

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16182

研究課題名(和文) 乳癌の新規予後規定因子TSHZ2によるクロマチン制御と上皮間葉転換調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of chromatin regulation and epithelial-mesenchymal transition regulatory mechanism by TSHZ2, a novel prognostic factor in breast cancer

研究代表者

陸 美穂 (Riku, Miho)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50762390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規転写抑制因子teashirt homolog 2 (以下TSHZ2)の乳癌での機能解析および臨床的意義の解明、病理診断への活用を目的として進めてきた。本研究で樹立した正常乳腺上皮細胞株のTSHZ2遺伝子ノックアウト細胞株には、間葉系細胞様への形態変化がみられた。この背景にある分子機構を解析する中で、TSHZ2の複数のアイソフォームの発現パターンが正常と癌で異なり、それが上皮間葉転換を始めとした悪性形質に関係している可能性が明らかになった。今後はこの発現パターンと臨床病理学的特徴との関連解析を行い、乳癌のサロゲートマーカーとしての応用を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、正常乳腺上皮細胞が癌化する過程において間葉系細胞様への形態および機能を獲得する際、癌抑制遺伝子のアイソフォーム発現パターンが変化するという新たな側面から知見を得た。この変化を定常状態に戻すことは癌細胞の生存にとって不都合であると推測され、乳癌の新規治療薬開発の糸口となる。また、このパターン変化を利用し、乳腺腫瘍の診断マーカーとして応用することもできる。アイソフォーム発現パターンを組織上で可視化し、パネリングすることで良悪性の判断に迷う早期乳癌の病理診断を行うためのツールとして提唱できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to analyze the function of a novel transcriptional repressor teashirt homolog 2 (TSHZ2) in breast cancer, clarify its clinical significance, and utilize it for pathological diagnosis. The TSHZ2 gene knockout cell line of normal mammary epithelial cell line established in this study showed morphological change to mesenchymal cell-like. We analyzed the underlying molecular mechanisms and revealed that the expression patterns of multiple isoforms of TSHZ2 differed between normal and cancer, which may be associated with malignant traits such as epithelial-mesenchymal transition. In the future, we will analyze the relationship between this expression pattern and clinicopathological features and aim to apply it as a surrogate marker for breast cancer.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 核タンパク 上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は世界中で最も頻度の高い悪性腫瘍の一つである。乳癌の診断・治療技術は向上しつつあるが、腫瘍細胞の持つ浸潤・転移の特性が常に治療の障壁となり、それが乳癌関連死の主な原因となっている。しかし、乳癌の進展メカニズムは未だ明らかになっていない。

上皮細胞としての性格の強い癌細胞が浸潤・転移するためには運動能、浸潤能といった間葉系細胞様の形質を獲得する必要があるが、その起点として考えられているのが癌細胞の上皮間葉転換である。上皮間葉転換を起こした癌細胞は運動能・浸潤能の上昇に加えてアポトーシス耐性、幹細胞様形質といった特徴も持ち合わせることがわかっており、上皮間葉転換と予後不良の関連は多数報告されている。癌組織における上皮間葉転換を抑制することは臨床的に良好な結果をもたらす可能性があるが、その分子機構はまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が同定した TSHZ2 が重要な乳癌予後規定因子であることを踏まえ、その機能低下は乳癌の上皮間葉転換等多くの悪性形質を起こす重要なファクターであることを証明し、そのメカニズムを解明することである。更に、TSHZ2 の機能低下でみられる臨床病理学的特徴を解析し、乳腺腫瘍の診断マーカーとして用いることを目標としている。

## 3. 研究の方法

### (1) TSHZ2 の低下により細胞が獲得する形質変化の解析

培養細胞を用いて正常乳腺上皮細胞株の TSHZ2 をノックダウンし、浸潤能、遊走能、薬剤耐性能等を獲得すること、TSHZ2 が低下している乳癌培養細胞株において TSHZ2 をさらに低下させた場合それらの悪性形質が促進されることを確認し、逆に TSHZ2 を強制発現させることでそれらが軽減することを確認する。

