

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08945

研究課題名(和文) TRIMファミリー蛋白質を介する新たな乳がん悪性化メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文) Development of treatment strategy targeting mechanisms mediated by TRIM family proteins

研究代表者

東 浩太郎 (Azuma, Kotaro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30401110

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)：本研究では、Tripartite Motif (TRIM)ファミリー蛋白質が、乳癌悪性化・治療抵抗性にかかわる分子メカニズムの解明とその応用を目指した。2020年度からの研究期間を通じて、TRIM25、TRIM39、TRIM44、TRIM47蛋白質の乳癌における臨床的な意義やその新規作用メカニズムを明らかにすることができ、それぞれの分子に関して論文発表を行った。それらのメカニズムの一部は、ユビキチン化による蛋白質の安定性を介するメカニズムであった。また、乳癌患者由来の初代培養細胞の樹立を試み、TRIMファミリー関連蛋白質を標的とした今後のプレクリニカル研究のための体制整備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、複数の乳癌の予後不良因子を蛋白質レベルで同定した。また、TRIM47の機能解析において、PKD3、PKC epsilonの安定化を介したメカニズムを示した点においても学術的な新規性を有する。さらに、ユビキチン分子のリジン27を介するポリユビキチン化という非典型的な分子修飾を示すことができた。本研究で同定した予後不良因子や関連蛋白質の知見を活用することにより、有効なオーダーメイド医療を行う道が開け、現在の日本の乳癌の罹患率の高さや死亡数の増加傾向を鑑みると、社会的な意義も有しているといえる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to discover new mechanisms of Tripartite Motif (TRIM) family proteins related to breast cancer promotion and resistance to therapies. We also aim to develop new therapeutic strategy for breast cancer. Through the entire research period, we are successful in elucidating clinical significance and new function of TRIM family proteins including TRIM25, TRIM39, TRIM44, and TRIM47. We published papers on all the four molecules during the research period. One of the mechanisms was the stabilization of interacting protein by ubiquitination. We are also establishing primary cancer cell lines from breast cancer patients which can be used for further preclinical studies to test the strategies targeting TRIM family-related mechanisms.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん TRIM47 TRIM25 TRIM44 TRIM39 ユビキチン化 スフェロイド培養

1. 研究開始当初の背景

本研究は、国内外の乳癌罹患率・死亡率の増加を背景として、乳癌の死亡率の増加を抑えるためにより有効な治療戦略は何か、乳癌の悪性化にかかわる鍵となる分子は何か、という問いが中核となっている。乳癌の診断・治療的価値を有するのは、ゲノム情報よりも、最終的に細胞のふるまいに直接関与している蛋白質の情報であり、このため申請者は、乳癌の予後悪化に関連しそうな候補遺伝子の蛋白質レベルでの発現を臨床サンプルにおいて評価することを重視してきた。本研究においては、これまで申請者らが明らかにしてきた乳癌の予後悪化と蛋白質レベルの発現に相関のあった TRIM25、TRIM44 および TRIM47 に着目し、その作用メカニズムを明らかにすることにより、そのメカニズム解明の中で明らかとなってきた乳癌に対する新たな治療標的の探索および治療効果の検討を目的とした。また、類縁分子として乳癌での役割が解明されていなかった TRIM39 も研究対象とした。

従来、治療効果の検討には既存の乳癌細胞株が用いられてきたが、近年、技術の進歩により、乳癌症例由来の癌細胞を三次元スフェロイド培養することにより、長期継代可能な患者由来癌細胞培養系やその異種移植動物モデルを作成することが可能となり、分担研究者が作成に成功している。このようにして樹立される細胞は、癌の不均一性や患者ごとの差異を維持したモデルとして有用である。本研究では、治療効果の判定に臨床背景のわかっている治療抵抗性の患者由来のオリジナルの培養系を複数樹立することにより、現在診療現場で実際に問題となっている治療抵抗性乳癌に対してさらに有効な治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者および研究分担者がこれまでに独自に乳癌の予後因子として同定している蛋白質、TRIM (Tripartite Motif) 25、TRIM44 および TRIM47 の作用メカニズムを解明することにより、新たな治療法を見出すことを目的としている。また、類縁分子として乳癌での役割が解明されていなかった TRIM39 も研究対象とした。

