

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18407

研究課題名(和文) Cancer heterogeneity獲得・維持機構におけるNFYAの機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the function of NFYA in cancer heterogeneity formation

## 研究代表者

岡田 宣宏 (OKADA, Nobuhiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教

研究者番号：60742377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌は、遺伝子発現プロファイルにより5つのサブタイプに分類される。腫瘍増殖および悪性化を促進するために異なるサブタイプ間での協同作用が重要であるという「癌の不均一性モデル」が提唱されており、乳癌治療を困難にしている原因の一つであると考えられている。我々は、NFYAがEMT進行に伴い、スプライシングバリエーションの発現パターンを変えることで、段階的に2つの機能を果たし、癌の不均一性の形成を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is classified into five subtypes by gene expression profile. In case of breast cancers, cancer heterogeneity that some different subtypes cooperate to enhance malignant progression is proposed. It is suggested that cancer heterogeneity makes it difficult to develop cancer therapy. We elucidated that NFYA plays two different roles by switching the expression of splicing variants, thereby NFYA induces the switching of breast cancer subtypes and enhances the acquisition of cancer heterogeneity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍内不均一性 上皮間葉転換(EMT) 乳癌

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌細胞は、遺伝子発現プロファイルにより5つのサブタイプに分類される。乳癌は、単一のサブタイプで構成される均一な集団で発生・増殖するが、悪性化に伴い複数のサブタイプが混在する不均一な癌組織を形成する。この不均一性は、腫瘍増殖および薬剤・治療抵抗性を高めることが示唆されており、乳癌治療を困難にしている根源である。しかし、単一のサブタイプから発生する乳癌が、『どのように不均一性を獲得するのか』など不均一性形成制御機構は不明な点が多い。乳癌において、不均一な癌組織を構成している細胞集団には、上皮性・間葉性の違いがあり、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) によりサブタイプ転換が制御されている可能性が示唆されるが、両者の間の制御メカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、サブタイプ間での上皮性・間葉性の違いに着目し、上皮間葉転換 (EMT) によりサブタイプ転換が誘導され、不均一性が構築・維持される機構を明らかにするものである。EMT と癌の不均一性を結ぶ機構を明らかにするために、乳腺上皮細胞と比較して、H-RAS 導入乳腺間葉細胞で高発現している遺伝子の同定を試みた。その結果、*Nuclear transcription factor Y subunit alpha* (NFYA) を同定した。NFYA は NFYB、NFYC と三量体転写因子を形成し、転写プロモーター内の CCAAT ボックスに結合する。CCAAT ボックスは、ほ乳類プロモーターの約 30% が保有しているため、NF-Y は多種の遺伝子の転写を誘導できると考えられている。しかし、NF-Y が EMT/サブタイプ転換に関与しているかどうかは明らかになっていない。本研究の目的は、乳癌において NFYA が EMT を介した癌の不均一性獲得・維持を制御して

いる機構を明らかにすることで、乳癌の新規創薬標的を見つけ出し、治療方法を確立するための基盤を築くことである。

## 3. 研究の方法

本研究を遂行するために以下のような方法で実験を行った。

### (1) NFYA の発現解析

我々は、スクリーニングにより EMT により発現を変化させている遺伝子 NFYA を同定している。しかし、乳癌サブタイプ間および EMT 進行中の遺伝子発現の挙動は明らかにできていない。全サブタイプを含む複数の乳癌細胞株および EMT 誘導を用い、Real-time PCR およびウエスタンブロット解析を行うことで発現パターンを解析した。

### (2) スプライシングバリエーションの機能解析

我々は、NFYA には2種のスプライシングバリエーションが存在し、乳癌サブタイプ間および EMT 進行に伴い発現パターンをスイッチしていることを明らかにした。これらの結果を基に、各バリエーションを乳癌上皮細胞に強制発現させることで、サブタイプ転換が引き起こされるか FACS による解析を行った。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用い、乳癌上皮細胞および乳癌間葉細胞における NFYA 欠損細胞を作製し、細胞増殖能・腫瘍増殖能および各スプライシングバリエーションの機能解析を行った。

### (3) *in vivo* モデルの構築および機能解析

本研究では、生体内での自発的な乳癌における NFYA の機能を明らかにするために、新規乳癌マウスモデルの構築を行った。CRISPR/Cas9 システムによる NFYA のノックアウトと Wnt1 の強制発現を組み合わせたレンチウイルスをマウス乳管内に注入し、乳腺特異的に感染させ、乳癌を発症させる。このモデルを用い、乳癌発生段階における癌の不均一性形成機構における NFYA の機能解析を行った。

#### 4. 研究成果

ほぼ研究計画どおり順調に進み以下の成果を得た。

##### (1) NFYA の発現パターン

NFYA の発現パターンを調べる中で、NFYA には2種のスプライシングバリエーションが存在することが明らかになった。さらに Real-time PCR およびウエスタンブロット解析により、これら2種のスプライシングバリエーションが、乳癌サブタイプ間およびEMT進行に伴い発現パターンをスイッチさせていることを明らかにした。

