

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591906

研究課題名(和文) BTG2発現低下による乳癌悪性化および上皮間葉転換・幹細胞増加のメカニズムの検討

研究課題名(英文) Loss of BTG2 expression in breast cancer progression

研究代表者

高橋 史行 (Takahashi, Fumiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70327823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が遊走能・浸潤能を獲得するには上皮間葉転換が重要であることが知られている。我々はBTG2遺伝子Knockdownはヒト乳腺上皮細胞において、HER2/HER3の活性化やAKT pathwayの活性化を誘導し、細胞遊走能・浸潤能を著明に亢進することを見出した。またIn vivoにおいてもH-Ras v12遺伝子を導入した乳腺細胞の同所移植において遠隔転移を著明に促進し、これらは分子標的治療薬Lapatinibの投与により著明に抑制された。BTG2発現低下は乳癌の転移・浸潤に関与するだけでなく、lapatinibに対して良好な治療反応性を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：EMT plays an important role in the tumor invasion and metastases. In human breast cancer, decreased BTG2 expression correlates with metastatic recurrence and decrease in overall survival, suggesting that suppression of BTG2 plays a critical role in disease progression. To analyze the role of BTG2 in breast cancer, BTG2 expression was knocked down in mammary epithelial cells. Suppression of BTG2 enhanced the motility of cells in vitro and enhanced tumor growth and metastasis in vivo. The effects of BTG2 knockdown were mediated through activation of HER2 and HER3, leading to elevated AKT phosphorylation. Suppression of HER activation using the lapatinib abrogated the effects of BTG2 knockdown, including the increased cell migration observed in vitro and the enhancement of tumorigenesis and metastasis in vivo. These results link BTG2-dependent effects on tumor progression, and raise the possibility that targeted inhibition of this pathway may be relevant in treatment breast cancers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 外科学一般

キーワード：乳癌 BTG2 転移 上皮間葉転換 Lapatinib

1. 研究開始当初の背景

わが国における乳癌の罹患率は増加の一途をたどっている。乳癌患者においては骨、肺、脳などの他臓器への遠隔転移の頻度も高く、外科手術・放射線治療・薬物療法などを組み合わせた集学的治療によっても、いまだ死亡率の低減化には至っておらず、乳腺上皮における癌の発生進展や薬物療法耐性のメカニズム解明は急務である。乳癌の発生・進展に關与する遺伝子としては c-erbB-2, c-myc, P53, BRCA1,2 などが良く知られているが、いまだその全容は解明されておらず、多数の未知乳癌関連遺伝子の存在が示唆されている。

B-cell translocation gene-2 (BTG2)は細胞増殖抑制活性をもつ BTG/Tob 蛋白質ファミリーの一員であり、Cyclin D1 発現を抑制して G1-S 移行を制御している。BTG2 はエストロゲン受容体を介する転写を制御し、また HoxB9 などの転写因子の Co-factor としても機能する(J Biol Chem 2000; 275: 147-53)。BTG2 は乳腺上皮細胞に発現しており、正常乳腺上皮細胞において、BTG2 発現レベルは乳腺が活発に発育・増殖する妊娠期・授乳期においては著明に低下し、退縮する授乳後には再び発現が回復することが報告されており、BTG2 発現低下は乳腺上皮細胞の増殖・発育と密接な關連があることが示唆されている (Oncogene 2004; 23: 8310-19)。また 148 症例の乳癌患者の癌組織での BTG2 の発現の検討では、その 46%において BTG2 発現は低下していること、また BTG2 発現低下は腫瘍の病理組織学的分化度・サイズと統計学的に有意に關連があることが報告されている(Cancer Res 2006; 66: 1-8)。これらは乳癌患者において BTG2 発現低下は予後不良因子であることを強く示唆するものであるが、非常に重要な予後規定因子である遠隔転移や薬物療法耐性と BTG2 遺伝子発現との關連性は未だ不明である。

