

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591909

研究課題名(和文) 乳癌におけるMACC1の解析、特にERαとの関連についての解析

研究課題名(英文) The role of MACC1 in breast cancer

研究代表者

山本 豊 (YAMAMOTO, YUTAKA)

熊本大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：20398217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規転写因子であるMACC1はcMetの転写を介して大腸癌の進展や転移に関与していることが示されている。今回、我々は乳癌におけるMACC1の役割について臨床検体および細胞株を用いて検討した。

原発乳癌においてMACC1発現が減弱すると有意に予後不良であり、大腸癌の報告とは異なる結果であった。細胞株を用いた検討では、MACC1発現は乳癌細胞株よりも大腸癌細胞株で高く、大腸癌細胞株ではMACC1がcMetの転写を誘導していたが、乳癌細胞株では同様の現象が確認できなかった。以上より、MACC1の役割が大腸癌と乳癌では異なることが示された。

研究成果の概要(英文)：MACC1 is suggested to be a transcriptional regulator of cMet, leading to cancer progression and metastasis in colorectal cancer (CRC). So far, the role of MACC1 in breast cancer (BC) has scarcely been investigated. Here, we report its impact on the survival for BC patients and biological function in the cell lines. Reduced MACC1 expressions were associated with BC patient's mortality. In the cell lines, MACC1 expression was much higher in CRC cells than BC cells. In MACC1 transfected cells, MACC1 overexpression did not induce cMet expression in BC cells, whereas corresponding cMet expression was slightly upregulated in CRC cells. Moreover, the binding of MACC1 to the cMet promoter was suggested in CRC cells, but not in BC cells by ChIP assay. Our findings provide some novel insights into the role of MACC1 for BC, as it was inconsistent with previous studies. There is possibility that MACC1 would not modulate cMet signaling as a transcriptional factor for BC.

研究分野：乳腺腫瘍学

キーワード：MACC1 cMet 乳癌 予後因子 転写因子

1. 研究開始当初の背景

我々は現在まで乳癌に関する種々の生物学的因子の臨床的意義や腫瘍生物学的な意義について検討し、報告してきた。

Hepatocyte growth factor (HGF)-cMet 系は癌細胞の増殖、遊走、浸潤や血管新生に関与しており癌の生存、増殖、転移に重要な役割を果たしている。乳癌においても HGF や cMet は予後不良因子の一つである。また、cMet はトラスツズマブ耐性と関連があることも報告されている。最近この cMet 発現が新規転写因子 MACC1 により制御されていることが報告されている¹⁾。大腸癌では MACC1 は正常大腸粘膜より大腸癌で高発現しており、さらに原発癌に比べ転移癌で有意に高発現していた。さらに MACC1 発現は独立した予後不良因子であった。大腸癌細胞株では MACC1 は cMet の転写を促進し、細胞増殖、遊走、浸潤に関与していることが報告されている¹⁾。

上述の如く、乳癌において HGF-cMet 系は悪性化に関与しているため、我々は preliminary に原発乳癌 100 例における MACC1 発現を quantitative RT-PCR 法で検討した。乳癌では大腸癌と異なり MACC1 高発現例では有意に予後が良好であった (log-rank test $p=0.0041$ 、図 1)。MACC1 発現と臨床病理学的因子との比較では、MACC1 mRNA 発現はエストロゲン受容体 (ER-alpha) ($p=0.0073$) およびプロゲステロン受容体 (PR) ($p=0.0124$) タンパク発現と正の相関関係を認めた。また、MACC1 mRNA 発現と cMet mRNA 発現とは相関がなかった。これらのデータから、乳癌において MACC1 は ER-alpha と関連があり、このことが乳癌全体として予後良好と関連している可能性が示唆された。また、MACC1 は乳癌では cMet 遺伝子発現に関与していない可能性も示唆された。つまり、乳癌における MACC1 の役割は大腸癌と大きく異なることが示唆された。これらの臨床検体での結果を踏まえて、MACC1 が新規の ER-alpha 調節

