

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07640

研究課題名(和文) 乳がんの治療薬抵抗性獲得機構におけるNFYAの機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the NFYA function in the acquisition of resistance to therapeutic drugs in breast cancer

研究代表者

岡田 宣宏 (OKADA, Nobuhiro)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・助教

研究者番号：60742377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳がんは、ホルモン受容体陰性であるため内分泌療法に抵抗性を持ち、未だ有効な治療法が確立されていない。そのため、予後が極めて悪く、新規治療法の開発や治療のための分子標的の特定が急務となっている。我々は、NFYAが脂肪酸合成を促進することにより、トリプルネガティブ乳がんの悪性挙動を促進していることを明らかにした。さらに、NFYAの阻害が脂質代謝低下を介し、乳がんの発生および進展を抑制することを明らかにした。この研究により、NFYAがトリプルネガティブ乳がんの治療標的となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、脂質合成経路がトリプルネガティブ乳がん治療標的候補として検討されてきた。しかし、脂質合成の阻害が有効な患者の選択、薬剤耐性などについては不明な点が多い。さらに重大な課題が、治療標的としての安全性である。本研究により我々は、NFYAの発現パターンが脂質合成阻害の有効性を見分けるマーカーとして有用であり、さらに、NFYAが他の脂質合成酵素の阻害よりも、安全に同程度の効果を得ることを明らかにした。これらの結果は、今後のトリプルネガティブ乳がん治療薬開発において極めて重要な知見であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Triple-negative breast cancer (TNBC) is not sensitive to endocrine therapy and has no identified molecular targets, resulting in an overall poor prognosis. Therefore, there is an urgent need to identify molecular targets for therapy and to develop new treatment regimens. We have shown that NFYA enhances the malignant behavior of TNBC by enhancing lipogenesis. Moreover, we found that inhibition of NFYA suppresses breast cancer development and progression via decreased lipid metabolism. This study demonstrates that NFYA may be a potential therapeutic target for TNBC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん 脂質代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳腺組織は、Luminal 細胞と Basal 細胞からなる 2 層構造を形成する 2 種の細胞系譜を有している。一般的に、Luminal 細胞系譜のがん細胞はホルモン受容体陽性細胞であり、ホルモン依存的に増殖するため、ホルモンの作用を阻害する内分泌療法により劇的な治療効果が得られている。しかし、Basal 細胞系譜のがん細胞はトリプルネガティブ乳がんと呼ばれ、ホルモン受容体陰性細胞であるため、内分泌療法が効かず、有効な治療法が存在しない。多くの乳がんは、Luminal 細胞から発生し、悪性化進展過程で Luminal、Basal 両細胞系譜が混在するがん組織を形成する (Van Keymeulen *et al.*, *Nature* 2015; Koren *et al.*, *Nature* 2015)。このことは、Luminal から Basal への細胞系譜転換により、乳がんは治療薬抵抗性を獲得することを示唆している。しかし、乳がんが悪性化進展過程で細胞系譜転換を起こすメカニズムは明らかになっていない。

申請者はこれまでに、Luminal、Basal 細胞間で 2 種のスプライシングバリエーションの発現をスイッチさせている遺伝子 *NFYA* を同定し、以下の機能を明らかにした。*NFYA* short-form は、細胞系譜転換を開始させる『スターター』として機能し、Luminal 細胞を Luminal-Basal 中間細胞に転換させる。その後、*NFYA* long-form が、細胞系譜転換を促進させる『ブースター』として機能し、Luminal-Basal 中間細胞を Basal 細胞に転換させ、細胞系譜転換を完了させる。しかし、これらはヒト乳がん細胞株を用いて明らかにした結果であり、生体内での自発性乳がんにおいて *NFYA* が細胞系譜転換を誘導し、治療薬抵抗性獲得を制御しているかどうかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、乳がん悪性化進展過程において *NFYA* が細胞系譜転換を制御していることを *in vivo* マウスモデルを用いて確認し、その制御機構を明らかにすることを目的とする。さらに、治療薬抵抗性を獲得した乳がんにおいて、*NFYA* および *NFYA* が制御する因子・パスウェイの阻害による治療効果を検討することで、効果的な乳がん治療の基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) *NFYA* による脂質代謝経路への影響

