

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893175

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌の発症・進展におけるBIG3の役割

研究課題名(英文)The role of BIG3 in onset/development mechanism of triple-negative breast cancer

研究代表者

木村 竜一郎 (KIMURA, Ryuichiro)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：20587323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ER陰性乳癌、特にTNBCの発症・進展におけるBIG3の役割を解明した。BIG3の遺伝子発現はER陰性乳癌でも見られ、特にHER2陽性乳癌において強力な発現亢進が認められた。ER陰性乳癌においては、ER陽性乳癌とは異なるBIG3発現制御機構が存在した。またBIG3高発現群では予後不良となることがER陽性/陰性双方の乳癌で明らかになった。BIG3の発現抑制はER陰性乳癌、特にTNBC細胞株で顕著に細胞増殖を阻害することが分かった。一方、乳癌における新規BIG3相互作用因子を多数同定した。これらの結果はTNBCにおいてはBIG3が癌細胞の生存、増殖を直接的に制御することを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) in onset/development mechanism of estrogen receptor (ER)-negative breast cancers, including triple-negative breast cancer (TNBC). BIG3 was highly expressed in ER-negative breast cancer, as well as ER-positive cancer. Notably, BIG3 was strongly expressed in HER2-enriched breast cancer. A mechanism for BIG3 expression in ER-negative breast cancer was different from it in ER-positive breast cancer. High expression of BIG3 was associated with significantly shorter overall survival in both ER-positive and -negative cancer on public cohort. Knockdown of BIG3 expression with small-interfering RNA reduced cellular growths of human TNBC cell lines. Furthermore, we identified novel BIG3-interacting factors in breast cancer cells. These results demonstrate that BIG3 directly regulates cellular survival and growth of TNBC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳癌 ゲノム シグナル伝達 プロテオーム 発現制御

1. 研究開始当初の背景

乳癌の罹患率は、高齢化や生活様式の欧米化に伴い年々増加傾向にあり、我が国の女性が生涯で罹患する癌の中で最も頻度が高い。乳癌は女性ホルモンであるエストロゲン (E2) によって発症、増殖、悪性化が促進することから、治療薬として抗 E2 製剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が臨床応用されており、術後乳癌の治療、転移・再発予防、癌の進行抑制に大きく貢献している。また、乳癌で恒常的に発現が亢進している膜タンパク質 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的とした抗体医薬ハーセプチンは、先の内分泌療法とともに乳癌治療に革新的な貢献を果たした。しかしながら、これらの分子標的薬が奏功するのはエストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) や HER2 が発現している乳癌に限られている。一方で、ER 陰性、プロゲステロン受容体 (PgR) 陰性、HER2 陰性のトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は全乳癌の 10~20% ほどを占める。TNBC は術後、比較的早期の再発が多く、ER 陽性乳癌に比較して予後不良である (図 1)。また、先に挙げた内分泌療法や抗 HER2 療法は適応せず、効果的な治療法のないことが深刻な問題となっており、TNBC 乳癌の発症・進展における詳細な分子機構を理解した新しい治療法が切望されている。

(J Clin Oncol 2006;24:5652-5657)

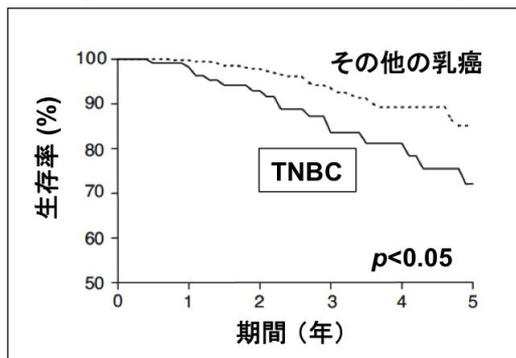


図1. TNBCの悪性度の高さ

所属研究室では、網羅的遺伝子発現解析を通じて乳癌症例にて高頻度で高発現する分子 brefeldin A-inhibited guanine nucleotide- exchange protein 3 (BIG3) を同定した。BIG3 は、ER 陽性乳癌において ER 標的遺伝子として発現亢進しており、ER 活性化抑制因子 PHB2 の抑制機能を阻害することで ER 陽性乳癌の細胞増殖を促進することが明らかとなっている (文献 1-3)。

