

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19052

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌増悪化を招くBIG3の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of BIG3 on triple-negative breast cancer progression

研究代表者

木村 竜一郎(KIMURA, Ryuichiro)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20587323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ER陰性乳癌細胞におけるBIG3相互作用因子として、細胞質に局在し癌発症・進展において多彩な役割を果たす多数の新規BIG3相互作用因子が見出され、これらのいくつかの因子は微小管構造の維持・制御に関わる重要な分子であった。BIG3とこれらの分子との相互作用および細胞内共局在を免疫沈降法と免疫染色法で明らかにした。一方、ER陰性乳癌細胞でBIG3をノックダウンすると、細胞周期を制御するE2F1の発現抑制が観察され、同時に細胞増殖が抑制された。これらの発見から、BIG3は微小管制御因子との結合、あるいは細胞周期制御因子の発現制御を介して、ER陰性乳癌細胞の生存・増殖に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified novel BIG3-interacting factors including microtubule-regulated molecule in ER-negative breast cancer. We further analyzed BIG3-these factors interactions and colocalization by immunoprecipitation and immunostaining. On the other hand, knockdown of BIG3 expression with small-interfering RNA reduced E2F1 expression and cellular growth of ER-negative breast cancer. These results suggest that BIG3 directly regulates cellular survival and growth of ER-negative breast cancer through regulation of microtubule or cell cycle.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳癌 ゲノム シグナル伝達 プロテオーム 発現制御

1. 研究開始当初の背景

乳癌の罹患率は、高齢化や生活様式の欧米化に伴い年々増加傾向にあり、我が国の女性が生涯で罹患する癌の中で最も頻度が高い。乳癌は女性ホルモンであるエストロゲン (E2) によって発症、増殖、悪性化が促進することから、治療薬として抗 E2 製剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が臨床応用されており、術後乳癌の治療、転移・再発予防、癌の進行抑制に大きく貢献している。また、乳癌で恒常的に発現が亢進している膜タンパク質 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的とした抗体医薬ハーセプチンは、先の内分泌療法とともに乳癌治療に革新的な貢献を果たした。しかしながら、これらの分子標的薬が奏功するのはエストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) や HER2 が発現している乳癌に限られている。一方で、ER 陰性、プロゲステロン受容体 (PgR) 陰性、HER2 陰性のトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は全乳癌の 10~20% ほどを占める。TNBC は術後、比較的早期の再発が多く、その他の乳癌と比較して生物学的悪性度が高く予後不良である (図 1)。また、先に挙げた内分泌療法や抗 HER2 療法は適応せず、効果的な治療法のないことが深刻な問題となっており、TNBC 発症・進展の詳細な分子機構を理解した新しい治療法の開発が急務となっている。

(J Clin Oncol 2006;24:5652-5657)

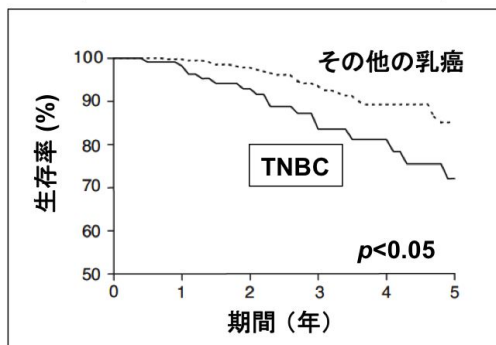
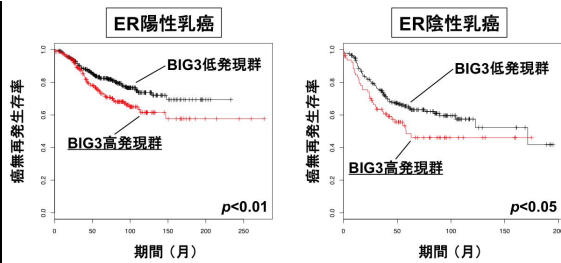


図1. TNBCの悪性度の高さ

所属研究室では、網羅的遺伝子発現解析を通じて乳癌症例にて高頻度で高発現する分子 brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) を同定した。BIG3 は、ER 陽性乳癌において ER 標的遺伝子として発現亢進しており、ER 活性化抑制因子 PHB2 の抑制機能を阻害することで ER 陽性乳癌の細胞増殖を促進することが明らかとなっている (文献 1-3)。

一方で、BIG3 は ER 陰性乳癌症例の一部でも発現が亢進していることが分かった。また、BIG3 発現が亢進している ER 陰性乳癌症例は悪性度が高く、ER 陰性乳癌でも (ER 陽性乳癌と同様に) BIG3 が予後規定因子となっていることが示された (図 2)。



