

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650646

研究課題名(和文) Y ボックス結合蛋白 1 (YB-1) を標的としたがん克服への新しい取り組み

研究課題名(英文) Novel approach to overcome malignant cancer by targeting Y-box binding protein-1(YB-1)

研究代表者

桑野 信彦 (Kuwano, Michihiko)

九州大学・薬学研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：80037431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：HER2の過剰発現は胃癌患者の予後不良因子である。現在、HER2標的抗体製剤であるハーセプチン(トラスツズマブ)はHER2陽性胃癌患者に対し使用され奏効を示している。

本研究では、Y-ボックス結合蛋白質-1 (YB-1)が胃癌細胞の増殖因子受容体の中で特異的にHER2発現を制御し、EGFR/HER2チロシンキナーゼ阻害薬ラパチニブの感受性の指標となり得ることを明らかにした。さらに、胃癌患者において核内YB-1発現とHER2発現が有意に相関することが明らかにした。YB-1-HER2が胃癌の分子標的治療適正化と新しい分子病態の把握に向けて有用なバイオマーカーとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：HER2 overexpression is a predictive factor of poor prognosis in patients with gastric cancer. Currently, the HER2-targeted antibody, trastuzumab, has improved the efficacy of therapy for HER2-positive advanced stomach cancer. This study demonstrated that Y-box binding protein-1 (YB-1) knockdown suppressed the expression of HER2, affecting drug resistance to lapatinib, a dual kinase inhibitor of EGFR and HER2, in gastric cancer cells. Moreover, nuclear YB-1 expression was also specifically correlated with expression of HER2 in human gastric cancer. YB-1-HER2 axis could thus contribute to further development of personalized therapeutics by HER2-targeted drugs against gastric cancer.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：YB-1核内局在 予後不良因子 HER2発現 ER 発現 乳癌 胃癌 YB-1標的治療 分子標的薬感受性

1. 研究開始当初の背景

Y-ボックス結合蛋白質-1(YB-1)は Cold Shock Domain(CSD)を含む原始的な多機能制御因子であり、がんの多剤耐性獲得、増殖また細胞周期に重要な役割を担っている。さらに、YB-1 の核内発現は乳癌、肺癌、卵巣癌など様々ながんの悪性化に關与している。そのため、YB-1 及び YB-1 の制御因子を標的とした治療戦略の創出が重要である。

現在までに、我々は乳癌や肺癌において YB-1 が増殖因子受容体の中で HER2 の発現をより特異的に制御することを報告している。他方、近年 HER2 陽性胃癌患者に対する第 3 相臨床試験で HER2 標的抗体製剤ハーセプチンと他抗がん剤との併用の有効性が報告され、胃癌に対する HER2 標的薬の使用が注目されている。以上の背景から YB-1 に着目し胃癌の治療標的である HER2 の発現制御メカニズムの解明及び HER2 標的薬の感受性の制御メカニズムの解明が必要と考えた。

2. 研究の目的

(1) 乳癌細胞や肺癌細胞において核内 YB-1 発現と HER2 発現の關連が強いことから、胃癌細胞で YB-1 が HER2 発現を制御し得るか否か明らかとする。

(2) 胃癌細胞において核内 YB-1 発現が HER2 標的薬剤の感受性と關連があるか否かを明らかとする。

(3) 胃癌患者の臨床検体において核内 YB-1 発現と HER2 を含めた EGF 受容体ファミリー発現に關連があるか否かを明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株において、YB-1 が HER2 発現を制御するか否か検討：様々な胃癌細胞を用いて、YB-1 siRNA 処理による YB-1 ノックダウン時の HER2 発現をウエスタンブロット法、real time RT-PCR 法により解析した。

(2) YB-1 による HER2 制御機構の解明：YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合をクロマチン免疫沈降法により検討した。

(3) 胃癌細胞株において、YB-1 が HER2 標的薬の感受性に關連するか否か検討：胃癌細胞を用いて、YB-1 siRNA 処理後のラパチニブ (EGFR/HER2 チロシンキナーゼ阻害薬) に対する感受性を生細胞数により評価した。