これまでに我々は、トリプルネガティブ乳がん (TNBC) において、主に *NFYAv1* (長鎖型バリエーション) が細胞増殖や腫瘍形成能を制御していることを明らかにしてきた。そこでまず、*NFYAv1* によるトリプルネガティブ乳がん悪性化挙動制御機構の解析を行なった。

大腸がん、肝がん、肺がんを含むがん細胞株におけるグローバルな遺伝子発現を解析した研究では、NF-Y 複合体が SREBPs とともに脂質合成を制御していることが示唆されている (Benatti *et al.*, *Oncotarget* 2016; Reed *et al.*, *Plos Genet.* 2008)。さらに我々は、乳がん細胞において、脂質合成酵素である *ACLY*、*ACACA*、*FASN* の発現が増加し、*FASN* 阻害剤である *Cerulenin* による脂質合成阻害が TNBC 細胞の増殖および腫瘍形成能を完全に阻害することを示した。これらの知見から、*NFYAv1* は脂質合成制御を通じて TNBC の悪性化挙動に本質的に関与しているのではないかと考え、*NFYA* 欠損 TNBC 細胞を用いて悪性化挙動への脂質合成の影響を検討した。

(2) *NFYA* による脂質代謝制御機構の解析

NFYA が脂質合成制御を介し、TNBC の悪性化挙動を促進することを踏まえ、次に、*NFYA* による脂質合成経路の制御メカニズムの解析を行なった。脂質代謝は脂質合成および脂肪酸酸化からなり、複数の酵素が関与する連続した酵素反応により構成されている。そこで、我々は、これら脂質代謝関連酵素の遺伝子発現が *NFYA* により制御されているのか解析した。

(3) *in vivo* マウスモデルにおける *NFYA*-脂質代謝の機能解析

NFYAv1 による脂質代謝制御が生体内においても乳がん腫瘍形成に関与しているかを調べるために、*NFYAv1* ノックアウトマウスを作製し、乳がんモデルマウス *MMTV-PyMT* マウスと掛け合わせることで、自然発症乳がんにおける *NFYAv1* の機能の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) *NFYA* による脂質代謝経路への影響

NFYA 欠損 TNBC 細胞では、細胞増殖および腫瘍形成能が抑制されていることはすでに報告している。今回、その細胞への脂質添加が、細胞増殖および腫瘍形成能を回復させることを明らかにした。さらに、*NFYA* 欠損細胞において、細胞内の脂肪滴の数が劇的に減少していることも明らかにした。これらの結果は、*NFYA* が TNBC の悪性化挙動に関わる脂質合成を正に制御しており、*NFYA* の欠損はその機構を破壊していることを示唆している。これらの表現型は、ミトコンドリアにおける酸素消費量 (oxygen consumption rate : OCR) を調べることによって実証された。

通常状態の TNBC 細胞は、パルミチン酸を添加することで基礎的な OCR が上昇した。一方、NFYA 欠損 TNBC 細胞は、パルミチン酸を添加しても基礎的な OCR のレベルに差がなかった。さらに、最大呼吸条件において、パルミチン酸を添加した NFYA 欠損 TNBC 細胞の最大 OCR は、NFYA 野生型 TNBC 細胞と比較して、非常に低い OCR を示していた。これらの結果から、NFYA 欠損細胞では脂肪酸酸化 (Fatty Acid Oxidation : FAO) が起こらず、最大呼吸条件下でも表層レベルに保たれていることが示唆された。最後に、NFYA 欠損細胞における脂質添加による悪性化挙動の回復が、実際に FAO を介した反応であることを裏付けるために、FAO の重要な律速酵素である CPT1A の阻害剤 Etomoxir による処理で細胞増殖を評価した。その結果、CPT1A を阻害すると、脂質添加の効果が完全に消失することを明らかにした。これらの結果は、NFYA が脂質合成を促進し、合成された脂質を用いた脂肪酸酸化により得られるエネルギーが TNBC の悪性化挙動に重要であることを示している。

