

令和元年6月5日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08227

研究課題名(和文) 乳癌悪性化におけるクロマチン制御因子FoxA1の機能解析

研究課題名(英文) Involvement of the pioneer factor FoxA1 in breast cancer progression.

研究代表者

山口 憲孝 (Noritaka, Yamaguchi)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：80399469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：FoxA1はクロマチンリモデリングの制御を介して遺伝子発現を調節するクロマチン制御因子である。FoxA1は乳癌細胞において高発現し細胞の生存や増殖に寄与することが知られている。しかし、悪性度の高い乳癌細胞ではFoxA1の発現が消失していることも知られており、FoxA1発現の有無と乳癌の悪性化との関連性についてはよくわかっていなかった。本研究において、FoxA1の発現消失が乳癌細胞の薬剤抵抗性に関与することが判明し、FoxA1が乳癌の悪性化の促進と抑制の両面に作用する分子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、クロマチン制御因子FoxA1が乳癌細胞の悪性化の促進と抑制の二面的な役割を持つことが明らかとなった。これまでの解析によってFoxA1が乳癌細胞の生存や増殖に寄与することが判明していたため、FoxA1の機能抑制が乳癌の治療に役立つと考えられてきたが、本研究によってFoxA1の機能抑制が薬剤抵抗性を誘導し乳癌の治療をより困難にする可能性が示された。今後、乳癌悪性化におけるFoxA1の促進的機能と抑制的機能について分子レベルの詳細な解析を進め、促進的機能のみを阻害する治療法開発を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：FoxA1 is a pioneer factor that regulates chromatin remodeling and gene expression. FoxA1 is known to be involved in breast cancer progression through expression of genes controlling cell survival and growth. However, FoxA1 expression is reduced or lost in malignant types of breast cancer cells, and the relationship between the presence of FoxA1 expression and the malignancy of breast cancer cells has not been clarified. In this study, we found that loss of FoxA1 expression causes acquisition of chemo-resistance in breast cancer cells. This finding suggests that FoxA1 has both promotive and suppressive roles in breast cancer progression. Specific inhibition of its promotive roles in breast cancer progression is required for the treatment of breast cancer patients.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性の罹患率一位の重要な癌である。乳癌の多くは女性ホルモンのエストロゲンに依存して増殖しており、エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) 阻害薬やアロマターゼ阻害薬によるエストロゲン機能抑制が治療に用いられている。しかし、長期治療後に頻発するエストロゲン非依存性乳癌の再発が問題となっており、乳癌細胞のエストロゲン非依存性獲得の分子機構の解明と、エストロゲン非依存性乳癌に対する新規治療薬の開発が必要とされている。

我々はこれまでに、ER $\alpha$  陰性のエストロゲン非依存性乳癌細胞では、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化するタンパク質キナーゼ NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) が高発現し NF- $\kappa$ B の持続的活性化を誘導して細胞増殖を促進していることを明らかにした (Cancer Sci. 2009)。さらに、NIK 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化が NOTCH や  $\beta$ -catenin を介して乳癌幹細胞の維持に寄与していることを明らかにした (Nat Commun. 2013, Cancer Res. 2015)。また、エストロゲン非依存性乳癌細胞では、NF- $\kappa$ B 抑制因子として知られるユビキチン化修飾酵素 A20 が NIK タンパク質の安定化を誘導して NF- $\kappa$ B を活性化することも明らかにした (Sci Rep. 2013)。このように、我々は、NIK の高発現による NF- $\kappa$ B 持続的活性化がエストロゲン非依存性の乳癌細胞の増殖に重要であることを明らかにしてきた。しかしながら、エストロゲン依存性乳癌細胞が NIK 遺伝子を高発現しエストロゲン非依存性を獲得する分子機構についてはわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

