

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07113

研究課題名（和文）乳がん細胞内のHSD11 1によるホルモン産生が転移を亢進する分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which an autonomous production of stress hormone in breast cancer cells promotes metastasis

研究代表者

中山 浄二（Nakayama, Joji）

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教

研究者番号：70807221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳がん（以下TNBC）の細胞内でHSD11 1が産生した11-hydroxy progesterone（以下11-OHP）は、間葉系形質及び転移能をTNBCに賦与していた。HSD11 1阻害剤はTNBCの11-OHP産生を減弱させ、それは間葉系上皮転換の誘導及びTNBCの転移抑制に至った。HSD11 1及び11-OHPによる上皮系間葉転換の誘導はPeroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha（以下PPAR α ）に依存しており、PPAR α の遺伝的欠失はHSD11 1陽性TNBCの形質を上皮系に戻した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSD11 1を発現するTNBC細胞がホルモンを自律産生し、がん転移を亢進することは新しい知見である。マウス転移モデルはHSD11 1の薬理的機能欠失は上述細胞の転移を抑制すること証明し、TNBCのホルモン自律産生機構は転移を抑制する為の標的分子になり得る。本研究から得た知見はHSD11 1を発現する前立腺がんや膵臓がんなどの転移に対する治療戦略を開発する際にも役立つ。さらに、本研究で使用したHSD11 1阻害剤であるadrenosteroneはアメリカ食品医薬品局の承認薬である為、ドラッグリポジショニングすることで上述がんの転移を抑制する治療薬としての転用が可能である。

研究成果の概要（英文）：Metabolic analyses revealed that HSD11 1 expressing triple-negative breast cancer (TNBC) cells catalyzed 11-keto-progesterone as a substrate and yielded 11-hydroxyprogesterone (11-OHP). Pharmacological inhibition of HSD11 1 decreased 11-OHP production in TNBC cells, and then suppressed metastatic progression of the cells through induction of mesenchymal to epithelial transition (MET). HSD11 1 and 11-OHP-driven EMT depends on Peroxisome Proliferator-activated Receptor Alpha (PPAR α), and genetic inhibition of PPAR α induced MET on HSD11 1-expressing TNBC cells.

研究分野：がん転移

キーワード：HSD11 1 ホルモン自律産生 トリプルネガティブ乳がん がん転移 EMT MET

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡のほとんどは転移を原因としている。がん転移は多段階の過程を経て進行し、その分子機構はほとんど不明である。ステロイドホルモン産生に関与する 11 β -hydroxydehydrogenase1 (以下 HSD11 β 1) は副腎皮質、肝臓、脂肪組織及び中枢系の構成細胞においてのみ発現がみられ、不活性型コルチゾールを活性型に触媒する酵素である。申請者は複数の異なる臓器由来の高転移性がん細胞株において HSD11 β 1 の発現がみられ、乳がんでは Her2 陽性及びトリプルネガティブ乳がん (以下 TNBC) 臨床検体の 70% 以上で HSD11 β 1 の発現が検出されることを明らかにした (Nakayama et al., Molecular Cancer Research 2020)。また、HSD11 β 1 の発現はヒト乳腺上皮細胞では EMT を誘導し、低転移性乳がん細胞では転移能を著しく亢進した。一方、HSD11 β 1 の遺伝的欠失は高転移性 TNBC 細胞に間葉系上皮転換 (以下 MET) を誘導し、転移能を著しく低下させた。さらに、HSD11 β 1 による EMT はその酵素活性に依存的、且つ細胞外から供給されるホルモン非依存的に誘導された。上述を統合すると、HSD11 β 1 は乳がん細胞由来の代謝産物を基質として触媒し、その代謝産物が EMT 及びがん転移を亢進していると推測される。しかしながら、下記3項については不明であり、それらを検証した。

- ① 乳がん細胞内で HSD11 β 1 が触媒する基質及びその代謝産物の同定
- ② HSD11 β 1 の代謝産物が EMT を惹起する分子機構の解明
- ③ HSD11 β 1 阻害剤による TNBC 細胞の転移抑制効果の検証

2. 研究の目的

本研究の目的はステロイドホルモン産生に関与する HSD11 β 1 が、乳がん細胞内でホルモンを産生し、がん転移を亢進する分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

