

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15503

研究課題名（和文）乳がんサブタイプにおける細胞外マトリックスの硬さ依存的な増殖シグナル伝達系の解明

研究課題名（英文）Elucidation of extracellular matrix stiffness-dependent cell proliferation signaling pathways in breast cancer subtypes.

研究代表者

市川 彩花（Ichikawa, Ayaka）

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：70869106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、細胞外マトリックスの硬化具合、乳がんの悪性化、サブタイプ分類に関するErbB2受容体シグナル伝達系に着目し、細胞周期エントリまでの転写制御を含めた分子機構および細胞周期阻害剤の感受性に与える影響を明らかにした。細胞周期レポーターを用いた生細胞観察データの解析と、エピゲノム、トランスクリプトームのオミクス解析を組み合わせ、ErbB2の過剰発現量を変えた乳がん細胞株を用いて検証した。その結果、ErbB2を介したc-Mycとcyclin D1の比率の変化がどのようにCDK4阻害剤への感受性を変えるのか、そのメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ErbB2の発現量が比較的低いLuminal Aサブタイプ内において、局所的に観察されるErbB2の発現量の違いがどのように細胞周期制御の分子機構を調節するのか、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究課題では、ErbB2、c-Myc、cyclin D1の発現量の比率の関係が、細胞周期の進行を制御し、細胞周期阻害剤処理後の増殖率を判定する上で重要な指標となる可能性を示した。また、乳がん細胞における細胞外マトリックス（ECM）の硬化は、ErbB2の発現量の変化と繋がっているため、今後、ECMの硬化具合がどのように細胞周期状態に影響し、薬剤応答性を変化させるのか、その予測に役立てることができる。

研究成果の概要（英文）：This research project focused on the ErbB2 receptor signaling, which has been implicated in extracellular matrix stiffness, malignant transformation and breast cancer subtype classification, to determine the underlying molecular mechanisms from transcriptional regulation to cell cycle entry, and their impact on sensitivity to cell cycle inhibitors. The analysis of live cell imaging data using cell cycle reporters, combined with epigenetic and transcriptomic omics analysis, was validated using breast cancer cell lines with different levels of ErbB2 overexpression. The differential expression of ErbB2 was found to regulate the G1/S transition-associated c-Myc and cyclin D1 protein ratio. In addition, we identified one of the mechanisms by which how does ErbB2-mediated change in the ratio of c-Myc and cyclin D1 alter sensitivity to CDK4 inhibitors.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん がん微小環境 転写制御 細胞増殖 ErbBシグナル伝達系

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんの発症部位となる乳腺組織の周囲にはコラーゲンなどの細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) が多く存在しており、乳がんの発症、症状の悪化の原因の一つとして ECM 密度の増加による組織の「硬化」が挙げられている。しかし、ECM の硬化具合(量)が細胞の増殖能をどのように調節するのかといったシグナル伝達系や転写制御の理解は進んでいない。動物細胞は細胞外微小環境 (以下、ニッチ) から刺激を受け、シグナル伝達経路を介して細胞の運命を決定する。特に、ECM が作り出すニッチの硬さは、がんの増殖能に影響を与え悪性を促進させることが報告されている [Paszek MJ *et al.*, 2005, *Cancer Cell*]。そのため乳がん検診においては、乳腺の硬化具合を計測できるマンモグラフィ検査が行われている [Norman F Boyd *et al.*, 2014, *PLoS One*]。しかしながら、乳腺組織の硬化具合(量)を測定したところで、それは乳がん予兆の“予測”にすぎず具体的な治療方針の決定には繋がらない。そのため、ECM の硬化具合によって変化を受けうる乳がんの増殖シグナル伝達系のしくみを詳細に解明することが、乳がんを制圧する上で一つ重要な課題となっている。細胞の増殖を制御する細胞周期の進行は、増殖因子刺激により誘導される遺伝子転写産物の生成と分解によって厳密に制御されており [Hee Won Yang *et al.*, 2017, *Nature*]、その経路として様々なシグナル伝達からなる複雑なネットワークが同定されている [Yao G. *et al.*, 2008, *Nat Cell Biol*] [Osalie C Sears *et al.*, 2012, *J Biol Chem*]。乳がんの増殖シグナルに深く関与する ErbB 受容体には ErbB1 (ErbB2)、ErbB2 (HER2)、ErbB3、ErbB4 の 4 つの ErbB ファミリーが存在する。特に ErbB2 の高いキナーゼ活性はいくつかの悪性度の高い乳がん細胞において観察されている。申請者らは、ErbB2 の発現量が異なるサブタイプ間で細胞周期の開始に関わる転写因子の活性動態が同じであっても、その下流に位置する細胞周期関連分子の発現動態および細胞周期の各フェーズの長さ、増殖率がサブタイプ間で異なることを見出していた。このことから、遺伝子発現の ON/OFF 状態を決定するクロマチンの開き方や、それに伴う細胞周期関連遺伝子発現制御の仕組みが ErbB2 の発現量の違いもしくは ErbB2 の発現量の違いに基づいたサブタイプ間で大きく異なることが示唆されていた。また、乳がん細胞において、ErbB2 の発現量は ECM の硬さに依存して高くなることが報告されている [Cheng. *et al.*, 2016, *Sci. Rep.*]。