TRIM25 および TRIM47 は TRIM (Tripartite Motif) ファミリー蛋白質の一種であり、Ring finger ドメイン、B-box ドメイン、coiled-coil ドメインを共通して有している。TRIM ファミリー蛋白質は Ring finger ドメインの働きによりユビキチンリガーゼとして、ユビキチン修飾による種々の蛋白質制御に関わる。70 種類以上の蛋白質が TRIM ファミリーに分類されており、発生や神経変性、自然免疫、悪性腫瘍など多彩な生命現象にかかわることが報告されている。TRIM25 は、分担研究者の井上らがエストロゲン応答性の蛋白質として同定したものであり (文献 1)、当初は Efp (estrogen-responsive finger protein) と命名された。さらに、井上らは細胞周期の抑制作用を有する 14-3-3 σ 蛋白質をポリユビキチン化を介した分解に誘導し乳癌の増殖を促進すること、乳癌組織における Efp/TRIM25 蛋白質の発現量が予後の悪さと相関することを解明した (文献 2、3)。

また、Efp/TRIM25 が自然免疫の領域においても機能しており、正常細胞がウイルスに感染した際にインターフェロンを産生する際に重要な役割を果たす RIG-I (Retinoic-acid-inducible gene-1) というパターン認識受容体分子をポリユビキチン化することにより安定化・活性化することをハーバード大学との共同研究において示した (文献 4)。そこで、申請者は、乳癌細胞においても RIG-I が発現しており、Efp/TRIM25 の乳癌悪性化メカニズムに関与しているのではないかと考えた。

TRIM47 は、TRIM25 と構造が類似する TRIM ファミリー蛋白質であり、申請者らが TRIM25 と比較しながら解析を行っている蛋白質の 1 つである。本研究では、TRIM47 結合蛋白質のユビキチン化を介した新たな乳癌悪性化メカニズムの解明に挑み、さらに TRIM47 および、その関連分子が治療標的になりうるかを検討する。

申請者らは、他の TRIM ファミリー蛋白質として、TRIM39、TRIM44 にも着目している。TRIM44 に関しては、申請者らは乳癌組織における蛋白質の発現増加が悪い予後に関連することを報告しており (文献 5)、本研究ではその成果を発展させ、メカニズムに対する洞察を得ることを目的とした。

本研究では、前述のように治療抵抗性の乳癌症例由来の複数の患者由来癌細胞培養系の樹立および超免疫不全マウスに対する異種移植動物モデルの作成を行うことも目的とした。治療抵抗性となり、癌性胸水・癌性腹水を生じ、試験穿刺もしくは緩和的な排液を行ったなかった乳癌症例より得られた廃棄予定の胸水・腹水を利用し、独自に複数の患者由来癌細胞培養系を樹立する予定である。

3. 研究の方法

乳癌症例の収集は、虎の門病院、四国がんセンター、国立がんセンター中央病院、駒込病院において、倫理委員会の承認のもとに行った。乳癌組織に対して、TRIM25、TRIM39、TRIM44、TRIM47 の染色を行った。標本の免疫染色には、ウエスタンブロッティングで特異性の確認された抗体を用い、DAB 染色にて目的とする蛋白質の発現を評価した。再発等の臨床データと照合し、それらの分子の免疫反応性と予後の関連を統計学的に解析を行った。

分子メカニズムの解析は、乳癌細胞株として MCF-7 細胞を用い、内分泌療法耐性モデルとして MCF-7 を 4OH-タモキシフェン存在下で培養したタモキシフェン耐性株を用いた。

患者由来癌細胞の培養は、治療抵抗性となり、癌性胸水・癌性腹水を生じ、試験穿刺もしくは緩和的な排液を行った乳癌症例より得られた廃棄予定の胸水・腹水を利用した。患者由来の胸水・腹水は、倫理委員会の承認のもとに、虎の門病院、東京大学医学部附属病院より得た。

