

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34311

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23811

研究課題名(和文) アリル炭化水素受容体(AhR)アゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制機構の解明

研究課題名(英文) The inhibition of mammosphere formation by aryl hydrocarbon receptor agonists

研究代表者

山下 直哉(Yamashita, Naoya)

同志社女子大学・薬学部・特別任用助教

研究者番号：50846649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、受容体型転写因子であるアリル炭化水素受容体(AhR)のアゴニストが、乳がん腫瘍様塊の形成を顕著に抑制することが報告された。しかし、その詳細な分子機構については未だ不明である。本申請課題では、AhRアゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制には、AhRにより調節される何らかの遺伝子の発現変動が重要であると仮定し、網羅的な遺伝子の発現変動を解析した。その結果、AhRアゴニストにより細胞周期の調節に重要なcell division cycle 20(CDC20)がAhR依存的に減少することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの罹患者数および死亡者数は、増加の一途をたどっていることから、これまでにない乳がん治療薬が社会的に求められている。本申請課題では、これまでに未解明であったAhRアゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制機構の一端を明らかにした。本研究成果は、AhRを標的とした新たな乳がん治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor. Recently, it has been reported that AhR agonists suppressed mammosphere formation in breast cancer cells. However, the inhibition mechanism is still unknown. To identify the inhibition of mammosphere formation by AhR agonists, RNA-sequencing (RNA-seq) experiments were performed. RNA-seq experiment revealed that cell division cycle 20 (CDC20), a regulator of cell cycle checkpoints, was decreased by AhR agonist in breast cancer cell line.

研究分野：衛生薬学

キーワード：アリル炭化水素受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界における女性の乳がん罹患者数および死亡者数は、増加の一途をたどっていることから、新たな治療薬が社会的に求められている。アリル炭化水素受容体 (AhR) は、リガンド (アゴニスト) が結合すると細胞質から核内に移行し、AhR translocator とヘテロダイマーを形成した後、DNA 上の AhR 応答配列に結合することで、標的遺伝子の発現を調節する受容体型転写因子である。AhR は、環境毒性化学物質であるダイオキシン類や多環芳香族炭化水素類を認識し、活性化することから、それら化学物質の毒性発現に深く関与することがこれまでに明らかになっている。しかし一方で、AhR は細胞増殖や組織の発達、免疫等に深く関与し、生体内の恒常性の維持にも重要であることが報告されている。

近年、AhR のアゴニストによって、ヒト乳がん細胞株由来の腫瘍様塊の形成が顕著に抑制されることが報告されている。これらの研究は、AhR アゴニストが、乳がんの新たな治療薬になることを示唆している。しかし、AhR アゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制機構については未だ不明な点も多く、AhR アゴニストの臨床応用を目指す上で、その分子機構を明らかにすることは必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、AhR アゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制機構を明らかにし、AhR を標的とした治療薬開発の基盤を構築することを目的とする。AhR は、受容体型転写因子であるため、AhR アゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制には、AhR により調節される何らかの遺伝子の発現変動が重要であることが推測される。また、AhR の外因性アゴニストは、内因性アゴニストよりも、腫瘍様塊の形成抑制作用が強いことも示されている。そこで、外因性および内因性の AhR アゴニストによる網羅的な遺伝子の発現変動を解析し、乳がん腫瘍様塊の形成抑制に関与する遺伝子の同定を行う。

### 3. 研究の方法

乳がん腫瘍様塊の培養には、調製した MammoCult Medium (STEMCELL Technologies Inc.) および超低吸着プレート (Corning Inc.) を用いた。乳がん腫瘍様塊における total RNA を FastGene RNA Premium Kit (NIPPON Genetics) により抽出し、RNA シークエンス (RNA-Seq) を受託解析 (Kurabo) にて行い、AhR アゴニストによる網羅的な遺伝子の発現変動を検討した。接着培養条件下における total RNA の抽出には ISOGEN II (Nippon Gene Co. Ltd.)、cDNA の合成には、ExScript RT reagent kit (TAKARA Bio Inc.)、リアルタイム PCR には、TB Green Premix Ex Taq II (TAKARA Bio Inc.) を用いた。タンパク質発現量は、ウエスタンブロット法により評価した。

