

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11161

研究課題名(和文) 乳癌のサブタイプ別に化学療法の治療効果を決定づける因子の解析と治療予測効果の検討

研究課題名(英文) Identification of factors that contribute to the anti-tumor effect of the microtubule targeting agent Paclitaxel in TNBC cells

研究代表者

中嶋 亘 (Nakajima, Wataru)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40557500

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)：Triple-negative乳癌細胞株(ER、PgR、HER2がすべて陰性であるタイプ)を用いて、微小管阻害薬パクリタキセルによるアポトーシス誘導の分子機構を詳細に解析するため、アポトーシスに關与する遺伝子群の発現をRNA干渉(RNAi)スクリーニング法で解析したところ、アポトーシスを引き起こすのに重要な因子を同定した。

そこで乳癌患者から採取された組織臨床検体の残余分を用いて、アンスラサイクリンとタキサン系薬剤の効果が得られた患者検体群と効果が得られなかった検体群とに分類し、組織免疫染色、遺伝子発現レベルの解析等を行い、この同定した因子が薬剤の効果を決定づけているか検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性乳癌において外科療法が困難な乳癌に対しては薬物療法が主流となっているが、内分泌療法が期待できないタイプの乳癌では化学療法に頼らざるを得ないのが現状である。そこで化学療法薬の細胞死誘導機構を詳細に解析することで、感受性と抵抗性との違いを決定づける分子機構の一端を解明し、サブタイプ別あるいは遺伝的解析を組み合わせることで、どの薬剤がより効果が得られるかを予測診断できないかと考えている。したがって薬剤投与前からどの程度の効果が見込めるかを知ることにより、今後の治療方針に活用できることが期待され、また患者のQOLを高めること、無駄な投薬を避けることにつながることも期待される。

研究成果の概要(英文)：The microtubule targeting agent Paclitaxel is prescribed widely for various malignancies, including breast adenocarcinomas. However, the precise mechanism of Paclitaxel-induced apoptosis is not clearly understood. From these findings, we used siRNA screening approach to identify genes involved in Paclitaxel-induced apoptosis. Here we identify that candidate gene, which is required for the activation of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, Cytochrome c release from the mitochondria and play an important role of Paclitaxel-induced apoptosis. Furthermore, using the residual of the tissue clinical specimen collected from the breast cancer patient, we analyzed the effects of candidate gene on microtubule dynamics and determine whether it becomes biomarker for the effect and susceptibility for Paclitaxel.

研究分野：分子生物学

キーワード：アポトーシス 薬剤耐性 微小管阻害薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は、近年の生活様式や食生活の欧米化に伴って増加の一途を辿っており、日本では 2014 年に新たに罹患した女性癌患者の約 20%が乳癌で第一位となっている。乳癌は遺伝子解析によって Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like のサブタイプに分類され、それぞれのサブタイプに有効な治療法が存在すると考えられている。とりわけ Basal-like の多くがトリプルネガティブ乳癌 (Triple-Negative Breast Cancer : 以後 TNBC) と言われる女性ホルモン受容体(ER)とプロゲステロンホルモン受容体(PR)、HER2 という増殖要因の受容体を持たないタイプで、さらに TNBC は生殖細胞における BRCA1/2 遺伝子変異の有無、さらにその遺伝子変異に関わらず BRCA1/2 に異常のある BRCAness と異常のない Non-BRCAness の 7 つに分類される。現在、TNBC や Luminal B, HER2-enriched サブタイプには抗癌剤による化学療法が適応されている。転移性乳癌において外科療法が困難な乳癌に対しては薬物療法が主流となっているが、内分泌療法が期待できないタイプの乳癌では化学療法に頼らざるを得ない。化学療法薬は様々な種類があるが、標準治療であるアンスラサイクリン・タキサンを用いる治療が主で 10 年以上変わっていない。しかし近年、白金製剤や分子標的薬の評価が行われると同時に、トリプルネガティブ乳癌では遺伝子解析から新たなサブタイプに再分類され治療への応用が期待されている。そこで我々は、化学療法薬の細胞死誘導機構を詳細に解析することで、感受性株と抵抗性株との違いを決定づける分子機構の一端を解明し、サブタイプ別あるいは遺伝的解析を組み合わせることで、どの薬剤がより効果を望めるのかを見定めることができるような治療法につなげたいと考えている。