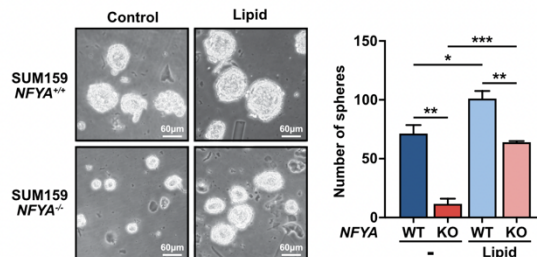


Fig.1 NFYA欠損によるスフィア形成能の低下および脂質添加によるスフィア形成能の回復

(2) NFYA による脂質代謝制御機構の解析

NFYA 欠損 TNBC 細胞を用い、脂質代謝関連酵素の発現を解析した結果、NFYA 欠損細胞で脂質合成酵素である ACACA と FASN の発現が著しく低下していた。また、同様に、脂肪酸酸化関連遺伝子である CPT1A および ACADL の発現が低下していた。NFYA 欠損細胞における脂質の添加は、発現が減少していた CPT1A および ACADL の発現を回復させた。これらの結果は、NFYA が脂質合成酵素 ACACA および FASN の発現を制御することにより脂質合成を低下させ、細胞内における脂質の低下に伴い、脂肪酸酸化関連遺伝子 CPT1A および ACADL の発現が低下していることを示している。

さらに、NFYA が ACACA と FASN のプロモーター領域に直接結合して転写調節を行っているかどうかを、免疫沈降検証抗体を用いた CUT&RUN アッセイにより調べた。その結果、NFYA が ACACA および FASN の上流プロモーター領域に直接結合していることを明らかにした。興味深いことに、脂質の添加により、NFYA のプロモーター領域への結合が完全に消失した。さらに、NFYA 欠損 TNBC 細胞で NFYA^{v1} を過剰発現させると、FASN、ACACA および CPT1A の発現が上昇することから、NFYA^{v1} が FASN および ACACA の転写調節を介して脂質代謝を調節していることが裏付けられた。これらの結果は、NFYA による ACACA および FASN の発現制御は、それらのプロモーター領域への直接結合によって行われること、さらに、過剰な脂質の存在下では、NFYA のプロモーター領域への結合が消失し、それにより、ACACA および FASN の発現低下を通して脂質合成が制御されることを示すものであった。

(3) in vivo マウスモデルにおける NFYA-脂質代謝の機能解析

これまでの研究により、NFYA 完全ノックアウトマウスは発生初期に胎生致死を引き起こすことが報告されている。また、脂質合成酵素 ACLY、ACACA、FASN のノックアウトマウスも同様に、発生初期に胎生致死を引き起こすことが報告されている。そのため、NFYA^{v1} ノックアウトマウスも胎生致死を示すことが予想された。しかし、意外なことに、NFYA^{v1} ノックアウトマウスは正常なメンデル比で生まれ、乳腺の形態に異常は確認されず、早期での疾患も確認されなかった。これらの結果は、NFYA^{v1} 阻害が、脂質合成酵素を阻害することによる脂質生成阻害よりも安全な治療的である可能性を示唆している。