### 4. 研究成果

初めに、AhR アゴニストによる AhR 依存的な遺伝子の発現変動を同定するために、AhR ノックアウト乳がん細胞株 (MCF-7 AhR KO) から、テトラサイクリン (Tet) 処理により、人為的に AhR を発現させることができる細胞株 (KOTR-AhR) を樹立した。次に、外因性 AhR アゴニストとして 3-methylcholanthrene (3MC)、内因性 AhR アゴニストとして indirubin を用いて、それら AhR アゴニストによる乳がん腫瘍様塊形成への影響を検討した。その結果、Tet および 3MC の共処理群では、顕著な乳がん腫瘍様塊の形成抑制作用が認められた。しかし、Tet および indirubin の共処理群や各々の単独処理では、乳がん腫瘍様塊の形成抑制作用は非常に弱い、もしくは、全く認められなかった。また、Tet 処理下における 3MC および indirubin 処理は、AhR の代表的な標的遺伝子である *cytochrome P450 (CYP) 1A1* を誘導した。以上のことから、3MC および indirubin は、どちらも AhR を活性化させるが、活性化した AhR による遺伝子の発現調節機構が異なり、その結果、乳がん腫瘍様塊の形成抑制作用の相違が引き起こされると推測した。

次に、3MC および indirubin による乳がん腫瘍様塊の形成抑制作用の相違に関連する遺伝子を明らかにするために、乳がん腫瘍様塊における total RNA を抽出し、RNA-seq により網羅的な遺伝子の発現変動を解析した。その結果、Tet および 3MC の共処理群のみによって、発現が減少している遺伝子群を同定した。さらに、それら遺伝子群の中でも、正常部位と比較し、がん腫瘍で発現が増加している遺伝子群を学術論文等により検索した。その結果、本研究では、後期促進複合体 (APC/C) の活性化因子で、細胞周期の調節に重要な *cell division cycle 20 (CDC20)* 遺伝子を候補遺伝子とした。CDC20 は、乳がんを含む多くのがん腫瘍で発現が増加しており、近年、前立腺がん幹細胞やグリオーマ幹細胞の自己複製の維持にも深く関与していることが報告されている。以上のことから、CDC20 を標的とした治療薬の開発が注目されている。これらの知見を基に、AhR の活性化による乳がん腫瘍様塊の形成抑制には、CDC20 の発現減少が関与すると仮定し、さらなる検討を行った。

初めに、乳がん腫瘍様塊における CDC20 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により検討した。その結果、RNA シークエンスの結果と同様に、Tet および 3MC 処理群でのみ減少が認められ、Tet および indirubin の共処理群や各々の単独処理では、減少が認められなかった。また、接着培養条件下における野生型 MCF-7 細胞においても、CDC20 の遺伝子発現は、3MC 処理によ

り減少したが、indirubin 処理では減少しなかった。さらに、CDC20 のタンパク質発現も 3MC 処理によって減少した。

乳がん腫瘍様塊の形成における CDC20 の関与を明らかにするために、siRNA による CDC20 の発現抑制実験を行った。CDC20 の mRNA およびタンパク質の発現は、CDC20 を標的とした siRNA により減少することを確認した。次に、siRNA により CDC20 の発現を抑制した細胞を用いて、乳がん腫瘍様塊の形成を評価した。その結果、CDC20 の発現抑制は、乳がん腫瘍様塊の形成を抑制することが示された。これらの研究成果より、3MC によって活性化した AhR は、CDC20 の発現を減少させることで乳がん腫瘍様塊の形成を抑制することが考えられた。

本研究は、これまでに未解明であった AhR アゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制機構の一端を明らかにした研究である。今後、活性化した AhR による CDC20 の発現抑制機構の詳細な検討を行い、AhR を標的としたがん治療薬の開発に向けた基盤を構築することを目標とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamashita Naoya, Kanno Yuichiro, Yoshikawa Minami, Ozawa Moeno, Sanada Noriko, Nemoto Kiyomitsu, Kizu Ryoichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP3A5 gene expression via aryl hydrocarbon receptor in HepG2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 25 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.46.25	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下 直哉、菅野 裕一朗、眞田 法子、根本 清光、木津 良一
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞株におけるアリル炭化水素受容体によるヒト上皮成長因子受容体ファミリーの遺伝子発現制御
3. 学会等名 フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 直哉、菅野 裕一朗、眞田 法子、根本 清光、木津 良一
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞株由来の腫瘍様塊形成に対するAhRアゴニストの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 伊藤 夏帆、山下 直哉、眞田 法子、菅野 裕一朗、根本 清光、木津 良一
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳がんにおける芳香族炭化水素受容体（AhR）によるPD-L1発現制御機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山下 直哉、菅野 裕一朗、眞田 法子、根本 清光、木津 良一
2. 発表標題 ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 における芳香族炭化水素受容体 (AhR) ノックアウト細胞株の樹立と応用
3. 学会等名 第2回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2019年～2020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