## 2. 研究の目的

いくつかの悪性乳癌において活性亢進が強く認められ、ECM の硬化具合と関わり深い ErbB2 受容体シグナル伝達に着目する。そして、哺乳類の増殖開始に不可欠な細胞周期エントリー (G1/S 遷移制御) 機構について、ErbB2 の発現量の違いが転写制御を介してどのように細胞周期を調節するのか、細胞周期阻害剤の感受性に対する影響も調べ、統合的に解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞周期の動態解析

細胞周期の定量解析のため、細胞周期センサー FUCCI [Grant GD *et al.*, 2018, *Cell Cycle*] を安定的に発現させた乳がん細胞株を樹立する。乳がん細胞株は、ErbB2 の発現量が他の乳がん細胞株と比べて比較的低い Luminal A の代表的な乳がん細胞株の一つ、MCF-7 細胞を用いる。また、ErbB2 の発現レベルが異なる ErbB2 過剰発現細胞も樹立する。細胞周期 (G1 期、S 期、G2/M 期) の進行に伴い、2 種類の細胞周期関連蛋白質 Cdt1 と Geminin の発現量が変化する。生細胞イメージングデータから得たこれら 2 つの蛋白質の蛍光の経時的な変化から細胞周期を推定するための、解析パイプラインを作成する。さらに、蛋白質の動態を解析するためタイムコースでサンプルを回収し、ウエスタンブロッティング法による蛋白質の定量解析を行う。一方、細胞周期阻害剤の内、RB リン酸化の誘導を介して G1/S 遷移に必要な E2F の転写因子を活性化させる蛋白質の一つ CDK4 のキナーゼ領域を標的とした CDK4 阻害剤を添加後の細胞周期動態の影響も解析する。

### (2) エピゲノム制御を含めた転写制御の解析

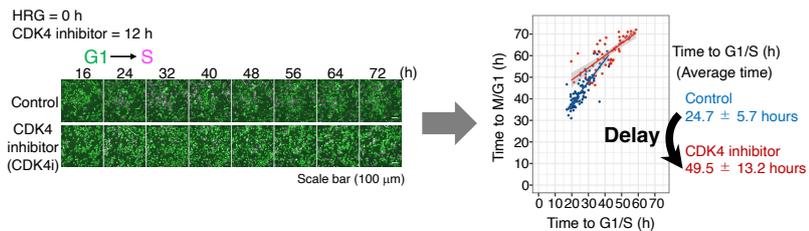
時間経過での詳細な転写制御について調べるため、プロモーターやエンハンサー領域のヒストン修飾マーカーである H3K27Ac と H3K4me1 を用い、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行う。エンリッチメント解析によってヒストン修飾量が増加する転写結合モチーフを特定後、RNA-seq によって網羅的に転写因子下流の遺伝子発現の変動が生じているかどうか確認を行う。

### (3) G1/S 遷移に関連する蛋白質の発現比率の計算

G1/S 遷移の促進に重要な c-Myc と cyclin D1 の発現量の比率を単一細胞レベルで調べるため、それぞれの蛋白質を標的とした抗体を用いて免疫染色を行う。細胞のセグメンテーションおよび各蛋白質の蛍光量の取得は、CellProfile 上でパイプラインを構築し、データを取得する。