Forkhead box (Fox) 型転写因子 FoxA1 は、ヘテロクロマチンを開いて他の転写因子を動員して遺伝子発現を誘導するクロマチン制御因子として知られている。ER $\alpha$  の機能は FoxA1 に依存しており、FoxA1 は ER $\alpha$  の標的遺伝子発現に重要である。さらに、FoxA1 はエストロゲン依存性乳癌細胞の増殖にも必要である (Biochem Biophys Res Commun. 2009)。エストロゲン依存性乳癌細胞では ER $\alpha$  と FoxA1 の両方が発現しているが、ER $\alpha$  陰性のエストロゲン非依存性乳癌細胞では FoxA1 の発現も欠損していることが知られている。そこで、我々は、FoxA1 発現の消失が乳癌細胞のエストロゲン非依存性獲得に関与しているのではないかと予想し、本研究において FoxA1 発現の消失とエストロゲン非依存性獲得との関連について解析を行なった。

### 3. 研究の方法

エストロゲン依存性乳癌細胞がタモキシフェン耐性を獲得する過程を解析するにあたり、ER $\alpha$  陽性且つエストロゲン依存性のヒト乳癌細胞株 MCF7 を用いタモキシフェン存在下で 1 年以上培養して MCF7 のタモキシフェン耐性株 (tamoxifen-resistant, TAM-R) を樹立した。比較のために、ホルモン欠乏培地にて MCF7 を 1 年以上培養した長期エストロゲン欠乏株 (long-term estrogen-deprived, LTED) も樹立した。まず、親株、TAM-R 株、LTED 株それぞれの ER $\alpha$  や ER $\alpha$  の活性化に必要なクロマチン制御因子 Forkhead box A1 (FoxA1) の発現を解析すると、TAM-R 株においてのみこれらの発現が顕著に低下していることがわかった。ER $\alpha$  の標的遺伝子である XBP-1, TFF1, Cyclin D1 の発現を解析すると、TAM-R 株においてこれらはどれも抑制されており、TAM-R 株ではエストロゲンシグナルが顕著に抑制されていることが明らかとなった。次に NF- $\kappa$ B シグナルの活性化を解析すると、TAM-R 株においてのみ無刺激下でも NF- $\kappa$ B シグナルが持続的に活性化していることがわかった。NF- $\kappa$ B の標的遺伝子であり乳癌の増殖に関わる炎症性サイトカイン Interleukin-6 (IL-6), IL-8 (CXCL8) が TAM-R 株において高発現していることがわかった。TAM-R 株に NF- $\kappa$ B 阻害薬の SC-514 を処理すると、IL-6 の発現が顕著に低下し細胞増殖も抑制されたことから、TAM-R 株では NF- $\kappa$ B が持続的に活性化し特に IL-6 の発現を促して細胞増殖を促進していることが示唆された。

次に、TAM-R 株における NF- $\kappa$ B シグナル持続的活性化と IL-6 発現の分子機構を解析した。その際、TAM-R 株にて発現が低下していた ER $\alpha$  と FoxA1 に着目した。ER $\alpha$  と FoxA1 は癌悪性を抑制することが報告されており、これらの発現低下が NF- $\kappa$ B シグナル持続的活性化や IL-6 発現に関与している可能性を検討することにした。ER $\alpha$  陰性のエストロゲン非依存性乳癌細胞株 MDA-MB-231 および樹立した TAM-R 株に ER $\alpha$  もしくは FoxA1 をそれぞれ安定発現し、NF- $\kappa$ B シグナルと IL-6 発現への影響を解析した。その結果、FoxA1 を安定発現した場合のみ、NF- $\kappa$ B シグナル活性化に変化は認められなかったものの IL-6 発現が顕著に低下することがわかった。内在性 FoxA1 の役割を解析するために、MCF7 細胞の FoxA1 を RNAi にてノックダウンし NF- $\kappa$ B シグナルと IL-6 発現への影響を解析した。その結果、NF- $\kappa$ B シグナル活性化には大きな変化は認められなかったが、IL-6 発現が顕著に誘導された。これらのことから、FoxA1 は NF- $\kappa$ B シグナルには大きな影響を与えないものの IL-6 発現を抑制する機能を有することが示唆された。

