

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07347

研究課題名(和文) Txnipを応用した乳癌層別診断法の開発とRNA制御機構の解明

研究課題名(英文) Development of stratified diagnostic method of breast cancer and elucidation of the regulatory mechanism of RNA based on Txnip research

研究代表者

増谷 弘 (Masutani, Hiroshi)

天理医療大学・医療学部・教授

研究者番号：50252523

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)：一部のtriple negativeタイプ乳癌で、癌抑制因子thioredoxin interacting protein (Txnip)が細胞膜周辺に局在する知見を得た。Txnipと相互作用する分子の同定のため、近接依存性相互作用解析法を導入した。一方、Txnipにより発現誘導されるRNAとして、DNAメチル化酵素、BRCA1複合体構成因子などを同定した。また、Mixed lineage leukemia (MLL)白血病細胞株でTxnipが増殖抑制とオートファジーを誘導し、Bcl-2、Bcl-xL阻害剤ABT263 (Navitoclax)による細胞死を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌のサブタイプの中で治療抵抗性であるtriple negativeタイプを積極的に診断する指標はなく、的確な治療法選択のために、適切な層別指標の開発が望まれている。今回、細胞膜付近にTxnipと相互作用するアンカー因子の存在が示唆された。また、Txnip過剰発現により発現誘導される因子を同定した。これらの因子は、Txnipの発癌抑制機構を明らかにし、乳癌の層別診断法、治療法の開発に資すると考えられる。さらに、Txnipによる増殖制御やオートファジー制御分子機構の解明が難治性のMixed lineage leukemia (MLL) 急性骨髄性白血病の治療に応用できる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of thioredoxin interacting protein (Txnip) in breast cancer tissues in collaboration with Tenri Hospital. We showed that Txnip localizes in the membrane-associated region in some triple negative type breast cancer tissues. We are analyzing Txnip anchoring molecules by proximity labeling. We identified Txnip-induced several important signal regulating molecules such as DNA methylating enzyme and a component of the BRCA1 complex. We also showed that Txnip causes growth suppression and autophagy in Mixed lineage leukemia (MLL) cells and enhances ABT263 (Navitoclax)-induced cell death. These results provide a clue to elucidate the molecular mechanism of anti-cancer action of Txnip and to develop an approach against breast cancer and MLL.

研究分野：病態医化学

キーワード：Txnip breast cancer triple negative Autophagy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

1) **thioredoxin interacting protein (Txnip)/ TBP-2**(*JBC*, 1999)は、糖代謝・転写制御に重要な役割を果たす (*Endocrinology* 2009; *Nature Communications*, 2010 ; *PLoS One*, 2012 ; 2011-2012 年度新学術領域「食欲脂肪蓄積制御」(公募)代表)。Txnip が細胞への糖の取り込みを制御することが国際的にも注目されているが、その分子機構は明らかではない。Txnip が核内で分子量約 1000-1200kDa の mRNA と long non coding RNA (lncRNA)を含む核内リボヌクレオプロテイン(RNP)高分子複合体を形成することを明らかにした(Hirata et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019)。また、Txnip の過剰発現が RNA の発現パターンを変化させることを明らかにしている(Hirata et al. *Data Brief*, 2019)。

2) わが国の 2013 年の乳がん死亡数は女性約 13,000 人で、女性ではがん死亡全体の約 9%を占める。2011 年の女性乳がんの罹患数(全国推計値)は、約 72,500 例(上皮内がんを除く)で、女性のがん罹患全体の約 20%を占め、その治療・診断法の開発が求められている。乳癌において、luminal A (ホルモン受容体陽性、HER2 受容体陰性、増殖能低い)、Luminal B(ホルモン受容体陽性、HER2 受容体陰性、増殖能高い)、分子標的療法が有効である HER2 陽性、triple negative(ホルモン受容体陰性、HER2 受容体陰性)タイプに大別され、治療法が異なっている。luminal A、luminal B における手術や化学療法を選択する指標には細胞増殖能を反映する Ki67 しかない。また、triple negative タイプは受容体発現が陰性としてしか診断できず、積極的に診断する指標はない。さらに、これらのタイプも heterogeneity があり、的確な治療法選択のためには、適切な層別指標の開発が望まれている。Txnip モノクローナル抗体を用いた特異的な免疫組織診断法を作成した。

## 2. 研究の目的

1) Txnip を乳癌の治療法選定に役立つ層別化診断法開発に応用することを目指す。また、triple negative 乳癌における Txnip 異所性局在機構の解析により、triple negative 乳癌発癌分子機構の新たな知見を得る。

2) Txnip による RNA 発現パターン変化を解析することにより、癌・糖尿病への新たなアプローチを開発する。

## 3. 研究の方法

### 1) 乳癌のサブタイプ別の Txnip 発現を検討し、その意義を明らかにする。

Txnip 免疫組織化学的検出法を用いて乳癌の luminal A、Luminal B、triple negative サブタイプ別に、天理よろづ相談所病院保存の手術、生検組織の Txnip 蛋白質の発現を検討する。すでに同意を得られた倫理的に問題のないホルマリン固定組織について、正常乳腺組織および各組織型での解析を行う。また、triple negative 乳癌細胞株 MDA-MB231 細胞を用いて Txnip と相互作用する分子を解析する。