(4) 胃癌患者において、核内 YB-1 の発現と HER2 発現に關連があるか否か検討：胃癌患者 111 例における、核内 YB-1、EGFR、HER2、HER3、CDC6 発現について各因子に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

図1. YB-1は胃癌でのHER2標的薬剤の感受性の指標となる

(a) YB-1発現抑制によりHER2発現が減少,
(b) YB-1発現抑制によりラパチニブ(EGFR/HER2阻害薬)に対する感受性が低下,

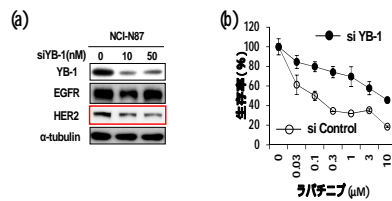
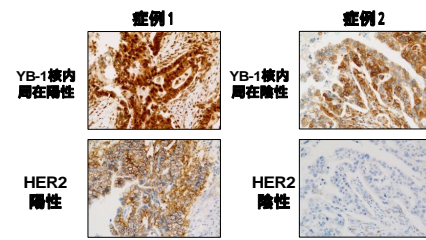


図2. 胃癌患者の連続切片において、核内YB-1陽性細胞でHER2の高発現が観察された。



4. 研究成果

(1) siRNA を用いた YB-1 ノックダウン条件下でヒト胃癌細胞の HER2 の mRNA 及びタンパク質発現が特異的に低下した(図 1a)。

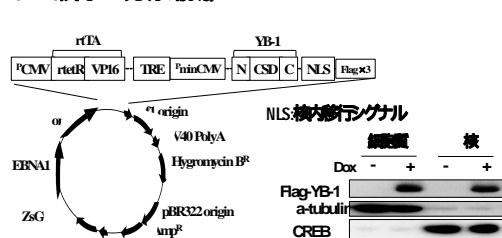
(2) クロマチン免疫沈降法により YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合が確認された。

(3) HER2 遺伝子増幅を示す胃癌細胞株において、YB-1 ノックダウンによりラパチニブに対する感受性が低下し (図 1b)、さらに下流シグナルの Akt の活性化が維持されていた。

(4) 胃癌患者における臨床検体を対象に行った免疫組織染色解析から HER2 発現と YB-1 の核内高発現が有意に關連した。さらに、YB-1 の核内発現は予後不良と有意に關連した。

(5) 胃癌患者の連続切片を用いた検討結果から、核内 YB-1 陽性細胞で HER2 が高発現していることが観察された(図 2)。

図3. 核内YB-1発現抑制系(Tet-Onシステム)-Doxycycline(Dox)によって核内YB-1発現の誘導



本研究で、我々は胃癌細胞において YB-1 がその治療標的として重要である HER2 の発現を制御し HER2 標的薬の感受性を制御することを明らかとした。本研究により明らかと

なった YB-1-HER2 の関連がハーセプチンなどの胃癌の分子標的治療適正化の実践に向けて有用なバイオマーカーとなることを期待している。

現在、我々は YB-1 の Tet-On システムにより核内 YB-1 発現を誘導する系(図3)を構築しており、動物実験系を用い YB-1 誘導の HER2 発現と HER2 標的薬に対する感受性の関連を治療実験により検討を行うことが可能となった。そのため、本研究を推進することで、今後の YB-1 の基礎及び臨床研究をさらに発展させたい。

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)

Nishio, S., Ushijima, K., Yamaguchi, T., Sasajima, Y., Tsuda, H., Kasamatsu, T., Kage, M., Ono, M., Kuwano, M., and Kamura, T. Nuclear Y-box-binding protein is a poor prognostic marker and related to epidermal growth factor receptor in uterine cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 132:703-708, 2014. doi: 10.1016/j.ygyno. 2014. 01. 045.

Azuma, K., Kawahara, A., Sonoda, K., Nakashima, K., Tashiro, K., Watari, K., Izumi, H., Kage, M., Kuwano, M., Ono, M., and Hoshino, T. FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget*, in press, 2014.