NFYA^{v1} の乳腺腫瘍化に対する影響を調べるために、広く乳がん研究に用いられている MMTV-PyMT マウスをベースに、Nfyav1^{-/-} マウスを交配した遺伝子改変乳がんモデルマウスを作製した。MMTV-PyMT; Nfyav1^{+/+} マウスでは、早ければ 41 日に乳腺腫瘍が発生し、74 日目には 50% のマウスに腫瘍が発生した。一方、MMTV-PyMT; Nfyav1^{-/-} マウスでは、最初の腫瘍は 71 日目に確認され、91 日目までに 50% のマウスが腫瘍を発症した。腫瘍発生の遅延と同様に、15 週目での乳がん組織を解析した結果、MMTV-PyMT; Nfyav1^{-/-} マウスの腫瘍面積が、MMTV-PyMT; Nfyav1^{+/+} マウスの 29.6% に減少していた。さらに、腫瘍組織における ACAC および FASN 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、MMTV-PyMT; Nfyav1^{+/+} マウスでこれらの遺伝子が高発現していることが確認された。一方、MMTV-PyMT; Nfyav1^{-/-} マウスの腫瘍組織では、ACACA と FASN の発現が著しく減少していた。さらに、これらのマウスから乳がん細胞を分離し、これらの遺伝子の発現をウエスタンブロットで解析した結果、免疫組織化学的解析と同様に、Nfyav1^{-/-} 乳がん組織から分離した細胞では、ACACA と FASN の発現が減少していることがわかった。これらの結果は、Nfyav1 の欠損が生体内で ACACA や FASN の発現を抑制することにより、乳がん腫瘍形成を抑制するこ

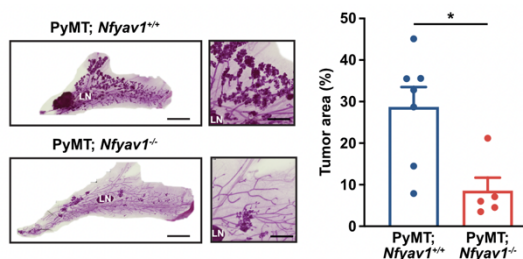


Fig.2 NFYA^{v1}欠損は乳がん発症を遅延させる。

とを示しており、NFYA ν 1 阻害が TNBC 治療標的としてより安全で有力な候補であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Nobuhiro Okada, Chihiro Ueki, Masahiro Shimazaki, Goki Tsujimoto, Susumu Kohno, Hayato Muranaka, Kiyotsugu Yoshikawa, Chiaki Takahashi	4. 巻 -
2. 論文標題 NFYA promotes the malignant behavior of triple-negative breast cancer through the regulation of lipid metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.05.26.493660	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chihiro Ueki, Goki Tsujimoto, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi, Nobuhiro Okada
2. 発表標題 Impact of fatty acid metabolism regulated by NFYA on malignant progression of TNBCs
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rin Ito, Goki Tsujimoto, Chihiro Ueki, Nobuhiro Okada
2. 発表標題 Metabolic stress induction and antitumor effects of gluconeogenesis induced by NFYA
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuhiro Okada, Goki Tsujimoto, Kiyotsugu Yoshikawa, Chiaki Takahashi
2. 発表標題 NFYA splicing variant regulates the malignant progression of breast cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goki Tsujimoto, Chiaki Takahashi, Nobuhiro Okada
2. 発表標題 Antitumor effect of gluconeogenesis induced by NFYA
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Ueki, Goki Tsujimoto, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi, Nobuhiro Okada
2. 発表標題 Impact of fatty acid synthesis regulated by NFYA on malignant progression of breast cancer
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田宣宏、辻本剛己、村中勇人、高橋智聡
2. 発表標題 NFYA regulates the acquisition of drug resistance in breast cancer
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻本剛己、高橋智聡、岡田宣宏
2. 発表標題 NFYAによる糖新生促進が引き起こす腫瘍抑制効果の検討
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Okada, Hayato Muranaka, Kiyotsugu Yoshikawa, Chiaki Takahashi
2. 発表標題 NFYA regulates the acquisition of drug resistance in breast cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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