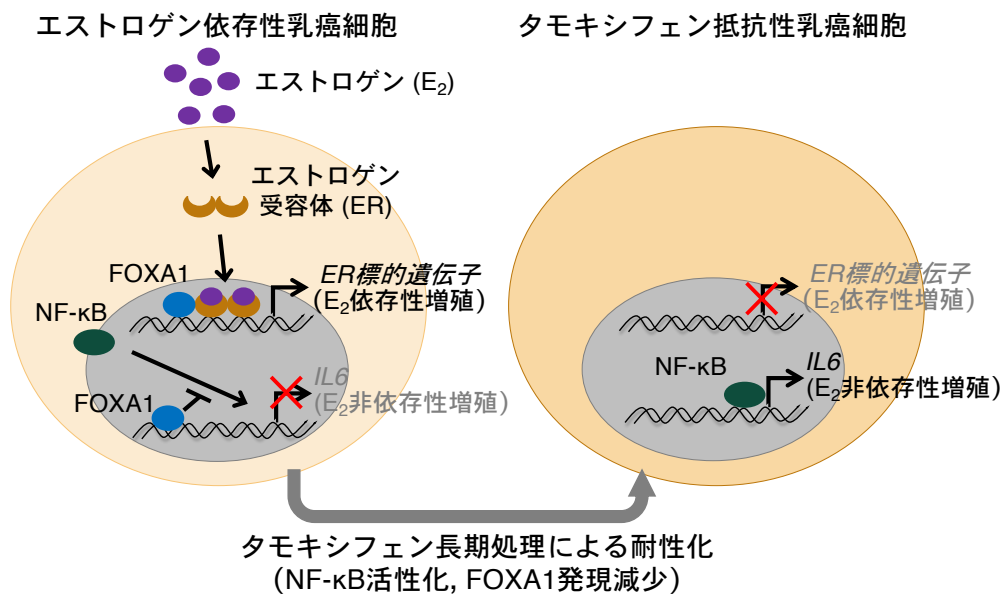
FoxA1 による IL-6 発現抑制の分子機構を解析するために、クロマチン免疫沈降 (ChIP assay) を行なった。ヒト IL-6 遺伝子転写開始点の上流 5,000bp を転写因子結合部位解析ツール (JASPAR) にて解析し、FoxA1 結合部位候補 3ヶ所を特定した。ChIP assay にて FoxA1 の結合を解析した結果、転写開始点に近い 2ヶ所への結合が検出された。次に、IL-6 遺伝子転写開始点の近傍に存

在する結合部位へのNF- $\kappa$ Bの結合をChIP assayにて解析すると、MCF7細胞のFoxA1ノックダウンによりNF- $\kappa$ B結合が増加する一方で、TAM-R株のFoxA1発現ではNF- $\kappa$ B結合が減少することがわかった。これらのことから、FoxA1はIL-6遺伝子プロモーター領域に結合し、NF- $\kappa$ Bの結合を阻害することでIL-6発現を抑制することが示唆された。

最後に、TAM-R株におけるIL-6の役割について解析を行なった。IL-6は乳癌幹細胞の増殖や維持を促進することが知られていることから、TAM-R株においてIL-6によって乳癌幹細胞様の形質が誘導されている可能性について検討した。幹細胞様形質を解析する方法としてSphere assayを行なったところ、TAM-R株では有意にSphere形成が誘導されていた。興味深いことに、NF- $\kappa$ BシグナルやIL-6シグナルの阻害によってTAM-R株のSphere形成は抑制された。以上のことから、TAM-R株では持続的に活性化したNF- $\kappa$ Bと発現低下したFoxA1の両者によって誘導されたIL-6が乳癌幹細胞様の形質を導き、細胞増殖を促進していることが示された。この乳癌幹細胞様の形質がタモキシフェン耐性化にも関与しているのではないかと考えている(図)。

#### 4. 研究成果

本研究において、タモキシフェン耐性を獲得したTAM-R株ではNF- $\kappa$ Bシグナルが持続的に活性化しIL-6の発現を誘導して細胞増殖を促進していることを見出した。また、TAM-R株ではFoxA1の発現が低下していることが明らかとなり、その後の解析によって、FoxA1はNF- $\kappa$ Bシグナルの活性化には影響しないものの、NF- $\kappa$ BのIL-6プロモーターへの結合を阻害してIL-6発現を抑制する転写抑制因子として働くことが判明し、TAM-R株におけるFoxA1の発現低下がIL-6発現の一因となっていることがわかった。TAM-R株におけるNF- $\kappa$ B持続的活性化の分子機構は不明であるが、FoxA1の発現低下がNF- $\kappa$ Bの機能亢進に寄与していることが本研究によって明らかとなった。FoxA1はヘテロクロマチンを開くことによってER $\alpha$ の活性化を促進するクロマチン制御因子として知られているが、本研究によってFoxA1が転写抑制因子としても働くことが示された。本研究より、タモキシフェン耐性を獲得した乳癌に対しては、NF- $\kappa$ BシグナルやIL-6の阻害、さらには遺伝子治療などによるFoxA1の発現低下の回復が有効な治療法になるのではないかと考えられる。