乳癌大規模コホート研究 [Breast Cancer Res Treat (2010) 123:725-731] のマイクロアレイによる遺伝子発現解析と予後結果を基にして癌無再発生存率をKaplan-Meier Plotterにて図示した。

図2. BIG3発現と乳癌予後の関係

2. 研究の目的

我々が行った可能性試験の結果、RNA 干渉法による BIG3 の発現抑制はヒト TNBC 細胞株の細胞増殖を阻害することが分かった (図 3)。しかしながら、ER 陰性乳癌では、ER-PHB2 複合体は形成されず、BIG3 はこれらの細胞で ER 陽性乳癌と同様の作用機序で機能するとは考えにくい。したがって、TNBC を含む ER 陰性乳癌においては、BIG3 は全く新しい機能によって癌細胞の生存・増殖を制御していることが示唆される。このような ER 陰性乳癌における BIG3 の新しい機能を発揮するには、BIG3 は今までに知られていない分子と会合し、これらの分子と複合体を形成する可能性が高いと考えられる。

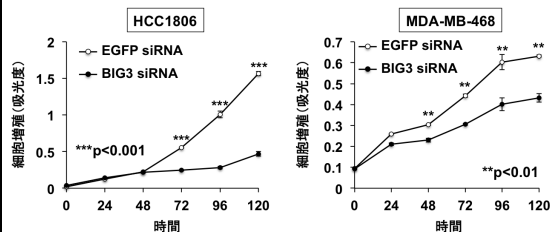


図3. TNBC細胞株の細胞増殖におけるBIG3の関与

そこで我々は、上記の学術的、臨床的背景を踏まえて、TNBC 増悪化における BIG3 の機能解析を行う。この課題に取り組むために、以下のことを明らかにしていく。

- 1) TNBC において BIG3 と結合する新規の相互作用因子を探索する。ヒト TNBC 細胞株中の BIG3 を免疫沈降で分離し、共沈してくる分子群を網羅的に解析する。同定した BIG3 と新規相互作用因子の複合体が TNBC においてどのような機能を有するか、どのような結合様式で相互作用が維持されるか、その分子機構を詳細に解明する。明らかにしたこれらの知見を基にして、TNBC における新しい分子標的治療モデルを構築する。
- 2) TNBC において BIG3 がどのような癌細胞の維持経路に關与しているか網羅的遺伝子発現解析により明らかにする。ヒト TNBC 細胞株中で BIG3 を強制発現させた場合、および RNA 干渉法により BIG3 の発現を抑制した場合に、発現が変化する遺伝子群をマイクロア

レイで網羅的に探索する。変動した遺伝子群がどのような経路に関連した因子かパスイ解析で明らかにし、BIG3 がどのようにその経路の遺伝子発現を制御するか、この経路が TNBC においてどのように癌発症・進展・増悪化に関与するか、分子レベルで詳細に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ER 陰性乳癌における新規 BIG3 相互作用因子の同定

我々は可能性試験として、ヒト TNBC 細胞株 HCC1806 細胞、および HEK293 細胞内で FLAG-BIG3 を恒常的に発現させた細胞株を樹立し、この細胞を用いて抗 FLAG 抗体により FLAG-BIG3 を含む複合体を免疫沈降し、共沈した相互作用因子をショットガンプロテオミクス (2DICAL 法) (*Mol Cell Proteomics* 2006;5:1338-1347) により同定した (国立がん研究センター尾野雅哉博士との共同研究)。その結果、BIG3 と同様に細胞質に局在し、癌発症・進展において多彩な役割を果たす多数の新規 BIG3 相互作用因子候補群が見出された。本計画では初めに、これらの因子群が細胞内で BIG3 と相互作用するのか、遺伝子の cDNA をそれぞれクローニングし、HEK293T 細胞を用いた強制発現系における免疫沈降法で解析する。上記の解析で相互作用が確認された場合、HCC1806 などの TNBC 細胞株における内在性 BIG3 と目的因子の相互作用を、BIG3 抗体による免疫沈降で明らかにする。さらに、免疫沈降に加えて免疫染色により TNBC 細胞株中で BIG3 と細胞内共局在が見られるか解析する。

