

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07449

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌における新規核内蛋白ネットワークによる細胞増殖特性

研究課題名(英文) Cell cycle regulation of triple-negative breast cancer by newly-identified nuclear protein network.

研究代表者

笠井 謙次 (Kasai, Kenji)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242857

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)：FAM64A発現量は細胞周期G2/M期に増加していた。一方FAM64A陽性トリプルネガティブ乳癌(TNBC)症例と陰性TNBC症例で有意なKi-67 index差は無いことから、FAM64Aは単なる細胞周期因子ではなく細胞周期の一時期に核内蛋白への特異的作用を有する因子である可能性が考えられた。そこで強制発現系にてFAM64A結合蛋白を回収し質量分析した結果、SWI/SNF因子などが同定され、特異抗体を用いた二重染色では核内に共局在を呈した。以上から、FAM64AはFAM64A陽性TNBCにおいてDNA複製やDNA修復に関わる因子に作用し、TNBCの高い細胞増殖能を支えているものと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では約47%のトリプルネガティブ乳癌(TNBC)に発現している核蛋白FAM64Aから見たTNBCの細胞増殖特性と新規治療戦略のための基盤的知見を得ることを目的とした。FAM64A高発現TNBC細胞株でsiRNA法によりFAM64Aを欠損させると、DNA損傷マーカーH2AXが増加し細胞数が減少した。このことから、FAM64A高発現TNBCではFAM64Aが治療標的になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：FAM64A protein was found to be increased in the G2/M-phase of cell cycle. Knockdown of FAM64A in the TNBC cell lines showed the increase of H2AX and reduced the cell number, indicating FAM64A could be a therapeutic target at least in the FAM64A-positive TNBC cases. Pull-down assay of FAM64A-associated proteins followed by mass analysis identified a member of SWI/SNF factors that play a crucial role of DNA replication and repair. These evidence support the possibility that FAM64A is involved in the proper progression of the cell cycle in FAM64A-positive TNBC.

研究分野：分子病理学

キーワード：乳癌 トリプルネガティブ乳癌 FAM64A DNA修復機構

1. 研究開始当初の背景

乳癌は本邦女性で罹患数の最も多い悪性腫瘍である。実地診療では、乳癌組織のホルモン受容体あるいは HER2 蛋白発現の有無により治療選択がなされている。その中でトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) と呼ばれる一群は、ホルモン受容体陽性乳癌に比し進行が早く、再発例・転移例が多く、予後も不良である。またホルモン療法や HER2 抗体療法の適応外となる TNBC には治療選択が乏しい。その為 TNBC の効果的な治療法確立の為に、新たな分子標的の同定が期待されていた。

これまでの欧米の研究から、TNBC は遺伝子発現状況に基づき 6 種の分子サブタイプに分類可能であることが分かっている。しかし日常臨床においてこれら分子サブタイプを区別するのは困難であり、また必ずしも治療選択に繋がる分子標的と連結していないことから、TNBC の亜分類についても更なる研究が必要であった。

一方本研究代表者は、乳癌の発現遺伝子を比較する過程で、*FAM64A* が TNBC で高発現していることに気付いた。*FAM64A* は核内蛋白であることが報告されていたがその機能は十分解析されておらず、TNBC における *FAM64A* 発現の意義も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では TNBC に発現している核蛋白 *FAM64A* とその結合蛋白から見た、TNBC の細胞増殖特性と新規治療戦略のための基盤的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

愛知医科大学病院にて通常の治療過程で手術され病理組織診断を完了した担癌乳腺組織残余部分のホルマリン固定パラフィンブロックから薄切切片を作成し、市販抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。培養細胞を用いた実験には公的細胞バンクから供与されたヒト乳癌細胞株及び HEK293T を使用した。*FAM64A* 特異的 siRNA 及びコントロール siRNA を委託作成し使用した。またヒト *FAM64A* 等の発現ベクターを作成した。さらにヒト *FAM64A* 発現レンチウイルスは理化学研究所三好博士による plasmid の供与を受け作成した。自動免疫染色装置、遺伝子・蛋白発現解析装置、蛍光顕微鏡、質量分析装置は研究代表者の所属する研究室または学内共同機器部門に設置された装置を使用した。なお担癌乳腺組織の使用及び DNA 組換え実験、レンチウイルス作成・使用実験は、愛知医科大学倫理委員会及び DNA 組換え委員会の承認を受け実施した。