2. 研究の目的

上皮間葉転換 (EMT)は細胞遊走能・浸潤能の獲得、および遠隔転移に重要な役割を演じている。また近年注目されている乳腺幹細胞あるいは乳癌幹細胞の存在は乳癌の発生・進展や転移・治療抵抗性を考えていく上で非常に重要である。本研究では乳腺上皮における BTG2 発現低下は、乳癌悪性化や遠隔転移・治療抵抗性に重要な役割を演じているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

Oncomine dataset の解析により、肺転移を有する乳癌患者群と肺転移の無い患者群における乳癌組織での BTG2 発現を比較検討する。

またヒト乳腺上皮細胞あるいは乳癌細胞における BTG2 遺伝子発現を検討し、その knockdown あるいは Overexpression が及ぼす影響を下記のように検討する。

Oncomine dataset の解析

肺転移を有する乳癌患者群(n=14)と肺転移の無い患者群(n=51)での乳癌組織での BTG2 発現を Oncomine dataset を用いて解析する。また他にも血管浸潤、リンパ管浸潤や5年後の治療再発と BTG2 発現の關連を解析する。

ヒト乳腺・乳癌細胞株における BTG2 遺伝子の発現検討

正常ヒト乳腺上皮細胞株である MCF10A や HMEC 細胞、またヒト乳癌細胞株である MCF7 や細胞遊走能・浸潤能が非常に高く間葉系の性格の強い乳癌細胞株である MDA-MB-231 における BTG2 遺伝子発現を検討する。

乳腺上皮細胞における BTG2 遺伝子 knockdown および Overexpression

ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A, HMEC 細胞に ShBTG2 レンチウイルス・ベクター(pLKO1 vector)を用いて BTG2 遺伝子を Knockdown する。また BTG2 発現 pLenti6/V5 レンチウイルス・ベクターを用いて、MCF10A ShBTG2 あるいは MDA-MB-231 に BTG2 遺伝子を導入する。

細胞遊走能・浸潤能および EMT 關連因子の解析

ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A, HMEC 細胞に ShBTG2 ベクターを用いて BTG2 遺伝子を Knockdown して、Boyden-chamber を用いた細胞遊走能・浸潤能の評価、細胞形態の変化、F-Actin の再構成、Western blot による上皮系および間葉系マーカーの検討などを行う。また BTG2 遺伝子の Restoration でも上記と同様に解析し、BTG2 発現との關連をより詳細に検証する。

抗癌剤あるいは放射線治療の感受性・耐性に及ぼす影響の検討

MCF10A、HMEC、MCF10A H-Ras^{v12}、MDA-MB-231 細胞などを用いて、BTG2 遺伝子 knockdown あるいは restoration の抗癌剤・放射線治療の感受性・耐性に及ぼす影響を検討する。抗癌剤は Cisplatin, Adriamycin, Paclitaxel などを使用し、抗癌剤暴露後の生存細胞は WST-8 で確認、またアポトーシスの評価も同時に行っていく。アポトーシスの評価は Cleaved caspase 3 のウエスタンブロットなどで評価する。放射線照射(10, 8, 6, 4, 2 Gy など)でも同様に評価し、これらの細胞治療抵抗

性と BTG2 遺伝子発現との関連性についても検討していく。

ErbB receptor pathway の検討

乳腺上皮細胞あるいは乳癌細胞の増殖・遊走・浸潤能において ErbB receptor pathway は極めて重要である。BTG2 遺伝子発現と EGFR/HER2/HER3 のリン酸化や AKT, MAPK pathway との関連性についてもウエスタンブロットなどで検討する。また HER3 のリガンドである Neuregulin の発現と BTG2 遺伝子発現との関連も同時に検討する。

Neuregulin mRNA 発現と BTG2 遺伝子発現との関連

BTG2 遺伝子 knockdown が Neuregulin mRNA 発現および安定性に及ぼす影響を検討するために、Actinomycin D を用いて転写を抑制し、MCF10A ShBTG2 と ShControl での Neuregulin mRNA 発現量を qPCR 等で検証する。