Okazaki, H., Matsunaga, N., Fujioka, T., Okazaki, F., Akagawa, Y., Tsurudome, Y., Ono, M., Kuwano, M., Koyanagi, S., and Ohdo, S. Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 74:543-551, 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3241.

Imada, K., Shiota, M., Kohashi, K., Kuroiwa, K., Song, Y., Sugimoto, M., Naito, S., Oda, Y. Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression. *Clin. Cancer Res.*, 4638-4650, 2013. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3705.

Fushimi, F., Taguchi, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M., Ono, M., Nakashima, Y., Takesue, T., Naito, S., and Oda, Y. Peroxiredoxins, thioredoxin, and Y-box-binding protein-1 are involved in the pathogenesis and progression of dialysis-associated renal cell

carcinoma. *Virchows Arch*, 463, 553-562, 2013. doi: 10.1007/s00428-013-1460-y. Kanda, R., Kawahara, A., Watari, K., Murakami, Y., Sonoda, K., Maeda, M., Fujita, H., Kage, M., Uramoto, H., Costa, C., Kuwano, M., and Ono, M. Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin 1/Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer Res.*, 73; 6243-6253, 2013. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-12-4502.

Murakami, Y., Watari, K., Shibata, T., Uba, M., Ureshino, H., Kawahara, A., Abe, H., Izumi, H., Mukaida, N., Kuwano, M., and Ono, M. N-myc downstream-regulated gene 1 promotes tumor inflammatory angiogenesis through JNK activation and autocrine loop of interleukin-1 by human gastric cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 288, 25025-25037, 2013. doi: 10.1074/jbc. M113.472068.

Shibata, T., Kan, H., Murakami, Y., Ureshino, H., Watari, K., Kawahara, A., Kage, M., Hattori, S., Ono, M., Kuwano, M. Y-box binding protein-1 (YB-1) contributes to both HER2/ErbB2 expression and lapatinib sensitivity in human gastric cancer cells. *Molec. Cancer Therapeut.*, 12, 737-746, 2013. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1125. Ogi, S., Fujita, H., Kashiwara, M., Yamamoto, C., Sonoda, K., Okamoto, I., Nakagawa, K., Ohdo, S., Tanaka, Y., Kuwano, M., Ono, M. Sorting nexin 2-mediated membrane trafficking of c-Met contributes to sensitivity of molecular targeted drugs. *Cancer Sci.*, 104 : 573-583, 2013. doi: 10.1111/cas. 12117.

Ureshino, H., Murakami, Y., Watari, K., Izumi, H., Kawahara, A., Kage, M., Arao, T., Nishio, K., Yanagihara, K., Kinoshita, H., Kuwano, M., Ono, M. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) promotes metastasis of human scirrhous gastric cancer cells through epithelial mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 7 : e41312, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041312.

Tabara, K., Kanda, R., Sonoda, K., Kubo, T., Murakami, Y., Kawahara, A., Azuma, K., Abe, H., Kage, M., Yoshinaga, A., Tahira, T., Hayashi, K., Arao, T., Nishio, K., Rosell, R., Kuwano, M., Ono, M. Loss of activating EGFR mutant gene contributes to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cells. *PLoS ONE*, 7: e41017,

2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041017.
Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Taira, T., Tsurutani, J., Watari, K., Shibata, T., Murakami, Y., Takamori, S., Ono, M., Izumi, H., Kage, M., Yanagawa, T., Nakagawa, K., Hoshino, T., Kuwano, M. NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 7 : 779-789, 2012. doi: 10.1097/JTO.0b013e31824c92b4.
Watari, K., Nakamura, M., Fukunaga, Y., Furuno, A., Shibata, T., Kawahara, A., Hosoi, F., Kuwano, T., Kuwano, M., and Ono, M. The antitumor effect of a novel angiogenesis inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF-kB pathway. *Int. J. Cancer*, 131 : 310-321, 2012. doi:10.1002/ijc.26356.