因子の可能性があり、MACC1 の ER-alpha 発現調節機構について検討することは意義あるものと考えた。また、MACC1 による ER-alpha 発現調節が行われていることが示された場合はホルモン療法の効果との関連についても検討する。さらに、乳癌において cMet 発現調節における MACC1 の関与が少ないことが考えられるため、新規の cMet 発現調節因子の検索も行う。

2. 研究の目的

HGF-cMet 系は癌の生存、進展、転移に深く関与している。MACC1 は cMet の転写因子の一つであり、大腸癌では c-Met 遺伝子の発現調節を介して予後不良に関与している。しかしながら、乳癌における我々の preliminary な検討では MACC1 は予後良好因子であり、ER-alpha 発現と強い相関があることを見出している。また、乳癌では MACC1 と cMet 発現は相関しなかった。乳癌では MACC1 は大腸癌とは異なる役割を果たしている可能性が示唆されるため、今回、乳癌における MACC1 の臨床病理学のおよび腫瘍生物学的意義を検討する。特に MACC1 による ER-alpha 発現調節やホルモン療法への影響を検討する。さらに、乳癌における cMet 発現調節に関わる新規因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

1) 乳癌における MACC1-cMet-HGF 系発現の意義について

a) 臨床検体を用いた検討

乳癌組織 300 例を用いて MACC1 発現と cMet および HGF 発現との関連性を検討する。特に乳癌サブタイプ別にこれらの因子発現につき検討する。また、予後についても検討する。

b) 乳癌細胞株を用いた検討

各サブタイプ毎の細胞株を用いて、MACC1 および cMet 発現を検討し、MACC1 が発現株では siRNA による遺伝子発現抑制を行う。MACC1 発現のない細胞株には遺伝子導入を行う。各細胞株での遺伝子調節後、cMet 発現の変化を

検討する。さらに、癌細胞の遊走、浸潤、増殖について検討する。

4. 研究成果

臨床検体を用いた検討

原発乳癌組織 300 例において、quantitativeRT-PCR 法にて MACC1、cMet、HGF mRNA 発現を、IHC 法にて MACC1 タンパク発現を検討した。このうち 172 例においては正常組織と腫瘍組織で各因子の mRNA 発現を比較検討した。cMet、HGF では腫瘍組織で有意に発現が高い傾向であったが (Wilcoxon $P < 0.001$)、MACC1 においては両者で有意差を認めなかった。予後については、他の消化器系癌と異なり、MACC1 mRNA 及び蛋白高発現で有意に予後が良好であった (Log-rank $P = 0.0371$ 、Wilcoxon $P = 0.001$)。サブタイプ別の検討では、luminal (ER+/HER2-)、HER2 (ER+/-/HER2+) では MACC1 タンパク発現による予後の違いは見られなかったが、triple-negative (ER-/HER2-) では有意に MACC1 高発現で予後良好であった (Log rank $P = 0.017$)

MACC1 発現と、他の臨床病理学的因子 (年齢、閉経状況、腫瘍径、リンパ節転移、病期、ホルモン受容体、HER2、ki67、核グレード、サブタイプ) との関連を検討したところ、サブタイプのみ関連を認め、triple-negative では MACC1 低発現が多く見られた ($P = 0.04$)。ホルモン受容体 (ER, PR) との関連は認めなかった。

また、大腸癌では MACC1 は cMet の転写因子であることが示唆されているが、今回の検討では MACC1 蛋白発現と、cMet mRNA 発現において相関は見られなかった (Spearman $\rho = 0.16$, $P = 0.05$)

上記の因子を含めた、Cox 比例ハザードモデルによる単変量・多変量解析では、MACC1 mRNA 発現は RFS、BCSS とともに独立した予後因子であった。MACC1 タンパク発現は BCSS においてのみ有意な予後因子であった。

乳癌細胞株を用いた検討

各サブタイプの細胞株 (MCF7、T-47D (ER 陽性、HER2 陰性) MDA-MB-453、SK-BR-3 (ER 陰性、HER2 陽性) MDA-MB-468、MDA-MB-231 (ER 陰性、HER2 陰性) より mRNA を抽出し、MACC1、cMet、HGF 発現をそれぞれ検討した。MACC1 発現は、HER2 タイプの細胞株 (MDA-MB-453、SKBR3) で高い傾向であった。Triple-negative タイプである MDA-MB-231 では低発現であったが、その他の細胞株では、いずれも正常乳腺細胞株 (HMEC) より高発現であった。cMet においては MDA-MB-453 細胞株、T47D 細胞株で高発現していた。