- ① 乳がん細胞内で HSD11 β 1 が触媒する基質及びその代謝産物の同定
質量分析器を用い HSD11 β 1 を発現する TNBC のステロイドホルモン産生に関与する脂質性代謝産物を解析した。
- ② HSD11 β 1 の代謝産物が EMT を惹起する分子機構の解明
HSD11 β 1 を介した EMT に必要なリガンド (11 β -OHP) と受容体 (PPAR α) を特定する為の検証を実施した。
- ③ HSD11 β 1 阻害剤による TNBC 細胞の転移抑制効果の検証
TNBC をマウスの乳腺脂肪組織に移植することでがん転移を模倣する自然転移発症モデル及び TNBC をマウスの尾静脈より移植することでがん転移を模倣するマウス実験転移モデルを用い、HSD11 β 1 阻害剤による転移抑制効果を検証した。

4. 研究成果

- ① 乳がん細胞内で HSD11 β 1 が触媒する基質及びその代謝産物の同定
初めに HSD11 β 1 を発現する TNBC 細胞において、ステロイドホルモン産生に関与する酵素群の発現を検証した。CYP11A1 や HSD3 β 1 などの酵素が HSD11 β 1 陽性 TNBC 細胞株において選択的に発現亢進していた。また、これら酵素は HSD11 β 1 を発現することで間葉系形質を獲得した乳がん細胞 MCF7 #2-7 及び #2-19 においても、その親株と比較し、発現量が著しく亢進していた (図1A)。HSD11 β 1 の阻害剤である Adrenosterone は C19 ステロイド骨格を有し、HSD11 β 1 が本来触媒する基質の代わりに触媒されることで、HSD11 β 1 の機能活性を競合的に阻害する。従って、TNBC 細胞内に存在する HSD11 β 1 の基質は Adrenosterone と類似した構造を有していると推測される。Adrenosterone と類似した C19 ステロイドは 11-

ketoprogesterone (以下 11-KP)があり、それを HSD11β1 陽性の乳がん細胞株に与えると、触媒され、11β-OHP、21-Deoxycortisol 及び 11β-hydroxytestosterone(以下 11β-OHT)が産生された。また、それら産生量は Adrenosterone 添加により減少した。一方、HSD11β1 を発現しない乳がん細胞では上述触媒反応が見られなかった(図1B)。21-deoxycortisone 及び 11-ketotestosterone(以下 11-KT)も Adrenosterone と類似した構造を有しており、それらを HSD11β1 陽性の乳がん細胞株に与えると、21-Deoxycortisol 及び 11β-hydroxytestosterone(以下 11β-OHT)が産生され、それら産生量は Adrenosterone 添加により減少した。

次に、炭素同位体(13C)を含有したコレステロールを用いた解析を実施した。13Cを含有したコレステロールを HSD11β1 陽性 TNBC 細胞に取り込ませ、13C を含有した 11-KP 及び 11β-OHP が産生されるか検証したところ、検出されなかった。上述を統合すると、HSD11β1 は 11-KP を基質として 11β-OHP を産生していることが判った。しかしながら、11-KP より上流の代謝経路は以前不明のままである。現在、CYP11A1 や HSD3β 1 などを遺伝的に欠失した HSD11β1 陽性 TNBC 細胞を用意し、11-KP 及び 11β-OHP の産生に必須となる酵素を同定することで 11β-OHP の自律産生を司る生合成経路の全貌を明らかにする。

