

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07200

研究課題名(和文) TNBCにおけるSALL3を通じたゲノムワイドなメチル化リプログラミングの解析

研究課題名(英文) Identification of recurrent genetic and epigenetic alterations of SALL3 in TNBC by comprehensive genomic analysis

研究代表者

松下 洋輔 (MATSUSHITA, Yosuke)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・助教

研究者番号：70634450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は異質性の高い疾患で、早期再発や治療薬への耐性・抵抗性が問題となっている。本研究では高頻度に不活化(発現低下・変異)を認めたSALL3の分子機構を解析することで、TNBCの新しい生物学的特性の同定を試みた。その結果、高頻度に生じたSALL3の発現低下は主にメチル化で制御されており、この相関はTNBCにおいてのみ認められた。また、SALL3は転写複合体を形成することで、その標的遺伝子発現を制御すること、SALL3の発現低下がタキサン系薬剤への抵抗性に寄与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNBCはERやHER2陽性サブタイプと異なり、明確な治療標的が存在しないため、内分泌療法や抗HER2療法の効果が期待できない。さらに、概して予後が悪く、早期再発も多いことから、TNBCの予後改善を目的とした治療法の確立、メカニズムの解明は急務であった。高頻度に不活化(発現低下・変異)を認めたSALL3の分子機構を解析することで、TNBCの新たな生物学的特徴付けは、治療法確立に繋がることが期待されるため、本研究の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Triple-negative breast cancers (TNBC) is a highly heterogeneous disease with problems of early recurrence and resistance to therapeutic agents. In this study, SALL3 showed frequent inactivation (frequent downregulation / mutation). By analyzing the molecular mechanism of TNBC, we attempted to identify new biological properties of TNBC. As a result, the frequent decrease in SALL3 expression is mainly regulated by promoter methylation, and this correlation is only controlled in TNBC. In addition, it was shown that SALL3 regulates the expression of its target gene by forming a transcription complex, and that the downregulation of SALL3 or target-gene contributes to resistance to paclitaxel or docetaxel.

研究分野：腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんは本邦の女性において最も罹患率の高い悪性腫瘍であり、依然増加の一途をたどっている。臨床的には性ステロイドホルモン受容体であるエストロゲンレセプター (Estrogen receptor: ER), プロゲステロンレセプター (Progesterone receptor: PgR), および上皮成長因子受容体 2 (Human epidermal growth factor 2: HER2) の 3 受容体の発現レベルに従って、手術前後の薬物療法の方針が決定される。乳がんの約 70% は ER 陽性であり、その治療には、内分泌 (ホルモン) 療法が用いられ、HER2 陽性乳がんには、抗 HER2 剤が一般的に使用される。しかしながら、乳がん全体の約 15-20% で ER・PgR, HER2 のいずれも発現せず、これら治療薬が奏効しないタイプは TNBC (Triple Negative Breast Cancer) と称されている。一般的に TNBC は早期に再発し予後不良であり、標的分子の発現がないため、既存のホルモン療法や抗 HER2 療法には奏功を示さない。近年、血管新生阻害薬や mTOR 阻害剤、合成致死の概念を利用した PARP 阻害剤の臨床応用が進められているが、その異質性の高さから、いずれも予後の大幅な改善には至っておらず、依然、殺細胞性の化学療法剤が現在でも標準的に用いられている。また TNBC は乳がんの中でも免疫原性が高いと考えられているため、免疫チェックポイント阻害剤を用いた臨床試験が進行中で、一部の症例には効果が認められているものの、効果予測マーカーが未だ同定できていないなど、更なる検討が必要である。以上のことから、TNBC の予後改善を目指した生物学的特性の解明、治療法の確立は急務である。

2. 研究の目的

TNBC は乳がんの中でも悪性度が高いサブタイプの一つで、標的となる分子の発現を欠くことから、現在でも化学療法剤が標準的に用いられている。しかしながら、初期治療には奏功するものの、抵抗性や耐性獲得による予後不良が問題となっている。そのため、新規治療薬や治療法開発のために、網羅的な遺伝子発現解析やゲノム解析がなされてきたが、異質性の高さから、十分な予後改善に繋がる特徴や治療薬などの解明には至っていない。抵抗性や耐性獲得による再発が大きな問題となっている。我々はこれまでにレーザーマイクロダイセクション (LCM) 法により腫瘍組織のみを抽出して 36 症例の全エクソーム解析 (WES) を行い、非腫瘍部との比較により、腫瘍部で特異的に生じる遺伝子変異を同定している。これらの遺伝子プロファイル調べたところエピジェネティック関連遺伝子に全 36 症例のうち 20 症例 (55.6%) で変異を認め、これらのうち recurrent な変異をもつ遺伝子について発現解析を行ったところ、13 症例中 9 症例 (69.2%) という高頻度、かつ顕著な発現低下を起こす分子として Spalt like transcription factor 3 (SALL3) を同定した。本研究では、TNBC における SALL3 の高頻度不活化を介した網羅的ながん化機構と変異体の機能解析を通じて、TNBC の生物学的特性の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) SALL3 変異体の機能解析