### (2) TSHZ2 によるクロマチン再構築の制御機構の解明

正常乳腺上皮細胞株を用いて免疫沈降実験を行い、TSHZ2 と BAF 複合体を中心としたクロマチン再構築因子との相互作用をより詳細に明らかにする。

### (3) TSHZ2 により制御される上皮間葉転換関連転写因子およびその誘導因子の抽出

TSHZ2 をノックダウンした正常乳腺上皮細胞株を用いて ATAC-sequence (網羅的オープンクロマチン領域解析) を行い、TSHZ2 が低下することによってオープンとなるクロマチン領域を同定し、その中から TSHZ2 により制御される上皮間葉転換関連転写因子および誘導因子を抽出する。これらの結果の解析から TSHZ2 が上皮間葉転換関連転写因子の発現を制御する機構を解明する。

### (4) TSHZ2, 上皮間葉転換関連転写因子, BAF 複合体の発現状況と臨床病理学的特徴の関連解析

(3) で抽出された TSHZ2 により制御される上皮間葉転換関連転写因子に対する抗体を購入し乳癌組織の免疫組織化学染色を行う。それらと TSHZ2、上皮間葉転換、BAF 複合体構成因子の免疫組織化学染色の結果を併せ、発現状況の相関性を検証する。さらに、乳癌のサブタイプや進行度、組織学的悪性度といった病理学的特徴や、化学療法の効果、再発状況といった臨床情報との関連性につき解析することで、TSHZ2 が乳癌の治療効果や予後予測のバイオマーカーとして提唱できると考えている。

## 4. 研究成果

本研究は、新規転写抑制因子 *teashirt homolog 2* (以下 TSHZ2) の乳癌での機能解析および臨床的意義の解明、病理診断への活用を目的として進めてきた。TSHZ2 の発現が低下した正常乳腺上皮細胞および乳癌細胞の実験モデルとして、正常乳腺上皮細胞株および乳癌細胞株の TSHZ2 遺伝子ノックアウト細胞株を樹立した。TSHZ2 遺伝子のノックアウトによって、細胞には二つの変化が見られた。一つは正常乳腺上皮細胞株の間葉系細胞様形態への変化であり、もう一つは腺管様構造を作る傾向から、悪性増殖形態に類似した、シート状あるいは充実性の増殖を示すパターンへの変化である。この背景にある分子機構を解明する中で、培養細胞から抽出した RNA とタンパクを利用した RT-PCR およびウェスタンブロットの解析結果から、TSHZ2 の複数のアイソフォームの発現パターンが正常と癌で異なる可能性が明らかになった。いずれも核タンパクであるが、その構造からそれぞれのアイソフォームは異なる機能をもつこと

が予測され、正常細胞と癌細胞の発現パターンの違いが、乳癌の上皮間葉転換を始めとした悪性形質に関係している可能性が考えられた。

乳癌細胞株 MCF7 にそれぞれのアイソフォームを強制発現させると、細胞そのものの形態変化はみられないものと、細胞膜に突起を形成する傾向がみられ、特に突起の先端付近に強く集積するパターンに分かれた。膜突起の形成は癌細胞が遊走する際の形態変化であり (Friendl P et al. J. Cell Biol. 2009)、上皮間葉転換とも深く関係している。今後これらを裏付ける分子機構を明らかにし、実際の乳癌組織でも同じ現象がみられることを確認する。さらに臨床病理学的特徴との関連解析を行い、乳癌のサロゲートマーカーとしての応用を目指す。