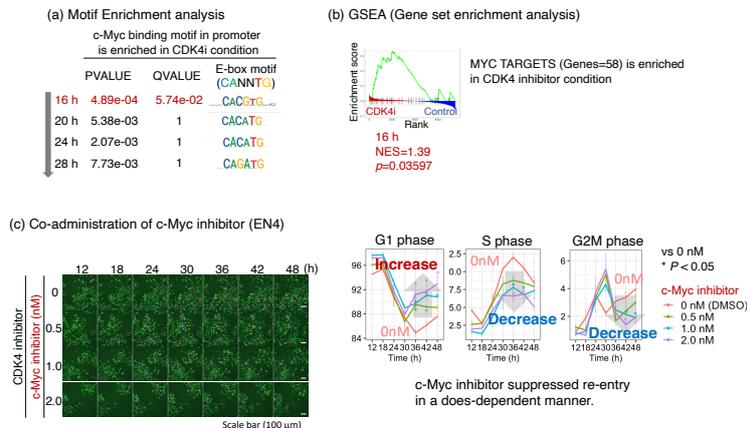
#### 4. 研究成果

(1)細胞周期 FUCCI センサーを発現させた MCF-7 細胞を用い、ヘレグリンを用いて ErbB2 受容体を活性化後、生細胞イメージングを行なった。イメージングデータを用いて、単一細胞レベルで細胞を追跡後、取得した Cdt1 と Geminin の蛍光量の変動から、R で作成したパイプラインを用いて各細胞の細胞周期の期間を推定した。その結果、ヘレグリン刺激後、約 20 時間後に G1/S 遷移が生じることがわかった。さらに、G1/S 遷移付近において、CDK4 とその結合パートナーである cyclin D1 の発現量の増加に伴って、E2F-1 や RB のリン酸化量も増加した。一方、G1/S 遷移に際し E2F-1 のプロモーター活性の増大に影響する c-Myc の発現量はすでにその時間帯では低下していた。以上のことから、ErbB2 受容体の活性化後、約 20 時間後に G1/S 遷移が生じ、それには c-Myc ではなく主に CDK4 と cyclin D1 が大きく関与していることが示唆された。次に、CDK4 と cyclin D1 が G1/S 遷移に関係しているかどうか調べるため、CDK4 阻害剤を用いた。その結果、コントロール条件と比べて CDK4 阻害剤条件ではほとんどの細胞で G1/S 遷移が停止したが、G1/S 遷移までの時間が遅延しながらも細胞周期を維持するサブ集団が観察された(図 1)。ここまでの結果から、ErbB2 受容体活性化後、G1/S 遷移は主に CDK4 と cyclin D1 によって促進されるが、CDK4 阻害剤添加後、一部の細胞で阻害剤に耐性を示す細胞が観察された。



(図 1) CDK4 阻害後、サブ集団で G1/S 遷移までの時間が遅延する

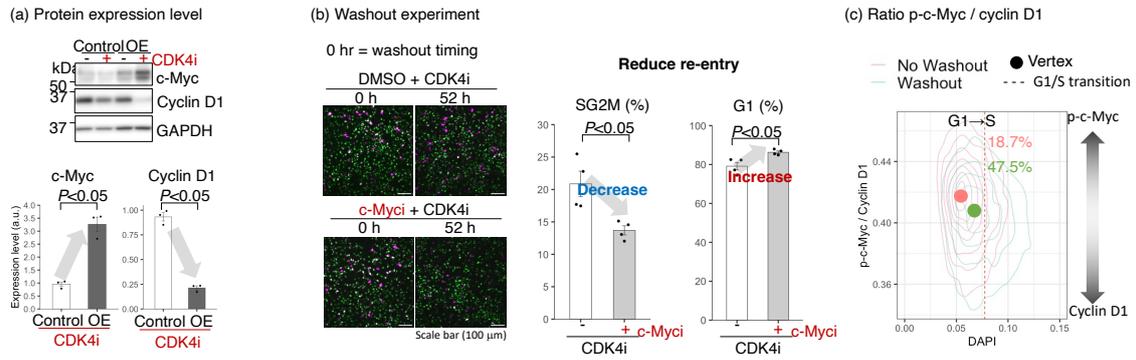
(2)CDK4 阻害剤に対して耐性を示した細胞が、どのような仕組みで細胞周期の再エントリーを果たすことができたのか、そのメカニズムを調べるため、エピゲノム解析を含んだ転写制御について調べた。タイムコースでデータを取得したところ、CDK4 阻害剤条件において、プロモーター領域の全ての時間点において、c-Myc の結合モチーフである E-box モチーフが濃縮されていた(図 2a)。特に、CDK4 阻害剤処理 4 時間後(ヘレグリン刺激 16 時間後)で、有意にそのモチーフが濃縮していた。また、Gene set enrichment analysis(GSEA)により、同じ時間点において c-Myc のターゲット遺伝子(58 個)が CDK4 阻害剤条件で有意に増加していた(図 2b)。この検証を行うため、c-Myc の転写活性の阻害剤(EN4)を用いたところ、EN4 の濃度依存的に CDK4 阻害剤投与時に観察されていた細胞周期の再エントリーが抑制された(図 2c)。このことから、CDK4 阻害剤に耐性を持つ細胞では、エピゲノム変化によって活性化する c-Myc の経路を利用することによって、細胞周期の進行を持続することが示唆された。



