

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16754

研究課題名(和文) 乳癌内線維芽細胞におけるRunx3の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Runx3 in fibroblasts within breast cancer

研究代表者

大久保 捷奇 (okubo, shoki)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：20827878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌微小環境中に多く存在する癌内線維芽細胞(CAFs)は近傍の乳癌細胞に作用し癌悪性を促進するがその分子機構は十分に理解されていない。本研究では、CAFsの癌促進能におけるRunx3の役割を解析する為、ヒト乳癌由来CAFsにRUNX3-shRNAを導入した。CAFsにおけるRUNX3の発現低下は免疫不全マウスに共移植されたヒト乳癌細胞の増殖を有意に抑制することが示唆された。今後はRUNX3の発現抑制によるCAFsの癌促進能の低下がTGF- $\beta$ -Smad2/3 およびWnt- $\beta$ -cateninシグナルの低下に起因するか否か調査する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAFsがどのように癌促進能を維持しているのかは不明な点が多い。本研究はCAFsでTGF- $\beta$ オートクラインシグナルを媒介する遺伝子群を明らかにし、RUNX3がどのようにTGF- $\beta$ やWnt- $\beta$ -cateninシグナルの活性化に寄与するかを明らかにして、将来のCAFsを標的とした新規癌治療法の開発に役立てることを目的としている

研究成果の概要(英文)：CAF, which are abundant in the cancer microenvironment, act on nearby breast cancer cells to promote malignant transformation of cancer, but their molecular mechanism is not fully understood. In this study, RUNX3-shRNA was introduced into human breast cancer-derived CAFs in order to analyze the role of Runx3 in the cancer-promoting ability of CAFs. It was suggested that the decreased expression of RUNX3 in CAFs significantly suppressed the proliferation of human breast cancer cells co-transplanted in immunodeficient mice. In the future, we plan to investigate whether the decrease in the cancer-promoting ability of CAFs due to the suppression of RUNX3 expression is due to the decrease in TGF- $\beta$ -Smad2 / 3 and Wnt- $\beta$ -catenin signals.

研究分野：消化器内科

キーワード：RUNX3 乳癌 癌微小環境 CAFs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌微小環境が様々な癌細胞の特徴に影響を及ぼし癌悪性化に寄与することが近年明らかになってきている。研究代表者らは、癌微小環境中に多く存在する癌内線維芽細胞(CAFs: carcinoma-associated fibroblasts)に焦点をあてて癌微小環境の研究を進めている。そしてCAFsが近傍の乳癌細胞に作用し、癌血管新生や癌細胞の増殖・浸潤・転移を促進することを見出した。また、申請者らは、CAFsが活性化したTGF-βリガンドを産生することにより、オートクラインの機構でTGF-β-Smad2/3シグナルを活性化することを明らかにした(Kojima, Y., et al., PNAS., 107, 20009-20014, 2010)。

癌微小環境におけるTGF-βシグナルの亢進が近傍の癌細胞の浸潤や転移を促進し、患者予後不良に相関していることが多くの研究により示唆されている。

最近、研究代表者は乳癌由来CAFsにおいてSmad2/3結合蛋白であるRunt-related transcription factor 3 (Runx3)が高発現していることを、DNAマイクロアレイ解析にて見出した。また他者よりの患者乳癌CAFsのpublicオミックスデータにおいても、Runx3の発現上昇が観察された。Runx3は、DNA結合性のRunt転写因子ファミリーに属し、免疫、炎症や癌化に寄与していることが報告されている(Ito Y., Nat Rev Cancer., 2015, 15, 81-95)。Runx3は胃がんを含めた複数の癌で発現が抑制されていることより、癌抑制遺伝子であると思われるが、数種類の癌では癌促進的に働くことも示され、Runx3の癌化に関する機能はコンテキスト依存性であると考えられている。一方、癌間質におけるRunx3の機能は知られていない。また、Runx3はSmad2/3に結合し、TGF-β-Smad2/3シグナルを活性化することおよびβ-cateninに結合してWnt-β-cateninシグナルを制御することが知られている。

研究代表者は、癌微小環境に豊富に存在するCAFsが癌進展過程で、癌促進能を獲得し維持する事を示してきた。CAFsの癌促進能は近傍の癌細胞との継続的な接触無しに、安定的に維持されている。さらに申請者は、gene set enrichment解析により、対照の正常乳腺線維芽細胞と比較して、CAFsはTGF-βおよびWntシグナルを活性化していることを明らかにした。

また、CAFsにおいてTGF-βのリガンドであるTGF-β1やTGF-β2およびWntリガンドであるWnt-2, Wnt-10BやWnt-11の発現亢進が観察された。

以上の知見より、CAFsではTGF-β-Smad2/3およびWnt-β-cateninシグナルがオートクラインの様式で活性化していることおよびRunx3がこの2つのシグナルの活性化を橋渡ししている可能性を推測している。さらにCAFsの癌促進作用の維持にこれらのRunx3を介したTGF-βやWntオートクラインシグナルの活性化が必須であると想像される

### 2. 研究の目的

CAFsにおけるTGF-βシグナルの重要性は認知されているが、現在までCAFsにおけるTGF-βオートクラインシグナルを媒介する遺伝子に関する報告は極めて限られている(Mezawa, Y. et al., Cell Tissue Res, 365, 675-89, 2016)。またCAFsにおけるWnt-β-cateninシグナルやRunx3の発現様式や機能についての報告もない。

本研究は研究代表者の先行研究よりの独創的なアイデアに起因しており、用いられる細胞や実験系も独自性の高い。本研究はCAFsでTGF-βオートクラインシグナルを媒介する遺伝子群を明らかにし、CAFsを標的にした新規癌治療法の開発に役立てることを目的としている。