図, FOXA1 発現減少によるNF- $\kappa$ B活性化亢進のモデル図

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件) 全て査読有り

- ① Hirata K, Takakura Y, Shibazaki M, Morii M, Honda T, Oshima M, Aoyama K, Iwama A, Nakayama Y, Takano H, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Forkhead box protein A1 confers resistance to transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis in breast cancer cells through inhibition of Smad3 nuclear translocation. J Cell Biochem. 120, 2259-2270 (2019)  
DOI: 10.1002/jcb.27551
- ② Yuki R, Tatewaki T, Yamaguchi N, Aoyama K, Honda T, Kubota S, Morii M, Manabe I, Kuga T, Tomonaga T, Yamaguchi N. Desuppression of TGF- $\beta$  signaling via nuclear c-Abl-mediated phosphorylation of TIF1 $\gamma$ /TRIM33 at Tyr-524, -610, and -1048. Oncogene 38, 635-655 (2019)

DOI: 10.1038/s41388-018-0481-z

- ③ Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N. Down-regulation of Forkhead box protein A1 (FOXA1) leads to cancer stem cell-like properties in tamoxifen-resistant breast cancer cells through induction of interleukin-6. J Biol Chem. 292, 8136-8148 (2017)  
DOI: 10.1074/jbc.M116.763276
- ④ Takakura Y, Yamaguchi N, Honda T, Morii M, Yuki R, Nakayama Y, Yamaguchi N. The Truncated Isoform of the Receptor Tyrosine Kinase ALK Generated by Alternative Transcription Initiation (ALK(ATI)) Induces Chromatin Structural Changes in the Nucleus in a Kinase Activity-Dependent Manner. Biol Pharm Bull. 40, 1968-1975 (2017)  
DOI: 10.1248/bpb.b17-00548
- ⑤ Anzai E, Hirata K, Shibasaki M, Yamada C, Morii M, Honda T, Yamaguchi N, Yamaguchi N. FOXA1 Induces E-Cadherin Expression at the Protein Level via Suppression of Slug in Epithelial Breast Cancer Cells. Biol Pharm Bull. 40, 1483-1489 (2017)  
DOI: 10.1248/bpb.b17-00307

[学会発表] (計6件)

- ① 山口憲孝, 山口直人, 高野博之. 上皮間葉転換と細胞内代謝リモデリングのクロストーク 第139回日本薬学会年会 (2019, 3) 幕張メッセ (千葉県)
- ② Yamaguchi N, Takakura Y, Hirata K, Takano H, Yamaguchi N. Involvement of FOXA1 in resistance to TGF-beta-induced apoptosis in estrogen receptor-positive breast cancer cells. The 2018 ASCB/EMBO Meeting (2018, 12) サンディエゴ (米国)
- ③ 山口憲孝, 山口直人. 乳癌細胞における TGF-beta 誘導性細胞死の抑制機構の解析. 第138回日本薬学会年会 (2018, 3) 石川県立音楽堂 (石川県)
- ④ Yamaguchi N, Yamaguchi N. The molecular mechanisms underlying resistance to TGF-beta-induced apoptosis in breast cancer cells. The 2nd International Conference on Genomic Medicine 2018 (2018, 2) ヒューストン (米国)
- ⑤ 山口憲孝, 中山祐治, 山口直人. エストロゲン依存性乳癌細胞のタモキシフェン耐性獲得における NF- $\kappa$ B 経路の役割. 第137回日本薬学会年会 (2017, 3) 東北大学川内キャンパス (宮城県)
- ⑥ 山口憲孝, 中山祐治, 山口直人. エストロゲン依存性乳癌細胞のタモキシフェン耐性獲得機構の解析. 第39回日本分子生物学会年会 (2016, 11) パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/maku/index.html>

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。