4. 研究成果

本研究では、Tripartite Motif (TRIM)ファミリー蛋白質が、乳癌悪性化・治療抵抗性にかかわる分子メカニズムの解明とその応用を目指した。2020 年度からの研究期間を通じて、TRIM47、TRIM25、TRIM39、TRIM44、蛋白質の乳癌における臨床的な意義やその新規作用メカニズムについて、その一部を明らかにすることができた。それらのメカニズムの多くは、ユビキチン化などに伴う蛋白質の相互作用や安定性を介するメカニズムであった。これはゲノム情報をからは知り得ないものであり、ポストゲノム診療を担うオーダーメイド医療の基盤となる知見となりうると考えられた。

(1) TRIM47 の乳がん細胞における臨床的意義および機能の解明

ホルモン療法によって治療された乳癌患者の組織を対象に、免疫組織検査という手法で腫瘍の中の TRIM47 という蛋白質の量を調べたところ、TRIM47 の量が多い乳がんの患者さんに再発が多いことを見出し、TRIM47 の蛋白質の量を調べることによりホルモン療法の効きにくさを予測できることを示した。また、TRIM47 が細胞の中で PKC epsilon および PKD3 という二種類のリン酸化酵素に結合し、安定化することにより、ホルモン療法の効きにくさにつながる NF-kappaB という信号が伝わりやすくなる仕組みも解明した。乳がん細胞内の TRIM47 の量を増やすと、ホルモン療法に用いる抗がん剤を入れても増殖し、一方で TRIM47 の蛋白質量を減らすと、細胞の増殖が起こりにくくなることも示した。これらの結果より、TRIM47 を減らす治療は、ホルモン療法が効きにくい乳がんの新しい治療法になりうることが推測された。この結果は、乳がん組織の TRIM47 蛋白質の情報を活用することにより、有効な治療法が見つからなかった乳がん患者さんに対して、より有効で個別化した治療法の提供につながると考えられる。本研究の結果は、Proc Natl Acad Sci U S A 誌（文献 6）に掲載された。また、本研究を通じて明らかにした内容および関連領域の現在の知見を英文の総説にまとめ、Cells 誌に掲載された（文献 7）。

(2) TRIM25 の乳がん細胞における臨床的意義および機能の解明

RIG-I は、多くの癌腫で予後良好因子とされているが、乳癌においては、RIG-I 蛋白質の高い免疫反応性は予後悪化と関連があることを示した。また、RIG-I 蛋白質の高い免疫反応性は、同じく予後悪化因子である TRIM25 の免疫反応性と正に相関し、これらの 2 種の分子は自然免疫だけでなく乳癌細胞の中においても協調して作用していることが推測され、論文発表を行った（文献 8）。

(3) TRIM44 の乳がん細胞における臨床的意義および機能の解明

乳癌細胞株において NF-kappaB シグナルを活性化することを見出していた TRIM44 に関して臨床サンプルを用いて検討した。TRIM44 および、NF-kB シグナルの下流因子である tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20)の免疫反応性を検討したところ、両者の高い免疫反応性は短い disease-free survival と関連を認めた。これらの結果より、臨床的な乳がん組織においても TRIM44 による NF-kB シグナルの活性化が起こっていることが推測され、論文発表を行った（文献 9）。この論文は、後に Top Cited Article に選出された。

(4) TRIM39 の乳がん細胞における臨床的意義および機能の解明

また、エストロゲン受容体陽性の乳がん患者さんを対象に、免疫組織検査という手法で腫瘍の中の TRIM39 という蛋白質の量を調べたところ、TRIM47 の量が多い乳がんの患者さんの

予後が悪いことを見出した。また、TRIM39 は、細胞周期を促進することを見出し、論文発表を行った（文献 10）。

(5) 患者由来初代培養乳癌細胞の樹立

乳癌患者由来の初代培養細胞の樹立を試み、今後のプレクリニカル研究のための体制整備を行っている。複数回培養を試みたが、培養継続は可能であったが、順調に増殖する株の樹立には至らず、プレクリニカル研究に用いることができる株の樹立を目指している。