(2) ER 陰性乳癌発症・進展における新規 BIG3 複合体の役割

上記で見出された新規 BIG3 相互作用因子と BIG3 の複合体が TNBC 発症・進展においてどのような役割を果たすか、それぞれの相互作用因子の今までに知られた機能から類推し、BIG3 複合体が TNBC 発症・進展において予想した役割を果たすのか調べる。TNBC 細胞株において、RNA 干渉法で BIG3 を発現抑制した場合に、相互作用因子の持つ機能を妨げることになるのか、癌細胞の細胞増殖、接着、遊走・浸潤、薬剤耐性などの各機能の観点から MTT アッセイ、コロニー形成試験、遊走・浸潤能試験などの方法により解明する。また、BIG3 と相互作用因子それぞれ発現抑制した場合に細胞の表現型が一致するのか、上記に挙げた各機能を指標に解析する。さらに、これらの相互作用因子の TNBC における発現と悪性度の相関があるか乳癌大規模コホート研究で調べる。

4. 研究成果

本研究では、ER 陰性乳癌発症・進展における BIG3 の未知の機能を明らかにする目的

で、ヒト ER 陰性乳癌細胞株における BIG3 相互作用因子の網羅的探索をショットガンプロテオミクス (2DICAL 法) で試みた。その結果、BIG3 と同様に細胞質に局在し癌発症・進展において多彩な役割を果たす多数の新規 BIG3 相互作用因子が見出され、これらのいくつかの因子は微小管構造の維持・制御に関わる重要な因子であることが分かった。BIG3 とこれらの因子との相互作用および細胞内共局在を、免疫沈降法と免疫染色法で明らかにした。一方、ヒト ER 陰性乳癌細胞株内で BIG3 をノックダウンすると、細胞周期を制御する転写因子 E2F1 の発現抑制が観察され、同時に細胞増殖が抑制された。これらの発見から、BIG3 は微小管制御因子との結合、あるいは細胞周期制御因子の発現制御を介して、ER 陰性乳癌細胞の生存・増殖に関与する可能性が示唆され、今後の詳細な分子機構の解析が望まれる。

< 引用文献 >

Yoshimaru, T. *et al.* Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nat. Commun.* **4**, 2443 (2013).

Kim, J. W. *et al.* Activation of an estrogen/estrogen receptor signaling by BIG3 through its inhibitory effect on nuclear transport of PHB2/REA in breast cancer. *Cancer Sci.* **100**, 1468-1478 (2009).

Nishidate T. *et al.* Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. *Int J Oncol.* **25**, 797-819 (2004).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Miyagawa Y, Matsushita Y, Suzuki H, Komatsu M, Yoshimaru T, Kimura R, Yanai A, Honda J, Tangoku A, Sasa M, Miyoshi Y, Katagiri T. (2018). Frequent downregulation of LRRC26 by epigenetic alterations is involved in the malignant progression of triple-negative breast cancer. *Int J Oncol.* 1539-1558. PMID: 29512727 査読有

[学会発表] (計 5 件)

木村竜一郎, 松尾泰佑, 尾野雅哉, 吉丸哲郎, 小松正人, 本田純子, 朴在賢, 中村祐輔, 笹三徳, 三好康雄, 片桐豊輝
第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年、横浜、ポスター発表)

『ムチン型糖転移酵素 GALNT6 は LGALS3BP の糖鎖修飾を通じて乳癌発症を制御する。』

奥村和正, 松下洋輔, 小松正人, 木村竜一朗, 吉丸哲郎, 尾野雅哉, 三好康雄, 本田純子, 笹三徳, 丹黒章, 片桐豊雅

第76回日本癌学会学術総会(2017年、横浜、口頭発表)

『トリプルネガティブ乳がんの悪性化における RHBDL2 の役割解明』

木村竜一朗, 尾野雅哉, 松尾泰佑, 吉丸哲郎, 三好康雄, 笹三徳, 片桐豊雅

第75回日本癌学会学術総会(2016年、横浜、口頭発表)

『糖転移酵素 GALNT6 はガレクチン結合タンパク質 1 を糖鎖修飾し、乳癌発症を制御する』

奥村和正, 小松正人, 木村竜一朗, 尾野雅哉, 吉丸哲郎, 松下洋輔, 三好康雄, 本田純子, 笹三徳, 丹黒章, 片桐豊雅

第75回日本癌学会学術総会(2016年、横浜、口頭発表)

『トリプルネガティブ乳癌で高発現が認められる TNRHP1 の発現亢進は癌の悪性度と相関する』

瀧亮祐, 吉丸哲郎, 大豆本圭, 松下洋輔, 木村竜一朗, 尾野雅哉, 片桐豊雅

第75回日本癌学会学術総会(2016年、横浜、ポスター発表)

『BIG3-PHB2 相互作用を標的とした前立腺がん治療法の開発の可能性』

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 竜一朗 (KIMURA, Ryuichiro)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 20587323