁺における caspase-3 活性は CD44⁻の 72% に抑制されており、CD44⁺は CD44⁻よりも cisplatin 誘導性のアポトーシスが抑制され、より生存し続ける可能性が高いことが示唆された (Fig. 5)。

MDA-MB-231 細胞に eribulin, cisplatin, paclitaxel を曝露して CD44⁺の microRNA を分離して p21 発現に関与するという報告がある 5 つの microRNA を測定した^{29,30)} (Fig. 6)。miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-182 はがん細胞において p21 をターゲットとすることが知られているが、TNBC でこれらの microRNA が CSC のターゲットになり得るか否かは報告されていない。eribulin, cisplatin, paclitaxel の抗がん剤曝露後、すべて発現が低下した miR-182 については p21-5'-UTR 領域に相補的に組み合わせることが出来ず、p21 発現を調節することが不可能であると考えた。そして、miR-182 を除いた miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93 とターゲットタンパク質 p21 発現の相関関係を調べるために、各阻害剤を曝露した後の CD44⁺の p21 発現を検討したとこ

ろ miR-20a, miR-20b の阻害剤曝露後では有意差が認められなかったが, miR-17, miR-93 の阻害剤曝露後で p21 発現レベルはコントロールと比べて有意に高かった (Fig. 7). 乳がん患者の血清中の miR-17 濃度が腫瘍の進行および転移と相関し TNBC におけるバイオマーカーとして可能性があることや^{28,29)}, miR-93 の発現誘導により細胞周期が進行することで抗がん剤効果がより高く奏効し腫瘍増殖が抑制されることが報告されている³⁰⁾. 加えて, 本研究から miR-17 と miR-93 は CD44⁺ の p21 発現を抑制するという新しい働きが明らかとなった.

本研究結果から MDA-MB-231 細胞の cisplatin 抵抗性には CD44⁺ が関与すること, さらに CD44⁺ では miR-17, miR-93 が薬剤抵抗性の要因と考えられている p21 発現を抑制していることが明らかとなった. cisplatin 曝露後に薬剤抵抗性の CD44⁺ をアポトーシスに導くための新たな分子標的治療として miR-17 および miR-93 が有用である可能性が示唆された.

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない.

文 献

- 1) Le Du F, Eckhardt BL, Lim B, *et al.* Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget*. 2015;6:12890-12908.
- 2) Lanzardo S, Conti L, Rooke R, *et al.* Immunotargeting of antigen xct attenuates stem-like cell behavior and metastatic progression in breast cancer. *Cancer Res*. 2016;76:62-72.
- 3) Tang Y, Wang Y, Kiani MF, *et al.* Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2016;16:335-343.
- 4) Opyrchal M, Salisbury JL, Iankov I, *et al.* Inhibition of Cdk2 kinase activity selectively targets the CD44(+)/CD24(-)/Low stem-like subpopulation and restores chemosensitivity of SUM149PT triple-negative breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2014;45:1193-1199.
- 5) Oshimori N, Oristian D, Fuchs E. TGF- β promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma. *Cell*. 2015;160:963-976.
- 6) Ohsawa R, Miyazaki H, Niisato N, *et al.* Intracellular chloride regulates cell proliferation through the activation of stress-activated protein kinases in MKN28 human gastric cancer cells. *J Cell Physiol*. 2010;223:764-770.
- 7) Han S, Woo JK, Jung Y, *et al.* Evodiamine selectively targets cancer stem-like cells through the p53-p21-Rb pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469:1153-1158.
- 8) Qi X, Yin N, Ma S, *et al.* p38 γ MAPK is a therapeutic target for triple-negative breast cancer by stimulation of cancer stem-like cell expansion. *Stem Cells*. 2015;33:2738-2747.
- 9) Di Leva G, Cheung DG, Croce CM. miRNA clusters as therapeutic targets for hormone-resistant breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2015;10:607-617.
- 10) Amorim M, Salta S, Henrique R, *et al.* Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. *J Transl Med*. 2016;14:265.
- 11) Sasaki A, Udaka Y, Tsunoda Y, *et al.* Analysis of p53 and miRNA expression after irradiation of glioblastoma cell lines. *Anticancer Res*. 2012;32:4709-4713.
- 12) Sasaki A, Tsunoda Y, Tsuji M, *et al.* Decreased miR-206 expression in BRCA1 wild-type triple-negative breast cancer cells after concomitant treatment with gemcitabine and a Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor. *Anticancer Res*. 2014;34:4893-4897.
- 13) Tokudome T, Sasaki A, Tsuji M, *et al.* Reduced PTEN expression and overexpression of miR-17-5p, -19a-3p, -19b-3p, -21-5p, -130b-3p, -221-3p and -222-3p by glioblastoma stem-like cells following irradiation. *Oncol Lett*. 2015;10:2269-2272.
- 14) Qian RC, Cao Y, Long YT. Binary system for microRNA-targeted imaging in single cells and photothermal cancer therapy. *Anal Chem*. 2016;88:8640-8647.
- 15) Fan W, Wang X, Ding B, *et al.* Thioaptamer-conjugated CD44-targeted delivery system for the treatment of breast cancer in vitro and in vivo. *J Drug Target*. 2016;24:359-371.
- 16) Das SG, Romagnoli M, Mineva ND, *et al.* miR-720 is a downstream target of an ADAM8-induced ERK signaling cascade that promotes the migratory and invasive phenotype of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2016;18:40.
- 17) Mathe A, Scott RJ, Avery-Kiejda KA. MiRNAs and other epigenetic changes as biomarkers in triple negative breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:28347-28376.
- 18) Tanei T, Choi DS, Rodriguez AA, *et al.* Antitumor activity of Cetuximab in combination with