引用文献

1. Inoue S *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 11117, 1993
2. Urano T, Inoue S *et al.* *Nature* 417: 871, 2002
3. Suzuki T, Inoue S *et al.* *Clin Cancer Res* 11: 6148, 2005
4. Gack MU, Inoue S *et al.* *Nature* 446: 916, 2007
5. Kawabata H, Azuma K *et al.* *Int J Mol Sci* 18. pii: E1931, 2017
6. Azuma K *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118: e2100784118, 2021
7. Azuma K and Inoue S. *Cells* 11, 2464, 2022
8. Sato J, Azuma K *et al.* *Clin Breast Cancer.* 21, 399-407, 2021
9. Sato J, Azuma K, *et al.* *Patho Int* 71, 60-69, 2021
10. Ogura T, Azuma K, *et al.* *Pathol Int.* 72, 96-106, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Azuma K, Ikeda K, Suzuki T, Aogi K, Horie-Inoue K, Inoue S.	4. 巻 118(35)
2. 論文標題 TRIM47 activates NF- B signaling via PKC- /PKD3 stabilization and contributes to endocrine therapy resistance in breast cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2100784118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2100784118.	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 Ogura T, Azuma K, Sato J, Kinowaki K, Takayama KI, Takeiwa T, Kawabata H, Inoue S.	4. 巻 22(21)
2. 論文標題 OCT1 Is a Poor Prognostic Factor for Breast Cancer Patients and Promotes Cell Proliferation via Inducing NCAPH.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 11505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111505.	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 Ogura T, Azuma K, Takeiwa T, Sato J, Kinowaki K, Ikeda K, Kawabata H, Inoue S.	4. 巻 72(2)
2. 論文標題 TRIM39 is a poor prognostic factor for patients with estrogen receptor-positive breast cancer and promotes cell cycle progression.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 96-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13190.	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 Sato J, Azuma K, Kinowaki K, Ikeda J, Ogura T, Takazawa Y, Kawabata H, Kitagawa M, Inoue S.	4. 巻 71
2. 論文標題 Combined A20 and tripartite motif-containing 44 as poor prognostic factors for breast cancer patients of the Japanese population.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 60-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13047.	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 Sato J, Azuma K, Kinowaki K, Ikeda K, Ogura T, Takazawa Y, Kawabata H, Kitagawa M, Inoue S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Combined use of immunoreactivities of RIG-I with Efp/TRIM25 for predicting prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 399-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clbc.2020.12.001.	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 Azuma K, Inoue S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Efp/TRIM25 and Its Related Protein, TRIM47, in Hormone-Dependent Cancers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11152464.	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤順一朗、東浩太郎、木脇圭一、池田和博、小倉拓也、高澤豊、川端英孝、北川昌伸、井上聡
2. 発表標題 Combined A20 and TRIM44 as poor prognostic factors for breast cancer patients of the Japanese population
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotaro Azuma, Kazuhiro Ikeda, Takashi Suzuki, Kuniko Horie, Satoshi Inoue
2. 発表標題 TRIM47 contributes to tamoxifen resistance of breast cancer via stabilizing PKCepsilon
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東浩太郎、池田和博、鈴木貴、堀江公仁子、井上聡
2. 発表標題 乳がん内分泌療法に対する耐性予測因子TRIM47によるNF- κ Bシグナル活性化
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤順一郎、東浩太郎、木脇圭一、小倉拓也、池田和博、北川昌伸、川端英孝、井上聡
2. 発表標題 ER陽性乳癌におけるRetinoic acid-inducible gene 1およびA20発現の免疫組織化学解析
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉拓也、東浩太郎、佐藤順一郎、木脇圭一、高山賢一、竹岩俊彦、川端英孝、井上聡
2. 発表標題 OCT1は乳がん患者の予後不良因子でありNCAPHを誘導し乳がん細胞の増殖を亢進する
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotaro Azuma, Kazuhiro Ikeda, Takashi Suzuki, Kuniko Horie, Satoshi Inoue
2. 発表標題 Prediction of endocrine resistance of breast cancer based on combined immunoreactivity study for TRIM47 and NR4A1
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<プレスリリース>「ホルモン療法が効きにくい乳がんの原因を発見」
<https://www.tmgig.jp/research/release/2021/0824.html>

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
研究分担者	井上 聡 (Inoue Satoshi) (40251251)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長 (82674)	

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