

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：21KK0276

研究課題名（和文）ER 発現制御機構を基盤としたトリプルネガティブ乳癌の革新的治療法の確立

研究課題名（英文）Development of the novel therapeutic strategy against TNBC based on mechanism of ER induction

研究代表者

柴田 智博（Shibata, Tomohiro）

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：40795986

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳癌（TNBC）において乳癌のオンコプロテインであるYB-1のリン酸化はエストロゲン受容体（ER α ）の発現を抑制するメカニズムを明らかにしてきた。本研究では、TNBC細胞株の同所移植モデルにおいてYB-1のリン酸化標的薬が腫瘍微小環境中の腫瘍促進的マクロファージ（M2マクロファージ）においてER α 発現を誘導していることを明らかにした。さらに、*in vitro*でのM2マクロファージへの分化実験系においてリン酸化YB-1標的薬とER α 標的薬はM2マクロファージの生存を相乗的に抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNBCは治療標的となる因子を発現する 경우가少なく、さらなる有効な治療薬の創出が必要とされている。リン酸化YB-1阻害薬はTNBC腫瘍内の腫瘍促進的（M2）マクロファージのER α を誘導した。さらに、腹腔内マクロファージからの分化実験では、YB-1リン酸化標的薬はM2マクロファージのER α 発現を誘導し、ER α 標的薬はM2マクロファージの生存を抑制した。以上より、リン酸化YB-1標的薬は癌細胞だけでなくM2マクロファージのER α 発現に関わり、両者のER α を標的とすることでER α 標的薬の抗腫瘍活性を増強していると考えられる。本研究の成果が、TNBC治療の発展に貢献できることを期待している。

研究成果の概要（英文）：YB-1 is oncoprotein for breast cancer and YB-1 is phosphorylated by AKT/p70S6K/p90RSK. The phosphorylated YB-1 (pYB-1) is localized at nucleus and YB-1 act as transcriptional factor of cell cycle related genes and drug resistance related genes. I found that inhibition of YB-1 phosphorylation stabilized ER α protein and enhanced the ER α protein expression in tumor associated macrophages (TAM). The combination of pYB-1 inhibitor and ER α inhibitor showed synergetic suppressive effect on macrophage survival *in vitro*. The present study demonstrated that the combination of pYB-1 inhibitor and ER α inhibitor is potent therapeutics for treatment of TNBC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 エストロゲン受容体 YB-1 免疫細胞 マクロファージ がん間質細胞

1. 研究開始当初の背景

1. 乳癌の約 20%を占めるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は乳癌の他のサブタイプと比べ 5 年生存率が 70%と依然として予後が悪い (Garrido-Castro et al., Cancer Dis. 2019)。その要因として、他のサブタイプと異なり標的分子がなく有効な分子標的薬がないこと、浸潤能・転移能が高く多臓器への転移が起こりやすいことが挙げられる。
2. Y-ボックス結合タンパク質-1 (YB-1) は細胞周期関連遺伝子や増殖因子受容体の発現を制御する転写因子であり、さらに、YB-1 の高発現や活性化 (核内局在) は乳癌をはじめとした様々ながん種において予後不良因子であることが申請者を含む国内外の研究グループにより報告されている。
3. 申請者は、YB-1 の活性化と核内移行に PI3K/AKT シグナルが関与することを報告している。近年、申請者はフルベストラント耐性乳癌細胞株において、AKT/mTOR/S6K シグナルが活性化し YB-1 リン酸化を促進することで、内分泌治療耐性を誘導することを報告した (Shibata et al., Cancer Res., 2017)。さらに、内分泌治療後の再発乳癌において YB-1 の核内発現とリン酸化 YB-1 の発現が上昇していることを明らかにした (Shibata et al., Mol Cancer Ther. 2020)。
4. The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを駆使した乳癌組織での解析から YB-1 が予後不良因子を正に制御し、予後良好因子を負に制御することを観察している。また、YB-1 及びその制御因子が乳癌の予後を予測するバイオマーカーとなることを明らかにした (Shibata et al., Oncotarget. 2018)。