- Ixabepilone on triple negative breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res.* 2016;18:6.
- 19) Liu P, Kumar IS, Brown S, *et al.* Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2013;109:1876-1885.
 - 20) Sakurai T, Isogaya K, Sakai S, *et al.* RNA-binding motif protein 47 inhibits Nrf2 activity to suppress tumor growth in lung adenocarcinoma. *Oncogene.* 2016;35:5000-5009.
 - 21) Cleton-Jansen AM, Timmerman MC, van de Vijver MJ, *et al.* A distinct phenotype characterizes tumors from a putative genetic trait involving chondrosarcoma and breast cancer occurring in the same patient. *Lab Invest.* 2004;84:191-202.
 - 22) Lodygin D, Menssen A, Hermeking H. Induction of the Cdk inhibitor p21 by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner. *J Clin Invest.* 2002;110:1717-1727.
 - 23) Furuya K, Sasaki A, Tsunoda Y, *et al.* Eribulin upregulates miR-195 expression and downregulates Wnt3a expression in non-basal-like type of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231. *Hum Cell.* 2016;29:76-82.
 - 24) Dybdal-Hargreaves NF, Risinger AL, Mooberry SL. Eribulin mesylate: mechanism of action of a unique microtubule-targeting agent. *Clin Cancer Res.* 2015;21:2445-2452.
 - 25) Palumbo R, Sottotetti F, Bernardo A. Targeted chemotherapy with nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nab-paclitaxel) in metastatic breast cancer: which benefit for which patients? *Ther Adv Med Oncol.* 2016;8:209-229.
 - 26) Gluck S. Nab-Paclitaxel for the treatment of aggressive metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2014;14:221-227.
 - 27) Colvin HS, Nishida N, Koseki J, *et al.* Cancer stem cells of the digestive system. *Jpn J Clin Oncol.* 2014;44:1141-1149.
 - 28) Gerratana L, Fanotto V, Pelizzari G, *et al.* Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? *Cancer Treat Rev.* 2016;48:34-41.
 - 29) Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, *et al.* Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem.* 2013;59:1489-1496.
 - 30) Liu S, Patel SH, Ginestier C, *et al.* MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells. *PLoS Genet* (Internet). 2012;8:e1002751. (accessed 2017 Apr 1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369932/>

microRNA-17 AND microRNA-93 SUPPRESS p21 EXPRESSION
IN CD44 POSITIVE SUBPOPULATION OF CULTURED
HUMAN BREAST CANCER CELL LINE MDA-MB-231 CELLS

Kentaro IJIMA, Akiko SASAKI, Kanji FURUYA,
Hideto OYAMADA, Hiromichi TSUCHIYA, Hokuto NAMBA,
Toshihiko GOCHO and Yuji KIUCHI

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Yuko TSUNODA

Breast Center, Kameda Medical Center

Abstract — Using a human breast cancer cell line MDA-MB-231 cells, we examined the roles of microRNAs (miRs) in the regulation of p21, a cyclin-dependent kinase inhibitor, and the resistance to cisplatin and tubulin inhibiting anti-cancer drugs such as eribulin and paclitaxel. MDA-MB231 cells were separated into two subpopulations by the surface antigen CD44, a potential marker for cancer stem-like cells. The level of p21 protein expression was higher in CD44⁺ than in CD44⁻. Exposure of MDA-MB-231 cells to the above drugs led to increases in p21 protein. However, the level of p21 in CD44⁺ isolated after exposure to cisplatin was significantly lower than CD44⁻, suggesting that p21-dependent cell cycle suppression was blunted in CD44⁺ compared with CD44⁻. The oxidation rate of glutathione in CD44⁺ isolated after cisplatin treatment was much lower than that in CD44⁻, indicating that cisplatin induces much weaker oxidative cytotoxicity to CD44⁺ than to CD44⁻. Moreover, caspase-3 activity in CD44⁺ isolated after exposure to cisplatin was significantly lower than that in CD44⁻, indicating that CD44⁺ is more resistant to cisplatin-induced apoptosis. To explore the roles of miRs in the expression of p21, MDA-MB-231 cells were treated with various miR inhibitors followed by isolation of CD44⁺. Among them, inhibitors for miR-17 and miR-93 increased the expression of p21 in CD44⁺, suggesting that p21 expression is suppressed by miR-17 and miR-93. Thus, the current study demonstrated that expression of CD44 is associated with drug resistance to cisplatin in MDA-MB231 cells. It was also suggested that miR-17 and miR-93 serve as inhibitors for p21, a factor involved in drug resistance.

Key words: triple-negative breast cancer, microRNA, CD44 positive cells, p21

[受付 : 2月3日, 受理 : 2月17日, 2017]