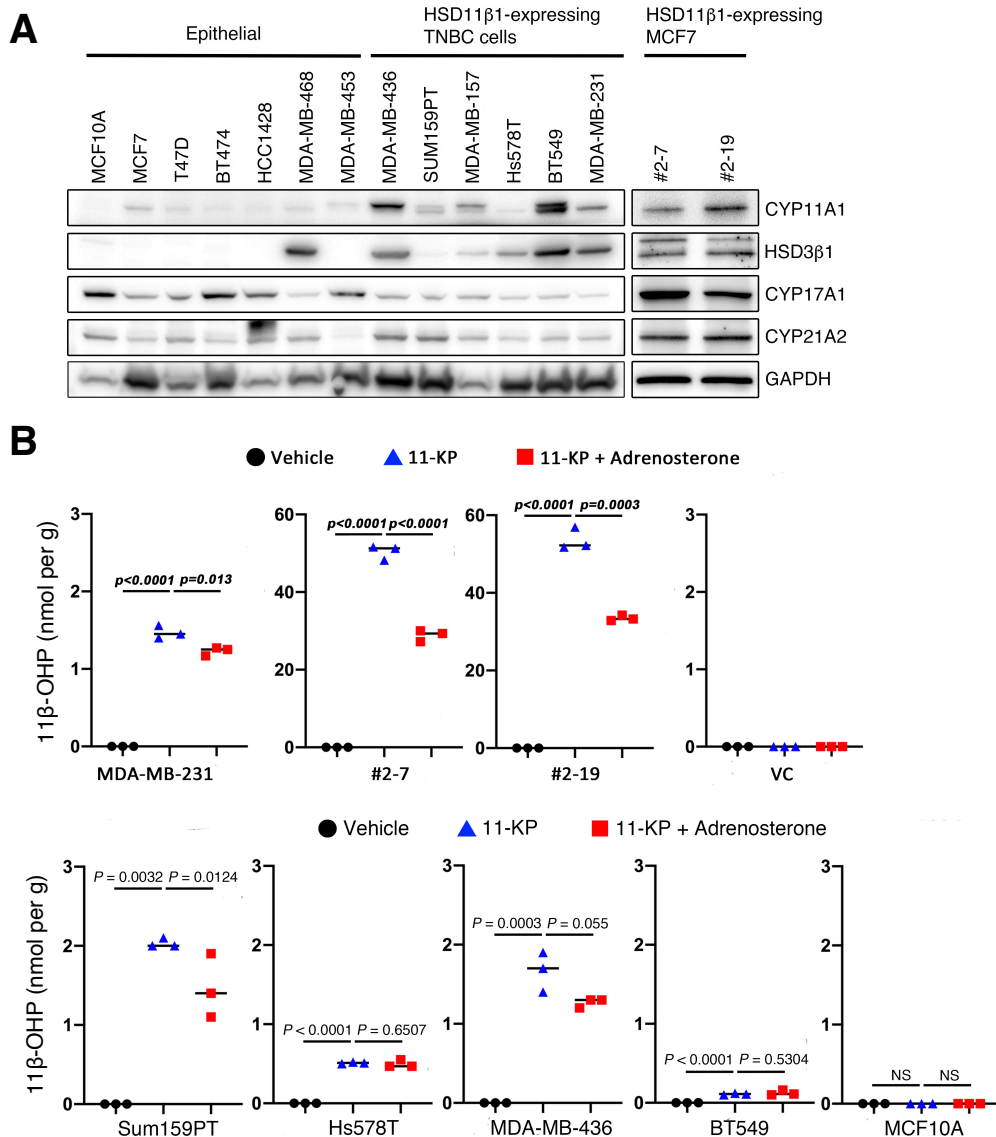


図1. HSD11β1及びその産物である11β-OHPはTNBCの転移に関与する

- A. 上皮系乳がん細胞、間葉系TNBC細胞及びHSD11β1発現により間葉系形質を獲得したMCF7細胞#2-17と#2-19におけるHSD11β1の上流で働くステロイドホルモン産生酵素群の発現。
 B. Vehicle (●)、11-KP (▲)又は11-KPとAdrenosterone (■)で処理した上皮系乳がん細胞、間葉系TNBC細胞及びHSD11β1発現により間葉系形質を獲得したMCF7細胞#2-17と#2-19における11β-OHPの産生量。