さらに、その後の研究により以下の点について明らかにしている。

1. TCGA データベースを駆使したさらなる解析により、TNBC においてリン酸化 YB-1 発現が亢進していることを見出している (Shibata et al., Mol. Cancer Ther. 2020)。そこで、TNBC におけるリン酸化 YB-1 に着目し、YB-1 リン酸化標的薬の TNBC に対する効果について検討を行った。その結果、YB-1 リン酸化阻害により ER α の発現上昇とともに、内分泌治療薬に対する感受性が増強することを観察している。さらに、ER α 発現上昇メカニズムとして、リン酸化 YB-1 が ER α タンパクの安定性を上昇させることで、ER α 発現を増加させることを明らかにした。
2. また、マウス同所移植モデルによる検討において、YB-1 リン酸化阻害薬は TNBC 腫瘍の腫瘍増殖を抑制するとともに、腫瘍内の乳癌細胞における ER α 発現が増加することを明らかにしている。さらに、がん細胞以外の細胞群である間質細胞での ER α 発現が上昇することを免疫組織化学染色により観察している。しかし、ER α の発現細胞群やその機能解析については解明できていない。
3. 既存の TNBC 治療薬であり殺細胞性の抗がん剤であるパクリタキセルは TNBC 細胞株及び TNBC 患者において YB-1 のリン酸化を上昇させることを観察している。

以上の検討により、TNBC においてリン酸化 YB-1 標的薬と既存の ER α 標的薬の併用療法が有効である可能性が示された。

2. 研究の目的

これまでの研究結果より、がん細胞自身における ER α 発現制御メカニズム及び適正化治療の創出に関してメカニズムや治療法を提示出来つつある。しかし、腫瘍微小環境中の ER α 発現が上昇している細胞群及びその細胞における ER α の機能については不明なままである。さらに、パクリタキセル等の既存の治療薬によるリン酸化 YB-1 発現上昇が ER α 発現に与える影響に関しても治療法の創出に向けて解明する必要がある。そこで、本研究では、間質細胞におけるリン酸化 YB-1 阻害薬による ER α 発現上昇メカニズム及びその機能解明することで、リン酸化 YB-1 標的薬を中心とした新たな治療方針を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株マウス同所移植実験

BALB/c nu/nu nude マウスに TNBC 細胞 (1.0×10^6 cells) を皮下移植した。移植後 6 日目に腫瘍径を測定し、Control 群、AKT/RSK/S6K 阻害薬 (50 mg/kg/mouse、連日経口投与) 投与群、tamoxifen (500 μ g/mouse、連日皮下投与) 投与群に分け、14 日間投与を行った。腫瘍系は 3 日おきに計測した。AKT/RSK/S6K 阻害薬は 0.5% hydroxypropyl methylcellulose (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd) McIlvaine buffer solution (pH 3.0; ナカライテスク) に溶解した。Tamoxifen は、100% エタノールに溶解後、peanuts oil (sigma) に懸濁し、250mg/50ml に調整し用いた。投薬開始後 14 日目に、麻酔下で腫瘍を回収した。腫瘍体積 (mm^3) は、長径 \times 短径 \times 短径 $\times 0.5$ として近似した。回収した腫瘍は、4% paraformaldehyde で固定を行い、一部を -80°C で保存しタンパク及び mRNA を回収した。

(2) 腫瘍内タンパク回収

腫瘍塊にプロテアーゼ阻害剤混合物を添加した T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA) を添加後、30 秒間ソニケーションにより破碎。20 分間氷上に静置し、15000rpm 10 分間遠心後、上清を回収。その後、Western-Blot 法によりタンパク発現を検討。

(3) がん間質細胞の FACS 解析

腫瘍組織をコラゲナーゼ及び DNaseI 含有の DMEM 中でホモジナイザーにより粉碎後、37 °C で 30 分インキュベート。その後、10%FBS DMEM により中和し、ピペッティングを行った後、100µm のセルストレーナーを用い single cell suspension を回収。PBS により 1 回洗浄後、 1×10^6 cells/100µl となるように懸濁した。細胞に蛍光標識抗 ERα 抗体及び各免疫細胞を標的とした抗体 (マクロファージ: F4/80・CD11b、好中球: Gr-1・CD11b、樹状細胞: CD11c、T 細胞: CD3、B 細胞: CD19、NK 細胞: CD56) を 4 °C で 20 分間浸し、遠心により洗浄した。PBS に懸濁後、CYTEK NL-3000 を用いて解析を行った。