[学会発表](計 10 件)

Kuwano, M., Shibata, T., Kawahara, A., Hattori, S., Watari, K., Murakami, Y., Izumi, H., Kohno, K., Kage, M., Ono, M. Y-box binding protein-1(YB-1) activation may modify the responses to endocrine and HER2-targeted therapeutics in breast cancer. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2014 年 7 月 18 日(福岡)
Shibata, T., Izumi, H., Kawahara, A., Hattori, S., Fukumitsu, C., Takahashi, R., Watari, K., Murakami, Y., Kohno, K., Ito, K., Kage, M., Kuwano, M., Ono, M. Y-box binding protein-1 YB-1 negatively regulates ER(expression accompanying by enhanced HER2/ErbB2 expression in breast cancer. AACR Annual Meeting 2014, April 5th- 9th, 2014, San Diego, CA.
Murakami, Y., Shinoda, A., Watari, K., Nabeshima, H., Kawahara, A., Nagayama, D., Naito, Y., Higaki, K., Inoue, M., Kuwano, M., Ono, M. Overcoming drug resistance to gemcitabine in pancreas cancer cells by targeting activated PI3K/mTOR pathway. AACR Annual Meeting 2014, April 5th- 9th, 2014, San Diego, CA.

桑野信彦. がん薬物治療の新しい創出とがん生物学 - 基礎研究者の立場から - . (シンポジウム)(佐世保市)第 30 回日本薬学会九州支部大会 2013 年 12 月 7 日~8 日(発表日:12 月 8 日)
小野真弓、神田利奈、渡 公佑、園田佳保里、前田雅史、村上雄一、河原明彦、鹿毛政義、浦本秀隆、桑野信彦. Integrin 1 依存性バイパスシグナルによる肺癌

の EGFR-TKI 耐性獲得機序 - Integrin beta1/Src/Akt-driven Bypass Signaling Pathway confers EGFR-TKI Resistance in Lung Cancer Cells. (イングリッシュオーラルセッション)(横浜市)第 72 回日本癌学会学術振興会 2013 年 10 月 3 日~5 日(発表日:10 月 3 日)

柴田智博、菅仁史、村上雄一、渡 公佑、河原明彦、鹿毛政義、和泉弘人、桑野信彦、小野真弓.Y-box 結合タンパク-1(YB-1)はヒト胃癌において HER2/ErbB2 発現とラパチニブの感受性を制御する. 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2013 年 6 月 12 日(水)~14 日(金)(京都)

村上雄一、渡 公佑、嬉野浩樹、河原明彦、鹿毛政義、桑野信彦、小野真弓. NDRG1 は胃癌の血管新生を IL-1/AP-1 を介して促進する NDRG1 promotes tumor angiogenesis through interleukin-1 (IL-1)/AP-1 activation pathway in human gastric cancer cells. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 20 日(北海道)

桑野信彦. JSMO10 周年記念企画 わが国における臨床腫瘍学の歩みと今後の展望 ~ JSMO の歴史と展望 ~ : 2) JSMO 設立後 10 年の歩み: 学術集会(パネリスト)第 10 回日本臨床腫瘍学会. 2012 年 7 月 26 日(大阪)

渡 公佑、柴田智博、村上雄一、桑野信彦、小野真弓. N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1) はがん血管新生に重要な役割をはたす NDRG1-deficient mice exhibit suppression of tumor angiogenesis and macrophage infiltration (ワークショップ)第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2012 年 7 月 12 日(広島)
Ono, M., Ogi, S., Yamamoto, C., Fujita, H., Kuwano, M. Sorting nexin 2 (SNX2) controls drug sensitivity to molecular targeted anticancer agents through membrane trafficking of c-Met protein in cancer cell. AACR Annual Meeting 2012, March 31st - April 4th, 2012, (Chicago, Illinois. USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 信彦 (Kuwano Michihiko)

研究者番号 : 80037431

(2) 研究分担者

小田 義直 (Oda Yoshinao)

研究者番号 : 70291515