以上の実績に加え、乳癌で発現が低下している遺伝子として TSHZ2 と同時に同定された FAM189A2 について、これまで機能が全く不明であったが、乳癌悪性化に重要な因子 CXCR4 の機能異常を引き起こす機構を解明した。そして、乳癌の無再発生存期間に強く関与する遺伝子として ENTREP と命名した (Tsunoda T and Riku M et al. EMBO Rep. 2021)。また、TSHZ2 は中枢神経系の分野でも発生において重要な役割を担う核タンパクの一つとされているが、申請者は神経疾患における核タンパクの機能異常に関わる研究でも成果を挙げることができた (Riku Y and Riku M et al. Brain 2022)。その他、乳癌と同様に本邦で増えつつある大腸癌の予後予測因子を提唱した (Koshino A, Riku M, et al. Pathol Int. 2021, Sugimura-Nagata A, Riku M, et al. Int J Mol Sci. 2021, Inoue S, Riku M, et al. Oncol Lett. 2020)。この研究で明らかとなった予後規定因子は、簡便な免疫組織化学染色によって病理診断にも臨床応用可能であり、今後実現を目指していく。

## 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 4件）

1. 著者名 Tsunoda Takumi, Riku Miho, Yamada Norika, Tsuchiya Hikaru, Tomita Takuya, Suzuki Minako, Kizuki Mari, Inoko Akihito, Ito Hideaki, Murotani Kenta, Murakami Hideki, Saeki Yasushi, Kasai Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 ENTREP/FAM189A2 encodes a new ITCH ubiquitin ligase activator that is downregulated in breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	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） 10.15252/embr.202051182	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 Riku Yuichi, Iwasaki Yasushi, Ishigaki Shinsuke, Akagi Akio, Hasegawa Masato, Nishioka Kenya, Li Yuanzhe, Riku Miho, Ikeuchi Takeshi, Fujioka Yusuke, Miyahara Hiroaki, Sone Jun, Hattori Nobutaka, Yoshida Mari, Katsuno Masahisa, Sobue Gen	4. 巻 -
2. 論文標題 Motor neuron TDP-43 proteinopathy in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain	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） 10.1093/brain/awac091	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 Inoue Satoshi, Tsunoda Takumi, Riku Miho, Ito Hideaki, Inoko Akihito, Murakami Hideki, Ebi Masahide, Ogasawara Naotaka, Pastan Ira, Kasugai Kunio, Kasai Kenji, Ikeda Hiroshi, Inaguma Shingo	4. 巻 19
2. 論文標題 Diffuse mesothelin expression leads to worse prognosis through enhanced cellular proliferation in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1741-1750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11290	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 Sugimura-Nagata Akane, Koshino Akira, Inoue Satoshi, Matsuo-Nagano Aya, Komura Masayuki, Riku Miho, Ito Hideaki, Inoko Akihito, Murakami Hideki, Ebi Masahide, Ogasawara Naotaka, Tsuzuki Toyonori, Takahashi Satoru, Kasugai Kunio, Kasai Kenji, Inaguma Shingo	4. 巻 22
2. 論文標題 Expression and Prognostic Significance of CD47?SIRPA Macrophage Checkpoint Molecules in Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2690-2690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052690	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 Koshino Akira, Inoue Satoshi, Sugimura Nagata Akane, Nishiyama Takeshi, Murakami Hideki, Ito Hideaki, Riku Miho, Inoko Akihito, Ebi Masahide, Ogasawara Naotaka, Tsuzuki Toyonori, Kasugai Kunio, Kasai Kenji, Inaguma Shingo	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 High phospho histone H3 expression uniquely predicts favorable survival among four markers of cellular proliferation in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13084	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 陸 美穂、村上秀樹、小野 謙 三、横山多佳子、加藤宗博、笠井謙 次	4. 巻 68
2. 論文標題 ラブドイド形質を伴う肉腫型悪性中皮腫の 一部検例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 現代医学	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 陸 美穂
2. 発表標題 臈胸関連リンパ腫の一部検例
3. 学会等名 旭臨床懇話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤秀明、猪子誠人、陸 美穂、村上秀樹、笠井謙次
2. 発表標題 STILによる浸潤突起形成機構
3. 学会等名 第110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知医科大学医学部病理学講座 研究業績 <a href="https://amu-pathology.org/publication.html">https://amu-pathology.org/publication.html</a> 愛知医科大学 病理学講座 <a href="https://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/05.html">https://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/05.html</a>
---

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