### 2) Txnip 過剰発現による RNA 発現変化パターンの解析。

RNA-seq により Txnip 過剰発現細胞とコントロール細胞と比較して、Txnip 特異的に変化する RNA を解析する。作成済みの 293 Tet on Flag-HA-Txnip- stable あるいはコントロール細胞より RNA を抽出する。RNA-seq およびその解析は外注にて行う。

## 4. 研究成果

(1) preliminary な乳癌組織の検討で、Txnip の発現はサブタイプ別に異なっていた。また、Txnip は細胞質・核に局在するが、triple negative 症例では異所性に細胞膜に局在している症例が見られた。天理よろづ相談所病院乳腺外科および病理部との共同研究で様々な標本の検討を行ったが、Txnip の発現を臨床レベルで応用できる結果は得られなかった。

(2) triple negative 細胞株である MDA-MB231 細胞を用いた細胞内分画での検討では、他の乳癌細胞株 MCF7 と異なり Txnip が異所性に細胞膜に局在する所見を得た。MDA-MB231 細胞で membrane および cytoskeleton fraction で Txnip の発現が観察され、細胞膜の coated pit に存在する caveolin 1 と分画における局在が一致することを明らかにした。この triple negative タイプの乳癌細胞では、細胞膜付近に Txnip と相互作用するアンカー分子が存在することが示唆され、その分子の同定が新たな診断法、治療法につながる可能性がある。その同定のため、近接依存性相互作用解析法である APEX2 テクノロジーの導入を行った。核外移行シグナルを持つ pEF-Flag-HA-Txnip-Flag-APEX2-NES ベクターを作成した。このベクターを MDA-MB231 細胞で恒常的に発現する stable clone を作成することができた。同時に control 細胞として pcDNA3-Flag-APEX2-NES を発現させた stable clone を得た。また、核内での Txnip による RNA 発現パターン制御の分子機構の解明のため、核内移行シグナルを持つ pEF-Flag-HA-Txnip-V5 -APEX2-NLS ベクターを恒常的に発現する stable clone を得た。これらの clone を用いて、biotin labelling を行うことによる Txnip と近接する蛋白質、RNA の解析法を作成することができた。

(3) Txnip 過剰発現により発現誘導される RNA として、MAP キナーゼシグナル伝達調節に重要な脱リン酸化酵素、DNA メチル化酵素、乳癌発症に関連する修復酵素 BRCA1 複合体の構成因子を同定した。これらの因子は、Txnip の発癌抑制機構を明らかにするとともに、乳癌の層別診断法、治療法の開発に資すると考えられる（投稿準備中）。

(4) さらに、難治性 Mixed lineage leukemia (MLL) 急性骨髄性白血病細胞株 MOLM-13 および MV4-11 で Txnip が増殖を抑制し、オートファジーを誘導した。Txnip は Beclin-1 の発現を増加させ、また、LC3B-II /LC3B-I の比を増大させた。Txnip 過剰発現は Bcl-2 および Bcl-xL の阻害剤 ABT263 (Navitoclax)による細胞死を促進することを明らかにした。このことは Txnip の分子機構の解明が難治性の MLL 急性骨髄性白血病の治療に応用できる可能性を示唆する (Noura et al. FEBS Open Bio, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroshi Masutani	4. 巻 36
2. 論文標題 Thioredoxin-Interacting Protein in Cancer and Diabetes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxid Redox Signal.	6. 最初と最後の頁 1001-1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2021.0038.	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 -

1. 著者名 Mina Noura, Hidemasa Matsuo, Asami Koyama, Souichi Adachi, Hiroshi Masutani.	4. 巻 10
2. 論文標題 TXNIP induces growth arrest and enhances ABT263-induced apoptosis in mixed-lineage leukemia-rearranged acute myeloid leukemia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS openbio	6. 最初と最後の頁 1532-1541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12908, 2020.	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 -

1. 著者名 Tomonori Soyama, Hiroshi Masutani, Cristiane Lumi Hirata, Eri Iwai-Kanai, Takashi Inamoto	4. 巻 67
2. 論文標題 Thioredoxin as a novel sensitive marker of biological stress response in smoking.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 228-231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.19-108, 2020.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曾山 奉教, 平田 クリスチアネ, 増谷 弘
2. 発表標題 レドックスラベルによる赤血球酸化ストレスモニター法の検討
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾山 奉教、増谷 弘、平田 クリスチアネ、金井 恵理、稲本 俊
2. 発表標題 P-10喫煙における生物学的ストレス反応の新規高感度マーカーとしてのチオレドキシン
3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirata Lumi Cristiane, Hiroshi Masutani
2. 発表標題 Thioredoxin interacting protein (Txnip) high molecular complexes contains differentially expressed mRNAs and lncRNAs.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 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
---------	---------