

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591671

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌におけるユビキチンリガーゼによる細胞周期制御機構の解明

研究課題名（英文）Study for mechanism of cell cycle regulation by ubiquitin ligase in triple-negative breast cancer

研究代表者

山本 豊 (YAMAMOTO YUTAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20398217

研究成果の概要（和文）：細胞周期にかかわるユビキチンリガーゼ（Skp2, Fbw7）の乳癌組織および乳癌細胞株での発現とその臨床的意義と治療標的の可能性について検討した。原発乳癌患者ではFbw7の発現低下あるいはSkp2の過剰発現があると細胞増殖活性が高く、予後不良であることが判明した。また、これらの細胞周期を調節するユビキチンリガーゼを調整することにより乳癌の細胞増殖を抑制できる可能性があることが示された。

研究成果の概要（英文）：We studied clinical significance of ubiquitin ligase (skp2 and Fbw7) in breast cancer and potential of ubiquitin ligase targeting-therapy for breast cancer. Fbw7 downregulation and skp2 overexpression were significantly correlated with aggressive phenotype in breast cancer. Fbw7 knockdown led to suppression of proliferation in breast cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：乳腺外科学、ユビキチンリガーゼ、Fbw7、skp2

1. 研究開始当初の背景

(1) いわゆるトリプルネガティブ(TN)乳癌はエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)すべてが陰性であり、治療標的がなく、薬物療法は化学療法のみ

で治療されている。しかも、予後不良な乳癌のサブグループであり、このTN乳癌の治療法の開発が急務である。TN乳癌の特徴として、EGFR、サイトケラチン5/6、c-kit、cyclin Eなどの発現が高率で、BRCA1の発現低下があることが示されている^{1,2)}。当

科の乳癌検体においても同様の結果であり、さらに ki-67 index が高く、細胞増殖活性が高いことを確認している。

- (2) 癌における蛋白発現異常には、遺伝子レベルでの遺伝子増幅や欠失、メチル化などの遺伝子異常などがあるが、蛋白を分解するユビキチン化が蛋白機能制御の上で重要であることが知られるようになってきた。細胞周期の G1 期に発現する c-Myc および S 期蛋白であるサイクリン E は TN 乳癌での発現が高率であり、細胞周期エンジンとして機能していると考えられる。リン酸化されたサイクリン E や c-Myc はユビキチンリガーゼのうち SCF 複合体である Fbw7 によりユビキチン化され分解される、一方、フリーのサイクリン E や c-Myc は同じ SCF 複合体である Skp2 によりユビキチン化を受ける^{3,4)}。また、S 期蛋白である細胞周期を抑制する CDK インヒビターの一つである p27 は Skp2 によりユビキチン化される⁵⁾。Fbw7 は細胞周期抑制に、Skp2 は細胞周期促進に働いていると考えられる。
- (3) 現在まで乳癌の細胞周期関連因子については p53 変異や c-Myc 遺伝子過剰発現などが知られているが、上記の新しい細胞周期調節機構を担うユビキチンリガーゼの乳癌、特に増殖活性の高い TN 乳癌での役割については不明な点が多い。G1/S 期におけるユビキチンリガーゼによる細胞周期蛋白の制御機構が乳癌においてどのように関与しているのかを解明し、さらに、薬物反応性や治療標的の可能性を検討することはきわめて重要

と考えた。

2. 研究の目的

(1) ユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7)

の発現と細胞周期との関連について

① 乳癌細胞株を用いた検討

MCF-7、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) などの細胞株を用いて、ユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7) や c-Myc、サイクリン E、p27 などの蛋白発現や mRNA 発現、遺伝子増幅の有無を検討する。また、ユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7) 発現と細胞周期との関連を検討する。

② 臨床検体 (乳癌組織) を用いた検討

乳癌組織 200 例を用いてユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7) 発現の有無と c-Myc、サイクリン E、p27、ki-67 などの蛋白発現、臨床病理学的因子や予後との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株を用いた検討