② HSD11β1 の代謝産物が上皮間葉系転換(以下 EMT)を惹起する分子機構の解明

初めに 11β-OHP は EMT を惹起する生理活性を有しているかについて検証した。乳腺上皮細胞 MCF10A を 11β-OHP で処理したところ、同細胞は EMT を誘導した(図2A)。11β-OHP) 及び 21-Deoxycortisol も EMT は誘導したが、11β-OHP がもっとも EMT 誘導が強かったので、以下の解析は 11β-OHP を用い実施した。次に、11β-OHP が EMT を誘導する作用機序について検証した。11β-OHP はステロイド骨格を有していることから、核内受容体に結合することで EMT を惹起していると推測される。そこで、MCF10A において核内受容体47種類をそれぞれ遺伝的欠失させ、HSD11β1 発現時の EMT 誘導に必須となる核内受容体を選別したところ、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (以下 PPARα)を遺伝的欠失した同細胞は HSD11β1 発現時の EMT 誘導が干渉された(図2B)。また、HSD11β1 を発現することで間葉系形質を獲得した乳がん細胞 MCF7 #2-7 及び#2-19 において、PPARα を遺伝的欠失させると部分的な MET を誘導した(図2C)。さらに、PPARα の遺伝的欠失は 11β-OHP に誘導される EMT も干渉した(図2D)。従って、HSD11β または 11β-OHP により誘導される EMT は PPARα に依存していることがわかった。

次に、上述の EMT 誘導に関与する EMT 誘導性転写因子について調べたところ、HSD11β1 発現後 EMT を誘導した MCF10A 及び HuMEC 細胞では Snail1 の発現亢進が見