(図 2) CDK4 阻害後でも細胞周期を持続する集団では c-Myc 経路を利用する

(3)ErbB2 過剰発現細胞では、CDK4 阻害剤投与後、コントロール細胞と比べて c-Myc の発現量が 3.5 倍高くなっていた(図 3a)。c-Myc は細胞周期の促進に機能することが報告されているため、ErbB2 過剰発現細胞では CDK4 阻害剤投与後、コントロール細胞と比べて細胞周期の進行が停止や遅延することなく、逆に細胞周期が促進することを期待していた。しかし、予想に反して、ErbB2 過剰発現細胞において CDK4 阻害剤を投与すると、ほとんどの細胞で細胞周期の停止が観察された。c-Myc は G1 期において cyclin D1 の安定化を誘導する p27 の遺伝子発現を抑制することが一部報告されている。そのため、cyclin D1 の発現量について調べたところ、ErbB2 過剰発現細胞ではコントロール細胞と比べて 70%程度減少していた(図 3a)。一方、c-Myc は、生存シグナルに重要であることが報告されている。そこで、ErbB2 過剰発現細胞で観察された細胞周期停止は、c-Myc による生存シグナルを利用することで可逆的な状態であると仮定し、次にその検証を行なった。CDK4 阻害剤処理のみの場合、阻害剤を除去すると細胞周期の再エントリーが観察されたが、c-Myc 阻害剤を CDK4 阻害剤と共に予め投与しておくと、再エントリー率が低下した(図 3b)。また、p-c-Myc に対する cyclin D1 の発現量が高い細胞ほど、G1 期に局在する様子も免疫染色の結果から確認された(図 3c)。このことから、ErbB2 の発現状態は、細胞周期の G1/S 遷移進行に関係する c-Myc と cyclin D1 の発現量の比率を調節することによって、CDK4 阻害剤の感受性に影響を与えることが明らかとなった。以上の結果は、可逆的な細胞周期停止状態のように見かけの細胞増殖率に惑わされることなく、正確な薬剤応答性の感受性を定量的に評価す

る上で重要な知見であることが示された。



(図 3) ErbB2 過剰発現細胞では過剰に c-Myc の高い活性が維持され、CDK4 阻害後の可逆的な細胞周期停止状態が誘導される。

以上の研究内容は、プレプリント (bioRxiv) で発行したため、以下に記載する。

ErbB2/HER2 expression level determines CDK4-inhibitor sensitivity and cyclin D1 and c-Myc dependency at the G1/S transition

Ayaka Nagasato-Ichikawa, Ken Murakami, Kazuhiro Aoki, Mariko Okada

doi: <https://doi.org/10.1101/2024.05.09.593450>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Ayaka Nagasato-Ichikawa, Ken Murakami, Kazuhiro Aoki, Mariko Okada	4. 巻 -
2. 論文標題 ErbB2/HER2 expression level determines CDK4-inhibitor sensitivity and cyclin D1 and c-Myc dependency at the G1/S transition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv, The preprint server for biology	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） 10.1101/2024.05.09.593450	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ayaka Ichikawa, Ken Murakami, Kazuhiro Aoki, Mariko Okada
2. 発表標題 ErbB2/HER2 modulates Cyclin D1 and c-Myc dependency at G1/S transition, impacting CDK4 inhibitor sensitivity
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences, Dynamics and Encoding in Cell Signaling（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ayaka Ichikawa, Ken Murakami, Kazuhiro Aoki, Mariko Okada
2. 発表標題 ErbB2/HER2 modulates Cyclin D1 and c-Myc dependency at G1/S transition, impacting CDK4 inhibitor sensitivity
3. 学会等名 9th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ayaka Ichikawa, Ken Murakami, Kazuhiro Aoki, Mariko Okada
2. 発表標題 Role of ErbB2 receptor expression on cell cycle progression and quiescence via Cyclin D1 and c-Myc
3. 学会等名 第96回日本生化学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayaka Ichikawa
2. 発表標題 Regulatory mechanism of G1/S cell cycle transition via ErbB signaling network
3. 学会等名 Japan-Korea Bilateral Symposium between IPR and SNU on Structure and Folding of Disease Related Proteins (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川彩花, 村上賢, 青木一洋, 岡田眞里子
2. 発表標題 細胞周期G1/S移行におけるErbBシグナル CDK4クロストーク制御の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川彩花, 村上賢, 青木一洋, 岡田眞里子
2. 発表標題 ErbBシグナル伝達系を介した細胞周期G1/S移行の制御機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------