### 3. 研究の方法

研究代表者はCAFsではTGF-β-Smad2/3シグナルに関与する遺伝子の発現が恒常的に変化し、TGF-βオートクラインシグナル活性化を可能にしていると推測している。本研究ではこの仮説を証明するため、Smad2/3の結合蛋白であるRunx3およびWnt-β-cateninシグナルに焦点をあてて、以下の手順でCAFsの活性化および癌促進能の維持機構に関して調査し、新規癌間質治療の発展に役立てる。

(1) Runx3がCAFsのTGF-βオートクラインシグナルの維持に必須であるか否か検討する。

研究代表者らが樹立した乳癌由来CAFsにおいてTGF-βシグナルおよびWntシグナルの標的遺伝子がenrichされていることがgene set enrichment解析にて見出された。また、Smad2/3結合性の転写活性化因子として知られているRunx3 mRNAの発現がCAFsで約80倍亢進していることが示唆された。本研究では、RUNX3蛋白に対する抗体を使用したimmunoblotおよび免疫組織染色において、CAFsにおけるRunx3蛋白の発現を検討する。また、CAFsにRunx3-shRNA

を導入し、リン酸化 Smad2/3 や活性化 $\beta$ -catenin の発現を immunoblot で調査する。また Runx3-shRNA が導入された CAFs とヒト乳癌細胞を免疫不全マウスに移植に同所移植し、原発巣および肺転移巣の程度を対照の GFP-shRNA が導入された CAFs 群と比較する。申請者は Runx3 が Smad2/3 に結合し、TGF- $\beta$ シグナルを活性化し、CAFs の癌促進能の維持に必須であると推測している。

(2) CAFs における Wnt- $\beta$ -catenin シグナルと Runx3 の関与に関して検討する。

CAFs において Wnt シグナルの標的遺伝子が enrich していることより、本研究では、Wnt- $\beta$ -catenin シグナルが活性化しているか否かを検討する。活性化 $\beta$ -catenin 抗体を用いた Western blot 解析およびルシフェラーゼレポーターTOP-FLASH アッセイを施行する。

#### 4. 研究成果

癌促進性癌微小環境の形成が癌性の進展に極めて重要であることが認知されている。しかしながらその分子機構は十分に理解されていない。申請者らは、これまでの研究で、癌微小環境中に多く存在する CAFs が近傍の乳癌細胞に作用し癌性を促進すること、さらに CAFs における TGF- $\beta$  オートクラインシグナルの活性化が癌促進性 CAFs の表現型の維持に重要であることを明らかにしてきた。また最近の申請者らの先行研究より、乳癌由来 CAFs において receptor-regulated Smad (R-Smad) 結合蛋白である Runx3 および Wnt- $\beta$ -catenin シグナルが亢進していることが明らかになった。本研究では、Runx3 が TGF- $\beta$  および Wnt- $\beta$ -catenin シグナルのクロストークに寄与し、CAFs の癌促進能を媒介している可能性を調査した。さらに CAFs における Runx3 発現を標的とした新規癌治療の開発の基礎の構築を目指した。

CAFs では TGF- $\beta$ -Smad2/3 および Wnt- $\beta$ -catenin シグナルがオートクラインの様式で活性化していることおよび Runx3 がこの 2 つのシグナルの活性化を橋渡ししている可能性を調査する為に Runx3-shRNA を作製した。RUNX3-shRNA の導入による乳癌由来 CAFs における RUNX3 の発現低下は免疫不全マウスに共移植されたヒト乳癌細胞の増殖を有意に抑制することが示唆された。今後は RUNX3 の発現抑制による CAFs の癌促進能の低下が TGF- $\beta$ -Smad2/3 および Wnt- $\beta$ -catenin シグナルの低下に起因するか否か調査する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okubo H, Ando H, Ishizuka K, Kitagawa R, Okubo S, Saito H, Kokubu S, Miyazaki A, Ikejima K, Shiina S, Nagahara A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Carnitine insufficiency is associated with fatigue during lenvatinib treatment in patients with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0229772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229772.	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 Takeda T, Asaoka D, Nojiri S, Nishiyama M, Ikeda A, Yatagai N, Ishizuka K, Hiromoto T, Okubo S, Suzuki M, Nakajima A, Nakatsu Y, Komori H, Akazawa Y, Nakagawa Y, Izumi K, Matsumoto K, Ueyama H, Sasaki H, Shimada Y, Matsumoto K, Osada T, Hojo M, Kato M, Nagahara A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Linked Color Imaging and the Kyoto Classification of Gastritis: Evaluation of Visibility and Inter-Rater Reliability.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000501534.	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 Takeda T, Nagahara A, Ishizuka K, Okubo S, Haga K, Suzuki M, Nakajima A, Komori H, Akazawa Y, Izumi K, Matsumoto K, Ueyama H, Shimada Y, Matsumoto K, Asaoka D, Shibuya T, Sakamoto N, Osada T, Hojo M, Nojiri S, Watanabe S.	4. 巻 97
2. 論文標題 Improved Visibility of Barrett's Esophagus with Linked Color Imaging: Inter- and Intra-Rater Reliability and Quantitative Analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion.	6. 最初と最後の頁 183-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000485459.	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 Takeda T, Asaoka D, Tajima Y, Matsumoto K, Takeda N, Hiromoto T, Okubo S, Saito H, Aoyama T, Shibuya T, Sakamoto N, Hojo M, Osada T, Nagahara A, Yao T, Watanabe S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hemorrhagic polyps formed like fundic gland polyps during long-term proton pump inhibitor administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 478-484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-017-0756-x.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------