

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15307

研究課題名（和文）新たな乳がん治療薬を目指したアリル炭化水素受容体アゴニストの検討

研究課題名（英文）Investigation of aryl hydrocarbon receptor agonists for new breast cancer therapeutic agents

研究代表者

山下 直哉（Yamashita, Naoya）

同志社女子大学・薬学部・特任助教

研究者番号：50846649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳がんの悪性化に関与するヒト上皮成長因子受容体（HER）を介したシグナル伝達経路に対するアリル炭化水素受容体（AhR）アゴニストの影響を検討した。その結果、ヒト乳がん細胞株において、HER1（EGFR）とHER4の遺伝子発現がAhRアゴニストにより減少することを見出した。さらに、EGFRとHER4の下流シグナル伝達経路もAhRアゴニスト処理により抑制された。以上のことから、ヒト乳がん細胞株において、AhRアゴニストはEGFRおよびHER4の発現を抑制し、それらを介した細胞内シグナル伝達経路を抑制する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、アリル炭化水素受容体（AhR）のアゴニストは、乳がんの悪性化に関与するヒト上皮成長因子受容体（HER）を介したシグナル伝達経路を抑制することが示唆された。本研究結果は、新たな乳がん治療薬としてAhRアゴニストの応用につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists on the human epidermal growth factor receptor (HER)-mediated signaling pathway involved in the malignant transformation of breast cancer. We found that gene expression of HER1 (EGFR) and HER4 was decreased by AhR agonists in human breast cancer cell lines. Furthermore, downstream signaling pathways of EGFR and HER4 were also suppressed by AhR agonist treatment. In summary, AhR agonists may inhibit EGFR and HER4 expression and their mediated intracellular signaling pathways in human breast cancer cell lines.

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

乳がんは、全世界の女性が罹患するがんの中で、最も死亡者数が多く、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、リガンド依存的な受容体型転写因子である。具体的には、AhR はアゴニストが結合すると細胞質から核内に移行し、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タンパク質である。これまでに、AhR アゴニストが乳がんの抑制作用を示すことが報告されている。以上の研究は、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、その分子機構については未だ不明な点も多く、乳がんの治療薬として AhR アゴニストの応用を目指すためには、その分子機構を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、いまだ不明な点が残されている AhR アゴニストによる乳がんの抑制メカニズムについて、乳がんの悪性化に關与する細胞内シグナル伝達経路に着目し、研究を遂行した。具体的には、様々ながんの悪性化に關与するヒト上皮成長因子受容体 (HER) の発現およびそれらを介した細胞内シグナル伝達に対する AhR アゴニストの影響を検討した。

3. 研究の方法

ヒト乳がん細胞株である MCF-7 および T-47D 細胞を使用した。細胞は、10%のウシ胎児血清、ペニシリン・ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium で培養した。mRNA の抽出は ISOGEN II (Nippon Gene) を使用し、PrimeScript RT reagent kit (TAKARA Bio) により cDNA を合成した。リアルタイム PCR は Thermal Cycler Dice Real Time SystemLite (TAKARA Bio) を使用し、遺伝子発現量を定量化した。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、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 および T-47D に代表的な AhR アゴニストである 3-methylcholanthrene (3MC) を処理し、ヒト上皮成長因子受容体ファミリー (HER1 (EGFR)、HER2、HER3、HER4) の遺伝子発現量を測定した。その結果、3MC 処理により、EGFR および HER4 の遺伝子発現量が減少することを見出した。次に、3MC 以外の AhR アゴニストにおいて同様の作用が認められるかを検討した。その結果、benzo[a]pyrene、-naphthoflavone、indirubin、6-formylindolo[3,2-b] carbazole 処理においても、程度は異なるものの、EGFR および HER4 遺伝子の発現減少が認められた。

次に、AhR アゴニストによる EGFR および HER4 遺伝子の発現減少が、AhR 依存的であるかを検討した。T-47D 細胞において、siRNA による AhR の発現抑制を行った後、AhR アゴニストを処理し、EGFR および HER4 遺伝子の発現量を測定した。その結果、AhR アゴニストによる EGFR および HER4 遺伝子の発現減少作用は、AhR の発現抑制により減弱した。さらに、CRISPR-Cas9 法を用いて樹立した MCF-7 細胞における AhR ノックアウト細胞を用いて、同様に AhR アゴニスト処理を行った。その結果、AhR ノックアウト細胞では、AhR アゴニストによる EGFR および HER4 遺伝子の発現減少は認められなかった。以上のことから、AhR アゴニストによる EGFR および HER4 遺伝子の発現減少作用は、AhR 依存的であることが示された。