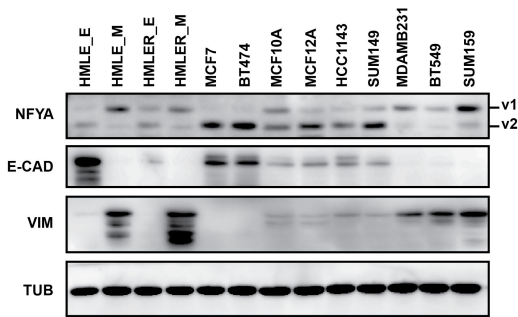


図1: 乳癌細胞におけるNFYAの発現パターン

##### (2) スプライシングバリエーションの機能解析

乳癌上皮細胞 (Luminal 細胞) に各スプライシングバリエーションを発現させた結果、上皮性 NFYA は Luminal 細胞を Luminal-Basal 中間細胞に転換させた。間葉性 NFYA は Luminal-Basal 中間細胞を Basal 細胞に転換させ、サブタイプ転換を完了させることを明らかにした。これらの結果は、各スプライシングバリエーションが、サブタイプスイッチングを開始させる「スターター」およびサブタイプスイッチングを促進させる「ブースター」として機能し、協調的・段階的に役割を果たしていることを示唆している。

さらに、CRISPR/Cas9 システムにより各バリエーションの欠損細胞を作製し、機能解析を行ったところ、間葉性 NFYA の欠損は、細胞増殖・腫瘍形成能を著しく減少させた。しかし、上皮性 NFYA の欠損による、細胞増殖・腫瘍形成能への影響は確認されなかった。また、各

バリエーション特異的な転写標的遺伝子の存在も確認しており、これら2種のスプライシングバリエーションがサブタイプ転換において異なる役割を果たしていることが明らかとなった。

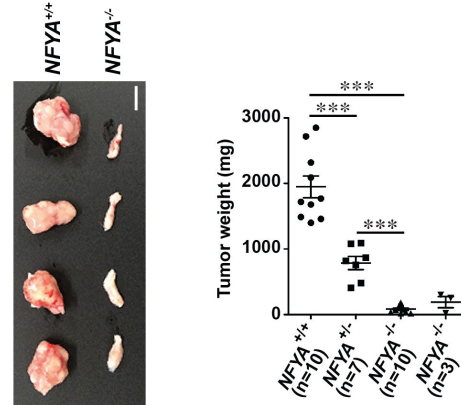


図2: 間葉性NFYA欠損による腫瘍増殖能の抑制

##### (3) *in vivo* モデルの構築および機能解析

本研究により CRISPR/Cas9 システムと Wnt1 の強制発現を組み合わせたレンチウイルスによる自発的な乳癌を解析できる簡便なマウスモデルを構築することができた。このマウスモデルを用い、乳癌発生過程における NFYA の機能を解析した結果、NFYA を欠損させることで、Wnt1 により誘導される TEB の肥大化 (乳癌発生の初期段階) が抑制された。さらに、間葉性 NFYA バリエーション特異的欠損により、乳腺の分枝が増加することを明らかにした。また、FACS 解析によりその乳腺の分枝の増加が、幹細胞の蓄積によるものであることが示唆された。

これらの結果は、NFYA 各バリエーションが、別々の機能を段階的に果たし、癌進展過程における不均一性の形成を協調的に促進していることを示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計6件)

岡田宣宏、高橋智聡: 「NFYA regulates multistep process of cancer heterogeneity」、第75回日本癌学会学術総

会（パシフィコ横浜・神奈川）、2016年10月6-8日

Nobuhiro Okada, Masahiro Shimazaki, Kiyotsugu Yoshikawa: 「NFYA is required for cancer heterogeneity formation」, The 41<sup>st</sup> Naito Conference (シャトレーゼガトーキングダム札幌・北海道), July 5-8, 2016

Nobuhiro Okada, Masahiro Shimazaki, Kiyotsugu Yoshikawa: 「NFYA is required for cancer heterogeneity formation」, Keystone Symposia, Stem cells and Cancer (Breckenridge, Colorado, USA), March 6-10, 2016

岡田宣宏、嶋崎雅広、吉川清次：「NFYA is a key factor for cancer heterogeneity formation」、平成27年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム（一橋講堂・東京）、2016年2月8-9日

岡田宣宏、嶋崎雅広、吉川清次：「NFYA regulates cancer heterogeneity formation in early tumorigenesis」、平成27年度個体レベルでの癌研究支援活動ワークショップ（琵琶湖ホテル・滋賀）、2016年2月3-4日

岡田宣宏、嶋崎雅広、吉川清次：「NFYA is required for cancer heterogeneity formation」、文部科学省科学研究費新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」2015年度がん若手ワークショップ（蓼科グランドホテル滝の湯・長野）、2015年9月2-5日

〔その他〕

ホームページ等

<http://omb.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 宣宏 (OKADA, Nobuhiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教