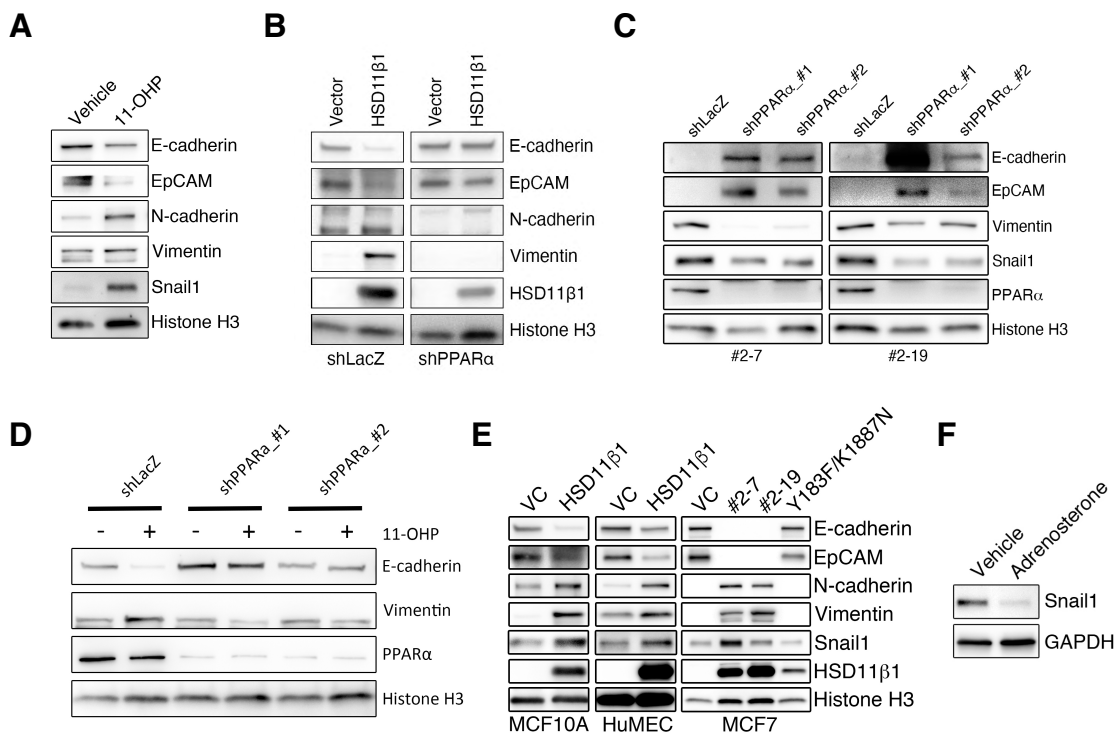


図2. HSD11β1はEMTを惹起し乳がん細胞の転移を亢進する

- A. Vector control (VC) 又はHSD11β1を発現させた乳腺上皮細胞MCF10A (左) とHuMEC (中央) における上皮系 (E-cadherinとEpCAM) 及び間葉系 (N-cadherinとVimentin) マーカー、EMT誘導性転写因子Snail1の発現。VC、HSD11β1又はHSD11β1の酵素失活体 (Y183F/K187N)を恒常的に発現させた乳がん細胞MCF7 (右) における上皮系及び間葉系マーカーとSnail1の発現。
 B. Vehicle 又は11-OHP で処理したMCF10Aにおける上皮系及び間葉系マーカーとSnail1の発現。
 C. Vehicle 又はAdrenosterone で処理したTNBC細胞MDA-MB-231におけるSnail1の発現。
 D. PPARαを遺伝的欠失した乳腺上皮細胞においてVector control又はHSD11β1を発現後の上皮系及び間葉系マーカーの発現 (左)。コントロールとしてLacZに対するshRNAを発現する乳腺上皮細胞における同様の実験。
 E. PPARαを遺伝的欠失した#2-7及び#2-19における上皮系及び間葉系マーカーの発現。
 F. PPARαを遺伝的欠失した乳腺上皮細胞においてVehicle 又は11-OHP で処理後の上皮系及び間葉系マーカーの発現。

られた。HSD11β1 を恒常的に発現することで間葉系形質を獲得した乳がん細胞 MCF7 #2-7 及び#2-19 においても、Snail1 の発現亢進が見られた(図2E)。また、11β-OHP で EMT を誘導した MCF10A 細胞でも Snail1 の発現亢進が見られた(図2A)。さらに、HSD11β1 阻害剤で処理した HSD11β1 陽性 TNBC 細胞株では、Snail1 の発現減退が見られた(図2F)。前述の #2-7 及び#2-19 細胞において PPARα の遺伝的欠失したところ、Snail1 の発現減少を伴う間葉系上皮転換が見られた(図2C)。Snail1 は転写及び蛋白レベルで発現量が制御されてい

ることが報告されていて、 11β -OHP 存在化で 48 時間培養した MCF10A 細胞では Snail1 mRNA の発現亢進は見られなかったが、Snail1 蛋白の発現亢進が見られた。従って、 11β -OHP は PPAR α を介して Snail1 を蛋白レベルで発現制御することで EMT 誘導及び間葉系形質の維持に関与していると推測される。現在、PPAR α が 11β -OHP 依存的に如何に Snail1 蛋白の安定化に寄与しているのかを検証中である。HSD11 β 1 及び 11β -OHP が EMT 誘導時に発現増大する EMT 誘導転写因子を同定できたので、 11β -OHP 依存的な PPAR α を介した Snail1 蛋白の制御機構を解明できなくとも論文として発表可能である。

③ HSD11 β 1 阻害剤による TNBC 細胞の転移抑制効果の検証

TNBC をマウスの乳腺脂肪組織に移植することでがん転移を模倣する自然転移発症モデルを用い、HSD11 β 1 阻害剤である Adrenosterone のがん転移抑制効果を検証した。Adrenosterone 処理したマウス群の肺及び肝臓では、形成された転移性腫瘍の数がコントロール群と比較し著しく減少していた。(図3A and B)。次に、原発巣からの浸潤・移動の工程を省いたマウス実験転移モデルにおいて Adrenosterone は TNBC の肺組織における転移性腫瘍の形成を抑制するか検証した。Adrenosterone 処理したマウス群の肺では形成された転移性腫瘍の数がコントロールと比較し著しく減少していた。(図3C and D)。従って、HSD11 β 1 は EMT を介した原発巣からの浸潤・移動以外の機構においても機能し、がん転移を亢進していることを示唆している。