AhR アゴニストによる EGFR および HER4 の発現減少作用により、それらを介した細胞内シグナル伝達経路に影響があるかを検討した。具体的には、EGFR と HER4 のリガンドである betacellulin を用いて、EGFR と HER4 の下流タンパク質である ERK のリン酸化をウエスタンブロット法により評価した。その結果、betacellulin により惹起された ERK のリン酸化は、AhR アゴニストの前処理により抑制された。さらに、betacellulin による c-fos、EGR1 遺伝子の発現誘導においても AhR アゴニストの前処理により抑制された。また、AhR ノックアウト細胞を用いて、同様の実験を行った結果、betacellulin による ERK のリン酸化に対する AhR アゴニストの前処理の影響は認められず、betacellulin による c-fos、EGR1 遺伝子の発現誘導における AhR アゴニストの抑制作用も消失した。以上のことから、ヒト乳がん細胞株において、AhR アゴニストは EGFR および HER4 の遺伝子発現を抑制し、それらを介した細胞内シグナル伝達経路を抑制することを見出した。

今後の課題として、AhR アゴニストによる EGFR および HER4 遺伝子の発現減少メカニズムについて明らかにする必要があると考える。これまでに、EGFR および HER4 遺伝子の近位に位置するゲノム DNA をルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し、転写活性を評価したが、AhR アゴニストによる明確なレポーター活性の減少作用は認められなかった。今後は、クロニングする DNA 領域の変更やクロマチン共免疫沈降法などを行い、AhR アゴニストによる EGFR および HER4 遺伝子の発現減少機構を明らかにする予定である。

以上、本研究成果は、これまでに不明な点が多い、AhR アゴニストによる乳がんの抑制作用の解明につながることを期待される。

さらに、本申請課題を遂行している中、新たな AhR アゴニストとして、植物成分由来のファイトアレキシンとして知られるカマレキシンが AhR の活性化を介して乳がん腫瘍様塊の形成を抑制することを見出した。また、乳がんを含む様々ながんの悪性化に関与する転写因子である Forkhead box M1 (FOX M1) の阻害剤として使用される FDI-6 が、AhR の活性化を介して乳がん腫瘍様塊の形成を抑制することを見出した。上記の研究成果は、それぞれ学術論文として受理された (*Journal of Natural Medicines*, 76, 110-118 (2022), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 639, 29-35 (2023))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Naoya, Yoshizuka Arika, Kase Arisa, Ozawa Moeno, Taga Chiharu, Sanada Noriko, Kanno Yuichiro, Nemoto Kiyomitsu, Kizu Ryoichi	4. 巻 570
2. 論文標題 Activation of the aryl hydrocarbon receptor by 3-methylcholanthrene, but not by indirubin, suppresses mammosphere formation via downregulation of CDC20 expression in breast cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 131 ~ 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.07.047	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 Yamashita Naoya, Taga Chiharu, Ozawa Moeno, Kanno Yuichiro, Sanada Noriko, Kizu Ryoichi	4. 巻 76
2. 論文標題 Camalexin, an indole phytoalexin, inhibits cell proliferation, migration, and mammosphere formation in breast cancer cells via the aryl hydrocarbon receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 110 ~ 118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-021-01560-8	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 Yamashita Naoya, Yoshida Kyoko, Sanada Noriko, Kanno Yuichiro, Kizu Ryoichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Aryl Hydrocarbon Receptor Directly Regulates VTCN1 Gene Expression in MCF-7 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 793 ~ 797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-01068	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 Yamashita Naoya, Kawai Kaho, Yoshikawa Minami, Watabe Mina, Kanno Yuichiro, Sanada Noriko, Kizu Ryoichi	4. 巻 639
2. 論文標題 FDI-6, a FOXM1 inhibitor, activates the aryl hydrocarbon receptor and suppresses tumorsphere formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.11.069	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9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、吉塚 也華、紘 有沙、小澤 萌乃、多賀 千晴、眞田 法子、菅野 裕一郎、根本 清光、木津 良一
2. 発表標題 アリル炭化水素受容体アゴニストによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制作用の相違
3. 学会等名 フォーラム2021：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoya Yamashita, Yuichiro kanno, Ryoichi Kizu
2. 発表標題 Aryl hydrocarbon receptor agonists inhibit EGFR/HER4 signaling in breast cancer cells
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 山下 直哉、吉田 響子、菅野 裕一郎、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 アリル炭化水素受容体の遺伝子変異による転写活性化への影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川 みなみ、山下 直哉、紘 有沙、菅野 裕一郎、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 乳がん細胞株におけるアリル炭化水素受容体アゴニストによるヒト上皮成長因子受容体シグナル伝達経路への影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多賀 千晴、山下 直哉、小澤 萌乃、菅野 裕一郎、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 カマレキシンによるアリル炭化水素受容体を介した乳がんの増悪抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤 萌乃、山下 直哉、吉川 みなみ、多賀 千晴、菅野 裕一郎、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 アリル炭化水素受容体アゴニストであるタピナロフによる乳がん腫瘍様塊の形成抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 直哉、吉田 響子、菅野 裕一郎、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 アリル炭化水素受容体の点変異による転写活性化作用の評価
3. 学会等名 フォーラム2022：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉塚 也華、山下 直哉、小澤 萌乃、菅野 裕一郎、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 タピナロフによるアリル炭化水素受容体を介したスフィア形成抑制機構
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河合 花歩、山下 直哉、吉川 みなみ、渡部 未奈、菅野 裕一朗、眞田 法子、木津 良一
2. 発表標題 FOXMI阻害剤であるFDI-6はアリル炭化水素受容体を介してスフィア形成を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------