4. 研究成果

200 例の乳癌症例を免疫組織染色した所、*FAM64A* は約 47% の TNBC に発現亢進していた。*FAM64A* 陽性・ホルモン受容体陽性乳癌ではごく少数であった。また *FAM64A* 陽性 TNBC は陰性 TNBC と比べ、Ki67 index が有意に高いとは言えなかった。ヒト TNBC 培養細胞を用いた解析では、*FAM64A* は cyclinA や Geminin と同様の染色パターンを呈したことから、*FAM64A* は細胞周期 G2/M 期に核に集積していることが分かった。TNBC は高頻度に *TP53* 遺伝子の変異を有し、健全な細胞周期制御から逸脱している。その為、TNBC 細胞を double thymidine block 法により細胞周期を一致させて immunoblot 解析を試みたが周期の一致が十分ではなく、明解な結果を得られなかった。

次に TNBC における *FAM64A* 発現の意義を調べるため、*FAM64A* 特異的 siRNA あるいはコントロール siRNA を TNBC 細胞に導入し、細胞数の推移と発現蛋白の変化を解析した。その結果、*FAM64A* ノックダウンにより、細胞数が著減した。細胞数が減少する前に蛋白を抽出し解析した所、*FAM64A* ノックダウンでは DNA 損傷マーカー H2AX 発現が著増していた。このことから、*FAM64A* 高発現 TNBC では *FAM64A* 欠損により、恐らく G2 期の進行が障害され細胞死に陥るものと考えた。また野生型及び変異型 *FAM64A* のレンチウイルスを作成し、これらを安定発現する TNBC 細胞株を樹立した。そこに siRNA を導入し、内在性 *FAM64A* 消失による DNA 損傷反応を回避できるかを検証した。3' 非翻訳領域でデザインした *FAM64A* siRNA では内在性 *FAM64A* 減少が不十分であったこと、さらにレンチウイルス感染によりベースラインの H2AX 発現も上昇したため、確実なレスキュー実験はできなかった。

FAM64A に関わる核内蛋白を同定する為、HEK293T 細胞に HaloTag 標識 *FAM64A* またはコントロール HaloTag を強制発現させ核分画を抽出し、HaloTag リガンドビーズを用いて結合蛋白を回収した。回収検体を SDS-PAGE で泳動後 CBB 染色を行い、HaloTag-*FAM64A* 発現細胞のみに観察されたバンドを切り出し質量分析装置にて解析した。その結果、SWI/SNF 因子や DNA polymerase などが同定された。これら結合候補の一部について Tag 付発現ベクターを作成し、同じく HEK293T で *FAM64A* と強制発現させ免疫沈降を試みた。しかしいずれの候補も明らかな *FAM64A* 結合蛋白として確定できなかった。しかしこれら候補蛋白に対する市販抗体で TNBC 培養細胞を蛍光染色すると、シグナルの一部は内在性 *FAM64A* 蛋白と共局在を呈した。以上から、*FAM64A* あるいは結合候補蛋白は、sumo 化など何等かの翻訳後修飾依存性に一過性の結合を起こす可能性を否定できなかった。

以上から TNBC に *FAM64A* 高発現群が存在すること、*FAM64A* 陽性 TNBC 細胞では *FAM64A* 依存性に細胞周期が進行していること、*FAM64A* は SWI/SNF 因子などの核内因子と結合する可能

性を有することが考えられた。今後は FAM64A 結合候補蛋白の検証が必要であるが、その上で FAM64A-候補蛋白間の結合を評価するアッセイ系を確立できれば、低分子化合物など結合阻害剤のスクリーニングを通じて、FAM64A 陽性 TNBC の新たな治療戦略をデザインできるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito H, Tsunoda T, Riku M, Inaguma S, Inoko A, Murakami H, Ikeda H, Matsuda M, Kasai K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Indispensable role of STIL in the regulation of cancer cell motility through the lamellipodial accumulation of ARHGEF7-PAK1 complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1931-1943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-1115-9.	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 -

1. 著者名 Takumi Tsunoda, Miho Riku, Norika Yamada, Hikaru Tsuchiya, Takuya Tomita, Minako Suzuki, Mari Kizuki, Akihito Inoko, Hideaki Ito, Kenta Murotani, Hideki Murakami, Yasushi Saeki, Kenji Kasai	4. 巻 23
2. 論文標題 ENTREP/FAM189A2 encodes a new ITCH ubiquitin ligase activator that is downregulated in breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e51182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202051182	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井戸美来、坂野福奈、伊藤由季絵、後藤真奈美、安藤考人、毛利有佳子、高坂絢子、藤井公人、笠井謙次、中野正吾
2. 発表標題 網羅的遺伝子解析から着目した遺伝子産物FAM64Aの乳癌における臨床病理的解析
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知医科大学医学部病理学講座 webページ
<https://amu-pathology.org/index.html>
愛知医科大学 webページ
<https://www.aichi-med-u.ac.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------