特に内分泌療法が行えないサブタイプの乳癌に対しては、化学療法は癌治療を担う上でとても重要であるが、進行・再発乳癌ではその効果は不十分なことが多く、化学療法に伴う副作用の増強によって QOL の低下も余儀なくされ結果的には化学療法を行う利点のない患者もいる。また他のタイプの乳癌と比べ TNBC は再発・転移の確率が高く予後が悪いと言われている。化学療法薬は数多くあるにもかかわらずその分子機構は未だに不明な点が多く、より詳細な分子機構を解明することは化学療法薬の奏効率を上げる為や、事前効果予測をするうえでも重要な課題である。

### 2. 研究の目的

#### (1) Noxa 依存的なアポトーシス抑制因子 Mcl-1 の分解機構の解明

ドキソルビシンや白金製剤感受性株ではドキソルビシンや白金製剤を処理するとアポトーシス誘導因子 Noxa が発現誘導し CDK2 によりリン酸化したアポトーシス抑制因子 Mcl-1 が分解され、アポトーシスが誘導されることがこれまでの解析から明らかとなった。今後は、リン酸化を受けた Mcl-1 がどのような機構で分解されるのかを解析する。

#### (2) Noxa と Mcl-1 との結合を阻害する要因を分子レベルでの究明

ドキソルビシン抵抗性細胞株では何らかの理由で Mcl-1 と Noxa との結合が阻害されていることで、Mcl-1 の分解が進まずアポトーシス誘導が抑制されていると仮説を立て、なぜ抵抗性株では結合が阻害されているのかその分子機構を解析する。

#### (3) 乳癌や TNBC のサブタイプごとによって Mcl-1 の分解能に違いがあるのかを解析する

乳癌のサブタイプの違いによって Mcl-1 の分解能に違いがあるのか、Noxa との結合能に差があるのかより多くの細胞株を用いて比較検証を行い、サブタイプによる傾向性があるのかを解析する。またアンスラサイクリンと併用されるタキサン製剤による Mcl-1 の分解能も合わせて検証を行い、最終的には乳癌患者臨床検体と照らし合わせた解析を行う。

### 3. 研究の方法

我々は乳癌細胞株を対象に、化学療法薬タキサン系薬剤パクリタキセル、アンスラサイクリン系薬剤ドキソルビシンや白金製剤シスプラチンを処理した際に引き起こされるアポトーシスに關与する個々の遺伝子を、RNA 干渉 (RNAi) スクリーニングにより同定する。また、同定した候補因子を中心に、乳癌細胞株で薬剤感受性をどのように制御するのかを検討し、実際に患者検体を用いてこの候補因子の発現量の高いか低いにより薬剤効果に差があったのかを比較検証を行う。

### 4. 研究成果

(1) 微小管阻害薬パクリタキセルを処理した際に引き起こされるアポトーシスに關与する個々の遺伝子を、RNA 干渉 (RNAi) 法スクリーニングにより候補因子を同定した。この候補因子を発現抑制した乳癌細胞株ではパクリタキセル処理後のアポトーシスの誘導に顕著な抵抗性を示した。また候補因子の発現量が元来少なかった細胞株ではパクリタキセルに対する感受性が低くアポトーシス誘導が抑制されていたのに対し、候補因子を高発現する細胞株ではパクリタキセルに対する感受性が高いことが明らかとなった。さらには、候補因子の低発現細胞株に候補因子の発現を回復させると、パクリタキセルによる感受性が増強し低濃度でもアポトーシスが

誘導されたことから、候補因子の発現量がパクリタキセルの感受性を決定づける因子としての可能性が考えられた。

現在は、この候補因子が生体内でも同様にパクリタキセルの感受性を制御しているのかを検討するために、パクリタキセル感受性細胞株における候補因子をロックダウンした細胞株を背部皮下に移植したヌードマウスでのパクリタキセル投与後の腫瘍縮小効果を解析中である。また、候補因子の発現量を患者検体を用いて比較検討することで、パクリタキセルの効果を予測できるバイオマーカーとして応用できるかどうかを含めて報告する予定である。

(2) 1年～2年目までの研究成果からこの候補因子を発現抑制した乳癌細胞株では微小管阻害薬処理後のアポトーシスの誘導に顕著な抵抗性を示した。逆に、この候補因子の発現量が低い細胞株では、候補因子がエピジェネティックな制御を受けていることがエピジェネティック薬剤を用いた解析から明らかとなった。この候補因子の転写抑制の状態を、HDAC 阻害剤や脱メチル化酵素阻害薬を用いて解除させることで候補因子の発現を促し、微小管阻害薬の治療効果を高めることができることが判った。現在、これらの成果をまとめて論文として投稿中である。