MCF-7、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) などの細胞株を用いて、ユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7) や c-Myc、サイクリン E、p27、ki67 などの蛋白発現や mRNA 発現、遺伝子増幅の有無を検討する。また、ユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7) 発現と細胞周期との関連を DNA ploidy や s-phase fraction を用いて検討する。蛋白発現は主にウエスタンブロット法を用い、mRNA 発現や遺伝子増幅につ

いては RT-PCR 法やサザンブロット法を用いる。

- (2) 臨床検体 (乳癌組織) を用いた検討
乳癌組織 200 例を用いてユビキチンリガーゼ (Skp2, Fbw7) 発現の有無と c-Myc、サイクリン E、p27、ki-67 などの蛋白発現、臨床病理学的因子や予後との関連を検討する。臨床検体における蛋白発現は主に免疫組織化学法による。また、mRNA 発現や遺伝子増幅については凍結新鮮組織を用いて RT-PCR 法やサザンブロット法を行う。

4. 研究成果

- (1) 原発乳癌 186 例を用いて Fbw7 mRNA を測定した。

① Fbw7 の発現低下は組織グレードと正の相関関係 ($p=0.024$) があり、ER ($p=0.009$)、PR ($p=0.027$) と負の相関関係を認めた。腫瘍サブタイプでは ER 陽性 HER2 陰性に比べ、Her2 陽性や triple-negative 乳癌で Fbw7 の発現は低下する傾向にあった ($p=0.076$)。

② Fbw7 が低発現の腫瘍は Fbw7 が高発現のものに比べ ki67 labeling index が高値 ($p<0.0001$)、Cyclin E 発現が高値 ($p=0.0009$) で、c-Myc 発現が高値の傾向 ($p=0.0966$) であった。

③ 原発乳癌の予後に関しては Fbw7 が低い乳癌は Fbw7 が高発現している腫瘍に比べて disease-free survival には差がなかったが、Breast cancer specific survival (BCSS) では有意に予後不良であり、Fbw7 は BCSS に関する独立した予後因子であった ($p=0.033$)。

- (2) 原発乳癌 290 例を用いた Skp2、Fbw7 mRNA を測定し、Skp2 と Fbw7 の両者の

発現量による予後因子としての意義について検討した。Skp2 高発現 Fbw7 低発現は他の Skp2 低発現 Fbw7 低発現、Skp2 高発現 Fbw7 高発現、Skp2 低発現 Fbw7 高発現に比べ DFS で有意に予後不良であった (log-rank test, $p<0.001$)。

- (3) 乳癌細胞株での Fbw7 発現抑制と細胞周期、細胞増殖に関する検討

Fbw7 高発現株である T47D 細胞を Fbw7siRNA を用いて Fbw7 を knock down すると、cMyc 蛋白と Cyclin E 蛋白発現量が増加した。また、Fbw7 knock down 株はコントロールに比べ G2/S 期の細胞が有意に増加しており、多くの細胞が細胞周期に入っていた。さらに、細胞増殖については Fbw7 knock down 株はコントロールに比べ有意に増殖活性が高かった ($p=0.016$)。

以上より、Fbw7、Skyp2 発現状況により乳癌腫瘍細胞の増殖活性は異なり、さらにこれらの発現状況により乳癌の予後が異なることが示された。さらに、これらのユビキチンリガーゼを調整することにより増殖活性を変化させることができ、乳癌の新しい治療標的となる可能性が示唆された。Fbw7 の乳癌における役割に関する発表は今回の研究以前にはなく、本研究の結果は世界で初めての報告である。

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 2 件)

1. Ibusuki M, Yamamoto Y, Shinriki S, Ando Y, Iwase H. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients. Cancer Sci. 査読有、2011;102(2):439-45.

2. Yamamoto Y, Iwase H:
Clinicopathological features and
treatment strategy for
triple-negative breast cancer. Int J
Clin Oncol. 査読有、2010
Aug;15(4):341-51.

[学会発表] (計1件)

1. Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H. Redu
ced expression of ubiquitin ligase FB
XW7 mRNA is associated with poor prog
nosis in breast cancer patients. Adva
nces in Breast Cancer Research 2011.
10.14, サンフランシスコ、米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 豊 (YAMAMOTO YUTAKA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20398217

(2) 研究分担者

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：

(4) 研究協力者

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