(4) 免疫染色

MDA-MB231 皮下移植腫瘍は 4%パラホルムアルデヒド溶液で 6 時間固定後 20%スクロース溶液に 18 時間浸した。その後 OCT compound (Sakura finetek, Inc., Torrance, CA) に包埋し、液体窒素で凍結を行い、凍結切片を作製した。凍結切片を PBS で洗浄後、冷アセトンで 3 分間処理した。PBS で洗浄後 1%BSA 含有の PBS で 10 分間ブロッキングを行った後、抗 ERα 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD86 抗体、抗 CD206 抗体を用いて、4 °C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、fluoromount/plus (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA) を用いて封入した。共染色陽性部位を 5 視野以上撮影し、定量化を行った。染色陽性部位のピクセル数を Image J を用いて計測した。

4. 研究成果

- (1) リン酸化 YB-1 阻害により ERα 発現が上昇し ERα 標的薬に対する感受性を獲得することを明らかにした。また、TNBC 細胞におけるリン酸化 YB-1 による ERα 発現制御メカニズムを検討した結果、リン酸化 YB-1 が ERα タンパクを安定化させ発現を上昇させることを明らかにした。さらに、リン酸化 YB-1 阻害薬が TNBC 細胞株マウス同所移植腫瘍内のがん細胞及び間質細胞の ERα 発現に影響することを観察している。
- (2) TNBC 細胞株同所移植モデルを用い、YB-1 リン酸化標的薬と ERα 標的薬の併用効果について検討を行ったところ、相乗的な増殖抑制効果があることが観察された。さらに、がん微小環境中の細胞群の中でマクロファージでの ERα 発現がリン酸化 YB-1 阻害薬により増加していることがフローサイトメトリー解析により観察された。また、TNBC 腫瘍を回収し凍結切片を作成後、蛍光免疫染色を行った。その結果、腫瘍内のマクロファージにおいて ERα が発現しており、リン酸化 YB-1 阻害薬によりその発現が上昇していることが観察された。
- (3) 腫瘍内のマクロファージに関してさらに詳細な解析を行ったところ、腫瘍内の腫瘍促進的マクロファージ (M2 マクロファージ) において ERα が発現しており、リン酸化 YB-1 阻害薬によりその発現が上昇していることが観察された。
- (4) マウス腹腔内よりマクロファージを単離し、腫瘍促進的マクロファージ (M2) への分化実験を行った。その結果、YB-1 リン酸化標的薬は M2 マクロファージの ERα 発現を誘導し、ERα 標的薬は M2 マクロファージの生存を抑制することが明らかになった。

以上の結果から、リン酸化 YB-1 標的薬は癌細胞だけでなく腫瘍促進的マクロファージの ERα 発現に関わり、両者の ERα を標的とすることで ERα 標的薬の抗腫瘍活性を増強していると考えられる。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata Tomohiro, Cao Duo-Yao, Dar Tahir B., Ahmed Faizan, Bhat Shabir A., Veiras Luciana C., Bernstein Ellen A., Khan Abdul Arif, Chaum Manita, Shiao Stephen L., Tourtellotte Warren G., Giani Jorge F., Bernstein Kenneth E., Cui Xiaojiang, Vail Eric, Khan Zakir	4. 巻 14
2. 論文標題 miR766-3p and miR124-3p Dictate Drug Resistance and Clinical Outcome in HNSCC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5273 ~ 5273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14215273	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 Bhat Shabir A., Shibata Tomohiro, Leong Matthew, Plummer Jasmine, Vail Eric, Khan Zakir	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparative Upper Respiratory Tract Transcriptomic Profiling Reveals a Potential Role of Early Activation of Interferon Pathway in Severe COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2182 ~ 2182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14102182	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 Ohno Koichi, Shibata Tomohiro, Ito Ken ichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor activation confers resistance to lenvatinib in thyroid cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3193 ~ 3210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15465	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 Cao DuoYao, Veiras Luciana, Ahmed Faizan, Shibata Tomohiro, Bernstein Ellen A., Okwan-Duodu Derick, Giani Jorge F., Khan Zakir, Bernstein Kenneth E.	4. 巻 152
2. 論文標題 The non-cardiovascular actions of ACE	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170769 ~ 170769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2022.170769	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Takayuki, Oba Takaaki, Tanimoto Keiji, Shibata Tomohiro, Kamijo Shinobu, Ito Ken-ichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Tamoxifen resistance alters sensitivity to 5-fluorouracil in a subset of estrogen receptor-positive breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0252822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252822	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 Ono Mayu, Oba Takaaki, Shibata Tomohiro, Ito Ken-ichi	4. 巻 147
2. 論文標題 The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 3211 ~ 3224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-021-03722-3	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0件

〔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		
米国	Cedars-Sinai Medical Center		