また、Western blot 法を用いてタンパク発現を検討したところ、大腸癌細胞株である DLD-1 と比べ、乳癌細胞株では全体的に MACC1 タンパク発現が低い傾向にあった。cMet に関しては、triple-negative である MDA-MB231、MDA-MB-468、HER2 タイプである SKBR3 でタンパク発現が高い傾向にあり、mRNA の結果とは乖離していた。

MCF7、MDA-MB-468 細胞株において、siRNA による MACC1 遺伝子発現抑制を行った。WST アッセイを用いて癌細胞の細胞増殖能を、スクラッチテストにより遊走能を、Matrigel invasion アッセイにより遊走・浸潤能の変化をそれぞれ検討した。MCF7 細胞株において MACC1 mRNA 発現を 60-70% 抑制させたところ、細胞形態、増殖能、遊走・浸潤能、いずれも変化は見られなかった (図 9a-d)。また HGF/cMet の mRNA 発現も変化は見られなかった。

一方、triple negative タイプである MDA-MB-468 細胞株で MACC1 遺伝子発現を 80% 抑制したところ、細胞形態、増殖能、遊走能に変化は認めなかったが、浸潤能においては control siRNA を導入した細胞株に比べ、MACC1 siRNA を遺伝子導入した細胞株で、有意に浸潤能が亢進していた ($P < 0.05$)。HGF/cMet の mRNA 発現の変化は見られなかった。

更に、MACC1 抑制状態での、他の遺伝子群の変化を調べるため、リアルタイム PCR array による遺伝子プロファイリング (QIAGEN; RT² Profiler PCR Array) を行った。MDA-MB-468 細胞株で、MACC1siRNA 群と controlsiRNA 群 (n=3) それぞれから mRNA を抽出し、84 種類のパスウェイ特異的遺伝子について 2 群間での相対発現レベルを比較した。MACC1 遺伝子を抑制した群では、TGF 1、CSF1 の発現が有意に上昇、CCND2 の発現が有意に低下していた (いずれも fold change>2、P<0.05)。また、統計学的有意差は認めなかったが、細胞接着能に關与する遺伝子群 (CSF1, CTNNB1, CDH1, ERBB2, TGFB1) が上昇している傾向にあった。

次に、MACC1 遺伝子を導入した細胞株において同様の变化を調べるため、MACC1ORF を有するプラスミド (pFN28K CMV-neo MACC1) を作製した。カスタム型プラスミドである pFN21A CMV-MACC1 より MACC1 ORF を切断し、pFN28K CMV-neo ベクターへ結合させた。これを大腸菌 (Competent cell DH5) へ形質転換し、数個のコロニーより目的遺伝子を有するプラスミドのみ選別した。制限酵素 (SgfI, PmeI) で切断後、アガロース電気泳動にてインサート DNA、Vector を確認した。その後、MCF7 細胞株へエレクトロポーション法にて遺伝子導入し、48、72 時間後にタンパク発現していることを確認した。

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1件)

Sueta A, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Hayashi M, Takeshita T, Yamamoto S, Omoto Y, Iwase H. Differential role of MACC1 expression and its regulation of the HGF/c-Met pathway between breast and colorectal cancer. Int J Oncol. 2015 May;46(5):2143-53. (査読有り) doi: 10.3892/ijo.2015.2907

〔学会発表〕(計1件)

Sueta A, Yamamoto Y, Hayashi M, Takeshita T, Ibusuki M, Iwase H. A

role of MACC1 expression and its regulation of the HGF/c-Met pathway in breast cancer. 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium Dec 13, 2014 San Antonio, TX, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 豊 (YAMAMOTO Yutaka)
熊本大学医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：20398217

(2) 研究分担者

指宿 睦子 (IBUSUKI Mutsuko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：30448526

岩瀬 弘敬 (IWASE Hirotaka)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40211065

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号：