In vivo マウスモデルを用いた BTG2 遺伝子 knockdown の乳腺細胞の悪性化および乳癌細胞の遠隔転移に及ぼす影響の検討

MCF10A ShBTG2 単独ではヌードマウスへの *in vivo* 移植で腫瘍形成は認めなかったため、H-Ras^{v12} 遺伝子を MSCV-IRES-GFP vector に導入して MCF10A H-Ras^{v12} 細胞を作成した。この細胞はマウス乳腺への同所移植で腫瘍を形成し、また GFP で標識されているために蛍光顕微鏡下で *in vivo* における遠隔臓器への転移の観察が可能である。コントロール細胞群である MCF10A H-Ras^{v12} ShLuc と MCF10A H-Ras^{v12} ShBTG2 をマウス乳腺へ同所移植して、BTG2 遺伝子 Knockdown が肺・肝臓・骨髄への遠隔転移に及ぼす影響を検討する。転移の評価は蛍光顕微鏡下での GFP 陽性の結節数をカウントすることで評価する。また腫瘍形成能は腫瘍の長径と短径を計測して、Tumor volume を算定する。

分子標的治療薬 Lapatinib の効果の検討

分子標的治療薬 Lapatinib は EGFR/HER2 の Tyrosine kinase inhibitor で、特に HER2 陽性の乳癌患者で効果が高いことが知られている。前述の MCF10A H-Ras^{v12} ShLuc と MCF10A H-Ras^{v12} ShBTG2 のマウス乳腺への同所移植モデルを用いて、75 mg/kg Lapatinib を経口投与して、BTG2 発現と Lapatinib による抗腫瘍効果および転移抑制効果を検討する。また BTG2 発現低下による HER2/HER3 のリン酸化や Neuregulin 発現亢進、AKT 活性化、細胞遊走能・浸潤能の亢進などに対する Lapatinib の抑制効果などもウエスタンブロットや Boyden-chamber などを用いて検証する。

4. 研究成果

Oncomine dataset の解析では、肺転移を有する乳癌患者群(n=14)では肺転移の無い患者群(n=51)に比して有意に乳癌組織での BTG2 発現は低下していた (P = 0.000019)。また血管浸潤やリンパ管浸潤のあった乳癌患者における BTG2 発現も有意に低下していた (P < 0.0001)。BTG2 発現低下は、5 年後における治療再発ともやはり統計学的に優位な相関を認めた (P < 0.0001)。これらは乳癌患者における BTG2 発現低下は癌悪性化や遠隔転移に関与し、予後不良因子であることを強く示唆するものと考えられた。

ヒト乳腺・乳癌細胞株における定量的 PCR による BTG2 遺伝子発現検討では、正常ヒト乳腺上皮細胞である MCF10A(Epithelial type) で BTG2 の発現が最も高く、悪性度・遊走能・浸潤能の高い乳癌細胞株である MDA-MB-231 (Mesenchymal type)において BTG2 発現は最も低く、乳腺細胞の悪性化・遊走能・浸潤能と BTG2 発現低下は密接に関連していた。

BTG2 遺伝子 Knockdown はヒト乳腺上皮細胞である MCF10A や HMEC において、HER2/HER3 の活性化や HER3 のリガンドである Neuregulin の発現亢進、AKT pathway の活性化を誘導し、細胞遊走能・浸潤能を著明に亢進することを見出した。また BTG2 発現が最も低かった MDA-MB-231 への BTG2 遺伝子の Overexpression は、HER2/HER3 のリン酸化や AKT の活性化を著明に抑制し、細胞遊走能・浸潤能も有意に低下させた。同時に MCF10A ShBTG2 に BTG2 発現 pLenti6/V5 レンチウイルス・ベクターを用いて BTG2 発現を Restoration したところ、ShBTG2 によって惹起された HER2/HER3 の活性化や Neuregulin 発現亢進、AKT 活性化や、細胞遊走能・浸潤能の亢進は reverse された。また ShBTG2 によって惹起された AKT 活性化や細胞遊走能・浸潤能の亢進は、Neuregulin の siRNA による knockdown でも reverse され、Neuregulin は BTG2 発現低下によって引き起こされる HER3 活性化や AKT 活性化、細胞遊走能・浸潤能の亢進に重要な役割を果たしていると考えられた。BTG2 と Neuregulin との相関をより詳細に検討するために、Actinomycin D を用いて転写を抑制したところ、MCF10A ShBTG2 では ShControl と比較して Neuregulin mRNA 発現量の低下が著明に遅延しており、BTG2 の発現は Neuregulin mRNA の安定性に寄与しているものと考えられた。