一方で、ER 陰性乳癌症例においても BIG3 の発現亢進が認められることや BIG3 の発現抑制により細胞増殖が阻害されることも可能性試験において見出されている。しかしながら、ER 陰性乳癌、特に TNBC における BIG3 の作用機序と ER 非依存的 BIG3 遺伝

子亢進メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

ER 陰性乳癌、特に TNBC の発症・進展における BIG3 の役割を解明する。この目的を達成するために、以下の 2 つの方向性で研究を進める。

(1) ER 陰性乳癌における BIG3 の機能を理解するため、BIG3 と乳癌細胞内で相互作用する分子の機能を糸口にする。ER 陽性乳癌で見られる BIG3/PHB2 の複合体形成の有無を解明するとともに、新規 BIG3 相互作用因子を同定し、これらの分子の機能から BIG3 の機能を明らかにする。

(2) ER 陰性乳癌における BIG3 発現亢進メカニズムを解明する。この課題を明らかにするために、ER 非依存的 BIG3 遺伝子活性化機構について、転写制御、mRNA 非翻訳領域の機能解析の両面から解析する。

これらの研究から、悪性度の極めて高い TNBC の発症・進展における BIG3 の機能解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 可能性試験で見出された ER 陰性乳癌における BIG3 の遺伝子発現を乳癌患者臨床検体、およびヒト乳癌細胞株を用いて詳細に解析する。また、ER 陰性乳癌における BIG3 発現と予後との相関を公共の大規模コホート研究を活用して明らかにする。さらに、RNA 干渉法による BIG3 の発現抑制法を用いてヒト ER 陰性乳癌細胞株の細胞増殖における BIG3 の役割を解明する。

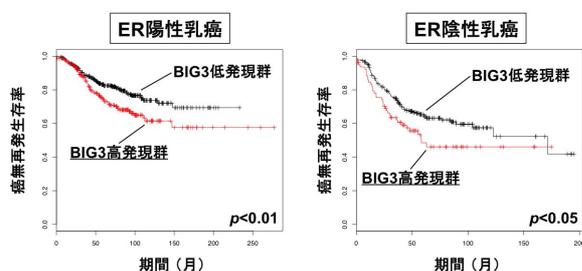
(2) ER 陰性乳癌発症・進展における BIG3 の機能を BIG3-PHB2 複合体形成能から解明する。ER 陰性乳癌でも BIG3 が PHB2 と複合体を形成するか、BIG3-PHB2 結合阻害ペプチドにより細胞増殖が阻害されるかを免疫沈降法にて解析することにより、ER 陰性乳癌における BIG3-PHB2 複合体の意義を明らかにする。同時に、ER 陰性乳癌細胞における内在性 BIG3 複合体を免疫沈降法で単離し、共沈した相互作用因子をショットガンプロテオミクス (2DICAL 法) (Mol Cell Proteomics 2006;5:1338-1347) により網羅的に解析することで新規 BIG3 相互作用因子を同定する。これらの方法により、ER 陰性乳癌における BIG3 の全く新しい機能を解明する。

(3) ER 非依存的 BIG3 遺伝子亢進メカニズムを転写制御、mRNA 非翻訳領域 (UTR) の機能解析の観点から解明する。BIG3 遺伝子のプロモーター領域には、乳癌で活性化が指摘されている転写因子結合塩基配列が存在することに着目し、BIG3 プロ

モーター領域の転写制御機構について研究を行う。同時に BIG3 mRNA UTR の意義、non-coding RNA 発現による BIG3 遺伝子の転写制御、BIG3 mRNA UTR を介した mRNA の分解機構の観点から検討する。