36 症例から同定した 2 つの点変異の機能を解析するため、一過性の過剰発現細胞株を作製し、癌抑制遺伝子としての機能への影響を colony-formation assay で評価した。また、SALL3 と複合体を形成するタンパク質との結合能についても、免疫沈降実験で評価した。

(2) SALL3 発現低下の制御機構と意義の解明

TNBC で高頻度に発現低下を認めたことから、そのメカニズムとして、プロモーター領域の CpG island のメチル化を評価することで、発現制御機構を検討した。また、公共データベースを用いて、乳がんサブタイプごとの SALL3 の発現とメチル化頻度の相関関係を算出した。さらに、SALL3 発現低下によって引き起こされる現象として、抗癌剤への感受性変化を、Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。

(3) SALL3 を介した癌抑制遺伝子の発現制御機構

SALL3 は内因性のメチル化抑制因子として機能するとの報告から、SALL3 ノックダウン後にマイクロアレイ解析を行い、SALL3 標的がん遺伝子候補を同定し、それら遺伝子のメチル化率をゲノムワイドに測定することで、発現制御機構を評価した。また、SALL3 結合タンパク質を網羅的に評価し、同定した分子の役割を評価することで、SALL3 による標的遺伝子の発現制御機構を検討した。

4. 研究成果

(1) SALL3 変異体のがん抑制活性の消失

36 症例の WES で見出した 2 つの変異 (ミスセンス変異とナンセンス変異) のプラスミドを作製し、TNBC 細胞株に過剰発現した後、colony-formation assay を用いて、がん抑制活性への影響を検討した。その結果、これまでの報告と同様、SALL3 野生型は癌細胞の増殖を有意に抑制したのに対し、ナンセンス変異体は抑制活性が完全に消失していることが明らかになった。一方、ミスセンス変異体は有意な抑制活性を保持していたものの、野生型と比較すると、僅かではあるが有意にその活性が減弱していることも明らかにな

った。これらの結果は、ジェネティックな SALL3 の不活化が TNBC の悪性化に關与している可能性を示唆している。

(2) SALL3 のメチル化亢進と化学療法抵抗性

SALL3 の発現低下のメカニズムを検討するために、腫瘍部と比腫瘍部由来の gDNA を用いて、SALL3 プロモーター領域の CpG island のメチル化率をパイロシークエンスで検討した。その結果、14 症例中 12 症例で腫瘍部におけるメチル化亢進を認めた。また、SALL3 の発現が低下している TNBC 細胞株に対し、脱メチル化剤を投与すると、SALL3 の発現は濃度依存的に回復し、その際、メチル化率は有意に低下していることも明らかになった。興味深いことに、公的データベースを用いた解析から、このメチル化亢進と SALL3 発現の逆相関は、TNBC においてのみ観察され、他の乳癌サブタイプ (ER 陽性 HER2 陰性、ER・HER2 陽性、ER 陰性 HER2 陽性) では有意な逆相関が認められなかった。これらのことから、SALL3 の高頻度なメチル化と発現低下による不活化は TNBC の特徴として重要であることが推測された。次に、TNBC で用いられるタキサン系薬剤に対する感受性を検討した。その結果、SALL3 をノックダウンすると、パクリタキセル、ドセタキセルの両タキサン系薬剤に対する感受性が低下している、すなわち抵抗性が誘発されていることが明らかになった。

(3) SALL3 の標的遺伝子の同定と発現制御機構

はじめに、SALL3 の発現低下により変動する遺伝子を同定するため、SALL3 ノックダウン後、マイクロアレイ解析を行い、がん抑制遺伝子を 5 つ同定した。これらの内、公的データベースを用いて、TNBC における SALL3 の発現との相関を検証したところ、Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1) を同定した。SALL3 は内在性のメチル化抑制因子として機能するとの報告から、TNBC 細胞株において SALL3 をノックダウン後、パイロシークエンスによる DMBT1 のメチル化率を検討してみたものの、変化は認められなかった。パイロシークエンスは一度に数塩基のメチル化率しか検討できないことから、ゲノムワイドなメチル化解析を実施することで、DMBT1 を含めた、SALL3 によるメチル化制御領域を解析した。しかしながら、TNBC 細胞株における、SALL3 のノックダウンや過剰発現は DMBT1 だけでなく、ゲノムワイドなメチル化率の変化も同定できなかった。このことから、TNBC において、SALL3 は他のメカニズムで DMBT1 の発現を制御している可能性が推察された。