MCF10A における BTG2 Knockdown は抗癌剤である Cisplatin や Doxorubicin に対して抵抗性を誘導することも見出した。また BTG2 Knockdown は同時に放射線照射(10, 8, 6, 4, 2 Gy など)に対しても有意に抵抗性を示し、こ

これらの結果は BTG2 発現低下は治療抵抗性と密接な相関があることを強く示唆していると考えられた。これら殺細胞性の抗癌剤とは逆に、BTG2 Knockdown は分子標的治療薬 Lapatinib に対する感受性を亢進させた。

MCF10A ShBTG2 単独ではマウスでの *in vivo* 腫瘍形成は認めなかったため、H-Ras v12 遺伝子を MCF10A 細胞に導入した。BTG2 Knockdown は Oncogen である H-Ras v12 と cooperative に HER3 活性化や AKT 活性化、細胞遊走能・浸潤能を促進し、また 3D-マトリゲル培養においても、著明に浸潤能の亢進が認められた。またマウス乳腺への同所移植において、BTG2 Knockdown は MCF10A H-Ras v12 の肺・肝臓・骨髄への遠隔転移を著明に促進し、これらは分子標的治療薬 Lapatinib の投与により著明に抑制された。Lapatinib はコントロール群(ShLuc 群)においては有意な抗腫瘍効果は示さなかった。また Lapatinib は、*In vitro* においても H-Ras v12 と cooperative な BTG2 発現低下による HER3 活性化や AKT 活性化、細胞遊走能・浸潤能亢進を顕著に抑制した。

本研究での Oncomine dataset の解析や *In vitro*, *Inv vivo* での実験結果は、BTG2 発現低下は乳癌の遠隔転移・浸潤や抗癌剤・放射線治療抵抗性に関与していることを強く示唆している。そして現在、実地診療で用いられている Cisplatin や Doxorubicin などの殺細胞性抗癌剤に対しては抵抗性に寄与しているが、ErbB receptor に対する分子標的治療薬である lapatinib に対しては良好な治療反応性を予測するバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

本研究の成果は乳腺上皮における癌の進展・遠隔転移や薬物療法耐性などのメカニズムを考えていくうえで非常に重要であり、BTG2 は乳癌治療の良い標的分子となりうること、また上述のように、臨床上、有用なバイオマーカーとなりうることを強く示唆している。今後は EMT あるいは幹細胞性との関連について解析・検証してゆく予定である。また BTG2 は BTG/Tob 蛋白質ファミリーの一員であり、Tob (Transducer of ErbB2)は HER2 と相互作用する分子として同定されており、BTG2 も HER2 と何らかの蛋白相互作用を有している可能性がある。上記の細胞に HER2 レトロウイルスベクターを導入して、HER2 と BTG2 との蛋白相互作用も詳細に解析してゆく。また BTG2 は転写因子である HoxB9 の Co-factor としても機能することが報告されている。HoxB9 の発現も乳腺上皮細胞あるいは乳癌細胞の HER2/HER3 の活性化や AKT 活性化、細胞遊走能・浸潤能の亢進に寄与しており (*Proc Natl Acad Sci USA* 107:1100-5. 2010)、BTG2 と HoxB9 との相互作用および

バイオマーカーとしての意義についても今後検討してゆく予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Murakami A*, **Takahashi F***, Nurwidya F, Kobayashi I, Minakata K, Hashimoto M, **Nara T**, et al. Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor.