4. 研究成果

(1) BIG3 の遺伝子発現は、ER 陽性乳癌と同様に ER 陰性乳癌でも見られ、特に HER2 陽性乳癌において強力な発現亢進が認められることが乳癌患者臨床検体、およびヒト乳癌細胞株を用いた解析で明らかになった。TNBC においては ER 陽性乳癌や HER2 陽性乳癌と比較すると BIG3 の発現は弱い、正常乳腺組織における発現よりは強いことが分かった。また、公共の大規模コホート研究を利用した解析から、BIG3 高発現群では予後不良となることが ER 陽性乳癌、ER 陰性乳癌の双方で示された (図 2)。



乳癌大規模コホート研究 [Breast Cancer Res Treat (2010) 123:725-731] のマイクロアレイによる遺伝子発現解析と予後結果を基にして癌無再発生存率をKaplan-Meier Plotterにて図示した。

図2. BIG3発現と乳癌予後の関係

さらに、RNA 干渉法による BIG3 の発現抑制により、ヒト ER 陰性乳癌細胞株、特に TNBC 細胞株では顕著な細胞増殖阻害効果が観察された (図 3)。

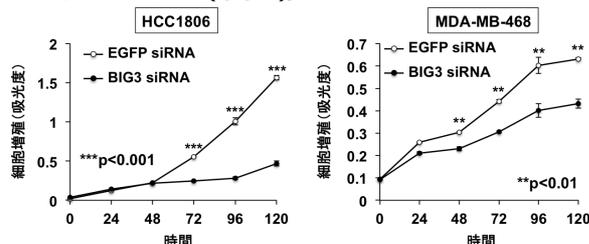


図3. TNBC細胞株の細胞増殖におけるBIG3の関与

これらのことから、BIG3 は ER 陰性乳癌でも発現が認められ、これらの癌細胞の細胞増殖を制御していることが示唆された。

(2) ヒト TNBC 細胞株において BIG3 分子を含む複合体を免疫沈降し、共沈した相互作用因子を 2DICAL 法により探索したところ、多数のタンパク質が同定された。これらの因子のほとんどは細胞質、あるいは細胞質と細胞核両方に局在するタンパク質であり、BIG3 の細胞内局在と一致した。また、これらの因子のいくつかは細胞骨格を構成する微小管に関連する分子であり、BIG3 が

これらの因子と複合体を形成することにより、乳癌において微小管構造の維持、および細胞分裂や細胞遊走を制御する可能性も考えられる。

(3) TNBC における BIG3 遺伝子亢進機構を解明するため、BIG3 遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、ER 陽性乳癌ではエンハンサー領域の ER 結合領域が重要であるのに対し、TNBC では転写開始点近傍領域が恒常的な BIG3 発現亢進に関与していることが示唆された。

また、BIG3 mRNA の 3'-UTR は 8000 塩基と非常に長大であり、この領域における BIG3 mRNA の制御機構が存在することが予想された。このため、この 3'-UTR 領域を用いたレポータープラスミドを作製して遺伝子発現への影響を解析した結果、3'-UTR には BIG3 mRNA の発現を左右する部分が存在することが明らかになった。

これらの結果は、TNBC を含む ER 陰性乳癌における BIG3 の遺伝子発現制御機構は ER 陽性乳癌とは異なり、転写と mRNA 安定性の 2 つの機構で存在することを示唆するものであると考えられる。

<引用文献>

Yoshimaru, T. *et al.* Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nat. Commun.* **4**, 2443 (2013).

Kim, J. W. *et al.* Activation of an estrogen/estrogen receptor signaling by BIG3 through its inhibitory effect on nuclear transport of PHB2/REA in breast cancer. *Cancer Sci.* **100**, 1468-1478 (2009).

Nishidate T. *et al.* Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. *Int J Oncol.* **25**, 797-819 (2004).

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)

〔学会発表〕(計1件)

大豆本 圭, 小松 正人, 木村 竜一朗, 吉丸 哲郎, 上原 久典, 尾野 雅哉, 布川 朋也, 金山 博臣, 片桐 豊雅, p53 変異型膀胱癌における DEAD box polypeptide31(DDX31)の機能解明, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋)

〔その他〕

ホームページ等

徳島大学・教育研究者総覧（木村竜一郎）
<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/277280/profile-ja.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

木村 竜一郎（KIMURA, Ryuichiro）
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教
研究者番号： 20587323