(4) SALL3 複合体による転写調節

SALL ファミリーは、いずれも複数の Zinc Finger domain を有しており、転写複合体を形成し、標的遺伝子の発現を制御していることが報告されている。また、SALL3 をノックダウン後、H3K4me3 抗体を用いて ChIP assay を行ったところ、DMBT1 プロモーター領域における減弱が認められたことから、SALL3 が発現制御に影響していることが示唆された。そこで、転写複合体としての結合タンパク質を同定するため、SALL3 を過剰発現させた後、核分画にて免疫沈降を行い、プロテオーム解析を行い、YY1 transcription factor (YY1) を同定した。実際、YY1 を TNBC 細胞株でノックダウンすると、SALL3 と同様、DMBT1 の発現低下が誘発された。次に、SALL3 もしくは YY1 抗体を用いて ChIP assay を行うと、両者とも、DMBT1 のプロモーター領域における亢進が認められた。以上のことから、SALL3-YY1 複合体が DMBT1 のプロモーター領域に結合することで、発現制御を担っていることが示唆された。さらに、TNBC 細胞株において DMBT1 をノックダウンすると、SALL3 と同様、パクリタキセルとドセタキセルの感受性が低下、すなわち抵抗性を示した。

(5) 結論

SALL3 と DMBT1、YY1 は公共データベースを用いた解析から、発現低下は予後不良と相関することから、SALL3-YY1-DMBT1 axis の低下は TNBC の悪性化、特に化学療法抵抗性のメカニズムの一つであることが示唆された。また、SALL3 が TNBC において、転写複合体の一員として、標的遺伝子の発現制御に關与していることを初めて見出した。以上のことから、SALL3 の発現回復は、TNBC の治療戦略の一助となる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Natsuko Inoue, Wen Li, Yukie Fujimoto, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Haruki Okamura and Yasuo Miyoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 High Serum Levels of Interleukin-18 Are Associated With Worse Outcomes in Patients With Breast Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5009-5018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13691	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 Ryuichiro Kimura, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Taisuke Matsuo, Masaya Ono, Jae-Hyun Park, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Yusuke Nakamura and Toyomasa Katagiri	4. 巻 56
2. 論文標題 The GALNT6-LGALS3BP axis promotes breast cancer cell growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 581-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4941	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 Yukie Fujimoto, Natsuko Inoue, Koji Morimoto, Takahiro Watanabe, Seiichi Hirota, Michiko Imamura, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Haruki Okamura and Yasuo Miyoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Significant association between high serum CCL5 levels and better disease-free survival of patients with early breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 209-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14234	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Tetsuro Yoshimaru, Hiromu Suzuki, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Frequent downregulation of SALL3 by genetic and epigenetic alterations is involved in progression and chemoresistance of triple negative breast cancers
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下洋輔、小松正人、吉丸哲郎、井本逸勢、鈴木拓、片桐豊雅
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌におけるがん抑制因子SALL3の不活化機構の解明
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Matsushita, Kazumasa Okumura, Masato Komatsu, Ryuichiro Kimura, Tetsuro Yoshimaru, Masaya Ono, Junko Honda, Akira Tangoku, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 The regulation of glutaminolysis via RHBDL2 is associated with malignant and chemoresistance in TNBC
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下洋輔・高橋 定子・小松正人・清谷一馬・吉丸哲郎・三好康雄・本田純子・紺谷 桂一・大住省三・笹三徳・片桐豊雅
2. 発表標題 The exploration of novel susceptibility genes associated with Japanese familial breast cancer by whole exome sequencing
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Tetsuro Yoshimaru, Hiromu Suzuki, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa and Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Frequent downregulation of SALL3 by recurrent genetic and epigenetic alterations is involved in triple negative breast cancers
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下洋輔, 片桐豊雅
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳がんの包括的ゲノム解析
3. 学会等名 第2回質量分析インフォマティクスハッカソンシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Tetsuro Yoshimaru, Takeshi Niinuma, Hiromu Suzuki, Junko Honda, Issei Imoto, Akira Tangoku, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa and Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Downregulation of SALL3 by recurrent genetic and epigenetic alterations is involved in triple negative breast cancers
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下洋輔, 吉丸哲郎, 片桐豊雅
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌におけるRHBDL2のグルタミン代謝制御の役割解明
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Kazuma Kiyotani, Tetsuro Yoshimaru, Takeshi Niinuma, Hiromu Suzuki, Junko Honda, Issei Imoto, Akira Tangoku, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Recurrent silencing of SALL3 is involved in progression and chemoresistance of triple negative breast cancers
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------