(* **First two authors contributed equally to this work.**)

PLoS One 28;9(1):e86459 (2014)

2. Kuriyama S, Morio Y, Toba M, Nagaoka T, **Takahashi E**, Seyama K, Takahashi K.

Genistein attenuates hypoxic pulmonary hypertension via NO and erythropoietin system
Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol in press (2014)

3. Ando K, **Takahashi F**, Motojima S, Nakashima K, Kaneko N, Hoshi K, Takahashi K. Tocilizumab, anti-interleukin 6 receptor antibody, the new approach to cancer cachexia.

J Clin Oncol 31(6):e69-72. (2013)

4. Shiota S, Takekawa H, Matsumoto S, Takeda K, Nurwidya F, Yoshioka Y, **Takahashi F**, Hattori N, Tabira T, Motizuki H, Takahashi K.

Chronic intermittent hypoxia/reoxygenation facilitate amyloid- β generation in mice.
J Alzheimers Dis. 37(2):325-33 (2013)

5. Chiba N, Cornalis V, Shiotani B, **Takahashi F**, Shimada T., Tajima K., et al.

HomeoboxB9 induces epithelial-to-mesenchymal transition-associated radioresistance by accelerating DNA damage responses.

Proc Natl Acad Sci USA 109(8):2760-5. (2012)

6. Minakata K*, **Takahashi F***, **Nara T**, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, et al. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors.

(* **First two authors contributed equally to this work.**)

Cancer Science 103(11):1946-54. (2012)

7. Nurwidya F, **Takahashi F**, Murakami A, Takahashi K.

Epithelial mesenchymal transition in drug resistance and metastasis of lung cancer.

Cancer Res Treat 44:151-6. (2012)

8. Yae S*, **Takahashi F***, Yae T, Yamaguchi T,

Tsukada R, Koike K, Minakata K, Murakami A, Nurwidya F, Kato M, Tamada M, Yoshitake M, Kobayashi H, Seyama K, Takahashi K Hochuekkito (TJ-41), a Kampo formula, ameliorates cancer cachexia induced by colon 26 adenocarcinoma in mice.

(* **First two authors contributed equally to this work.**)

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012;976926 (2012)

9. Nurwidya F, Murakami A, **Takahashi F**, Takahashi K.

Lung cancer stem cells: Tumor biology and clinical implications.

Asia Pac J Clin Oncol. 8:217-222. (2012)

10. **Takahashi F**, Chiba N, Tajima K, Hayashida T, Shimada T, Takahashi M, et al.

Breast tumor progression induced by loss of BTG2 expression is inhibited by targeted therapy with the ErbB/HER inhibitor lapatinib

Oncogene 30(27):3084-95. (2011)

11. Hayashida T*, **Takahashi F***, Chiba N., Brachtel E., Takahashi M., et al.

8. HoxB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis.

(* **First two authors contributed equally to this work.**)

Proc Natl Acad Sci USA 107(3):1100-5. (2010)

12. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, **Takahashi F**, Maheswaran S, et al.

A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations.

Cell 141(1):69-80. (2010)

13. Tajima K, Ohashi R, Sekido Y, Hida T, **Nara T**, Hashimoto M, Iwakami S, Minakata K, Yae T, **Takahashi F**, Saya H, and Takahashi K.

Osteopontin mediates multidrug resistance of human mesothelioma cells through regulation of CD44 binding to hyaluronate

Oncogene 29(13):1941-51. (2010)

〔学会発表〕(計2件)

高橋史行、高橋元美、田島健ら

BTG2 発現低下による癌悪性化と EGFR-TKI 治療感受性の検討

第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012

高橋史行、高橋元美、田島健ら

BTG2 発現低下による癌悪性化および上皮間葉転換(EMT)のメカニズムの検討

第 51 回日本呼吸器学会学術講演会 2011

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋史行 (TAKAHASHI, Fumiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70327823

(2)研究分担者

奈良武司 (NARA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40276473