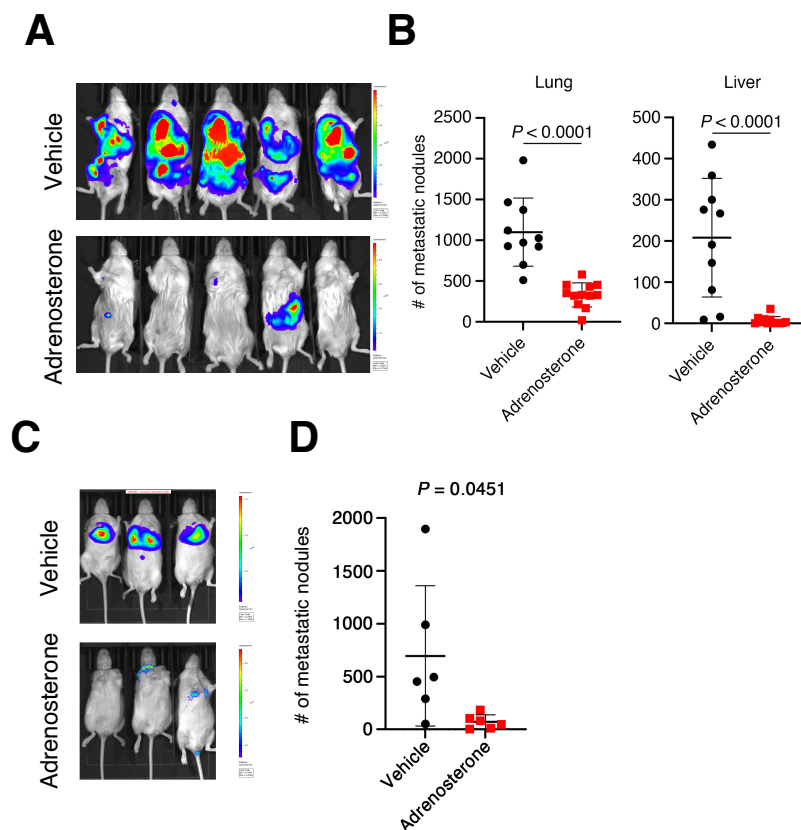


図3. HSD11 β 1 阻害剤であるAdrenosteroneはTNBCの転移を抑制する

- 自然転移発症モデルを用いたAdrenosterone のがん転移抑制効果の検証。Luciferaseを発現するTNBC細胞をマウスの乳腺脂肪に移植後、vehicle (上段)又はAdrenosterone (下段)を投薬したマウスのBio-luciferase image。
- 上述の vehicle (●) 又はAdrenosterone (■)を投薬したマウスの肺(左)及び肝臓(右)における転移性腫瘍の数。
- 実験転移モデルを用いたAdrenosterone のがん転移抑制効果の検証。Luciferaseを発現するTNBC細胞をマウスの尾静脈より移植後、vehicle (上段)又はAdrenosterone (下段)を投薬したマウスのBio-luciferase image。
- 上述のvehicle (●) 又はAdrenosterone (■)を投薬したマウスの肺における転移性腫瘍の数。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Joji Nakayama*, Ami Maruyama, Takamasa Ishikawa, Tatsunori Nishimura, Sanae Yamanaka, Noriko Gotoh, Chisako Yamauchi, Tatsuya Onishi, Tomoyoshi Soga, Satoshi Fujii, and Hideki Makinoshima.	4. 巻 -
2. 論文標題 HSD11 1 promotes EMT-mediated breast cancer metastasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2021.09.27.461934	査読の有無 無
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 Joji Nakayama, Hideki Makinoshima, and Zhiyuan Gong	4. 巻 13
2. 論文標題 In vivo drug screening to identify anti-metastasis drugs in Twist1a-ERT2 transgenic zebrafish.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e4673
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Joji Nakayama, Hideki Makinoshima, and Zhiyuan Gong	4. 巻 12
2. 論文標題 Gastrulation screening to identify anti-metastasis drugs in zebrafish embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e4525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.4525.	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 該当する

1. 著者名 Joji Nakayama, Konno Yuki, Ami Maruyama, Masaru Tomita, and Hideki Makinoshima.	4. 巻 76
2. 論文標題 Cinnamon extract suppresses metastatic dissemination of cancer cells through Inhibition of aerobic glycolysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 686-692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-022-01624-3	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 Joji Nakayama, Ami Maruyama, Takamasa Ishikawa, Tatsunori Nishimura, Sanae Yamanaka, Noriko Gotoh, Chisako Yamauchi, Tatsuya Onishi, Tomoyoshi Soga, Satoshi Fujii, and Hideki Makinoshima	4. 巻 -
2. 論文標題 HSD11 1 promotes EMT-mediated breast cancer metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2021.09.27.461934	査読の有無 無
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 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Joji Nakayama
2. 発表標題 A zebrafish screen for identification anti-metastasis drugs
3. 学会等名 Zebrafish Disease Models Society, research interest groups seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Joji Nakayama, Chisako Yamauchi, Tatsuya Onishi, Tomoyoshi Soga, Satoshi Fujii, Hideki Makinoshima
2. 発表標題 HSD11b1 promotes EMT-mediated breast cancer metastasis
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2021
4. 発表年 2021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
---------	---------