(3) 感受性株ではドキソルビシンや白金製剤を処理すると、アポトーシス誘導因子 Noxa が発現誘導されることでアポトーシス抑制因子 Mcl-1 がプロテアソーム系による分解が促進し、アポトーシスが誘導されることがこれまでの解析から明らかとなった。E3 ligase を対象とした RNA 干渉法を用いた解析から、Mcl-1 は Noxa 依存的に E3 ligase である Mule によって Mcl-1 の分解が促進されていることが新たに判明した。Mule の発現を制御する薬剤を用いて、ドキソルビシンや白金製剤を用いたところ、Mcl-1 の分解を促進することが可能であったことから、従来の処方よりも上乘せ効果が期待される。これらの成果を現在、論文として投稿準備中である。

(4) ALK 遺伝子または ROS1 遺伝子に変異がある非小細胞肺癌では分子標的薬クリゾチニブが有効であるが、治療を続けていくうちに薬剤耐性が生じることが問題となっており、その耐性機構を詳しく理解することが、耐性を克服するためにも重要である。我々は、シャペロンを介したオートファジー(chaperone-mediated autophagy [CMA])によって、その薬剤耐性が強まっていることを明らかとした。さらには、CMA は非小細胞肺癌でその機能が強まっており、Mcl-1 の分解を阻害し薬剤耐性を獲得していることを発見し報告した。今後、この CMA の働きを抑えるような薬剤と分子標的薬とを組み合わせることでより高い治療効果が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sharma Kanika, Vu Thien-Trang, Cook Wade, Naseri Mitra, Zhan Kevin, Nakajima Wataru, Harada Hisashi	4. 巻 12
2. 論文標題 p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 788 ~ 798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1002/1878-0261.12172">https://doi.org/10.1002/1878-0261.12172</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sharma Kanika, Vu Thien-Trang, Cook Wade, Naseri Mitra, Zhan Kevin, Nakajima Wataru, Harada Hisashi	4. 巻 17
2. 論文標題 p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 1878-0261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1002/1878-0261.12172">https://doi.org/10.1002/1878-0261.12172</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wataru Nakajima, Nobuyuki Tanaka	4. 巻 2
2. 論文標題 The anti-apoptotic protein MCL1, a novel target of lung cancer therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Treatment and Diagnosis	6. 最初と最後の頁 54-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masaru Matsumoto, Wataru Nakajima, Masahiro Seike, Akihiko Gemma, Nobuyuki Tanaka	4. 巻 473
2. 論文標題 Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 490-496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2016.03.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Junya Suzuki, Wataru Nakajima, Hidenori Suzuki, Yumi Asano, Nobuyuki Tanaka	4. 巻 482
2. 論文標題 Chaperone-mediated autophagy promotes lung cancer cell survival through selective stabilization of the pro-survival protein, MCL1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1334-1340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.12.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wataru Nakajima, Nobuyuki Tanaka	4. 巻 3
2. 論文標題 BH3 mimetics: Their action and efficacy in cancer chemotherapy	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Integrative Cancer Science and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 437-441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/ICST.1000184.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nakajima Wataru, Kurita Tomoko, Naito Zenya, Takei Hiroyuki, Tanaka Nobuyuki
2. 発表標題 Analysis of Paclitaxel-induced apoptosis in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋 亘、栗田 智子、浅野 由ミ、武井 寛幸、田中 信之
2. 発表標題 BRCAness乳癌細胞株の微小管阻害薬パクリタキセルに対する抵抗性機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋 亘、浅野 由三、武井寛幸、田中 信之
2. 発表標題 乳癌細胞株の微小管阻害薬パクリタキセルに対する分子機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋 亘、浅野 由三、武井 寛幸、田中 信之
2. 発表標題 BRCAness乳癌細胞株の微小管阻害薬パクリタキセルに対する抵抗性機構の解析
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木 淳也、中嶋 亘、田中 信之
2. 発表標題 オートファジーによるアポトーシスの抑制機構の解析
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 江畑 貴弘、上原 郁野、平田 宏聡、小野寺 啓吾、町山 祐亮、藤田 英明、三井 靖雅、奥崎 大介、中嶋 亘、田中 信之、川内 啓子
2. 発表標題 新規p53標的遺伝子によるアクチン細胞骨格の調節を介したアポトーシス誘導機構
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 内耳疾患治療剤	発明者 田中信之、林裕史、 上原郁野、中嶋巨、 鈴木英紀	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-232704	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田中 信之  (Tanaka Nobuyuki)  (80222115)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授    (32666)	