

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790310

研究課題名(和文) 難治性乳癌におけるNF κ B 恒常的活性化の分子機構と癌悪性化に対する役割の解明研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms of constitutive activation of NF κ B and its target genes involved in tumorigenesis in the malignant breast cancer.

研究代表者 山口 憲孝 (YAMAGUCHI NORITAKA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80399469

研究成果の概要(和文)：

難治性乳癌ではNF κ B というタンパク質が活性化し癌悪性化を促進している。本研究では、NF κ B の役割と活性化を誘導する分子メカニズムについて詳細な解析を行った。その結果、NF κ B は癌細胞の生存に関わる因子や癌細胞の転移・浸潤を促進する因子の発現を増強していることを明らかにした。活性化誘導機構の解析ではNF κ B 活性化因子の一つであるNIK の高発現が原因であることを明らかにした。本研究は乳癌の新たな治療法開発の足がかりになると考えている。

研究成果の概要(英文)：

The transcription factor NF κ B is constitutively activated in malignant breast cancer. In the present study, we analyzed its target genes and molecular mechanisms leading to its activation. As a result, we found that NF κ B induces expression of genes involved in cell proliferation and invasion/metastasis in the breast cancer. We also found that expression of NIK, one of NF κ B activators, is up-regulated in the cancer. I expect that these results support development of novel therapies against the breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：病態医化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

転写因子NF κ B は、乳癌や膵癌などの様々な癌細胞において恒常的に活性化し細胞増殖や転移・浸潤、血管新生などに関わる様々な遺伝子の発現を誘導して癌の悪性化をもたらす。従ってNF κ B は抗癌剤の格好の標的であるが、NF κ B 阻害剤の開発は難航してい

ること、およびNF κ B は免疫制御や骨代謝制御などの多様な生理機能を有することから、癌細胞においてNF κ B 恒常的活性化を導く上流のタンパク質や癌の悪性化に関わる標的遺伝子に対する阻害剤の開発が必要とされている。

我々は、35 種の乳癌細胞株を収集して NF

κ B の活性化を測定し、8 種の NF κ B 活性化株を同定した。すると、これら 8 種は全て低分化度の高悪性乳癌であることがわかり、NF κ B 恒常的活性化が高悪性乳癌の重要な特徴であることが示された。次に NF κ B 恒常的活性化の原因を探るために、NF κ B 活性化を誘導することが知られたタンパク質キナーゼに対する RNAi スクリーニングを行ったところ、NIK (NF κ B-inducing kinase) の RNAi により NF κ B 恒常的活性化が抑制されることがわかった。NF κ B 非活性化株と比較すると、活性化株では *NIK* mRNA および NIK タンパク質ともに発現が亢進していた。さらに、NIK の RNAi により NF κ B 恒常的活性化を抑制すると、細胞増殖が顕著に低下することがわかった。以上の結果から、高悪性乳癌細胞では、NIK 依存的に NF κ B が恒常的に活性化し、細胞増殖に必要な役割を果たしていることが示唆された (Yamaguchi N et al. Cancer Sci. (2009) に報告済み)。

2. 研究の目的

我々の解析から NIK-NF κ B シグナル伝達系は高悪性乳癌の治療標的になると考えられたが、これまでに NIK 阻害剤は開発されていない。そこで、高悪性乳癌の新たな治療標的の同定が必要と考え、(戦略 1) NIK 恒常的活性化機構の解析と、(戦略 2) 癌の悪性化に関わる NF κ B 標的遺伝子の解析を行った。

3. 研究の方法

戦略 1 では、高悪性乳癌細胞における NIK 恒常的活性化機構を解析した。正常細胞では、NIK は常にユビキチン-プロテアソーム系により分解されているが、細胞がある種のサイトカイン (Lymphotoxin β , CD40L など) により刺激されると NIK タンパク質が安定化して活性化する。しかし、高悪性乳癌細胞では、NIK mRNA、NIK タンパク質ともに発現が亢進していた。そこで、(i) 受容体の過剰発現やオートクラインによる細胞自立的な受容体シグナル活性化の解析、(ii) NIK シグナルソーム解析による NIK 活性化タンパク質の同定、(iii) プロモーター解析による *NIK* mRNA 発現を誘導する転写因子の同定の 3 つの方向から解析を行い、高悪性乳癌細胞において NIK 恒常的活性化に関わるタンパク質の特定を行った。

戦略 2 では、高悪性乳癌細胞において癌悪性化に関わる NF κ B 標的遺伝子を解析した。具体的には、NF κ B 恒常的活性化を抑制して発現量の低下する遺伝子をマイクロアレイにて同定し、機能解析により細胞増殖、転移・浸潤、血管形成などに関わるものの特定を行った。NF κ B 抑制には、高効率かつ特異的に NF κ B を抑制す

ることが可能な、アデノウイルスベクターによる NF κ B 抑制因子 I κ B のドミナントアクティブ変異体の発現系を用いた。

4. 研究成果

戦略 1 では、高悪性乳癌細胞では NIK 遺伝子のエピジェネティック変異により NIK mRNA が高発現して NF κ B 恒常的活性化を誘導していることを明らかにした (図 1)。この成果は英語論文にて発表を行った (Yamamoto M et al. Cancer Sci. (2010))。さらに、プロテオーム解析を行って NIK 活性化の新たな制御因子を複数同定した。この中には、酵素活性を有する新しいユビキチン制御因子も含まれており、創薬の有望な標的となる可能性がある。現在、これらの詳細な機能解析を進める、癌細胞における NIK 恒常的活性化との関連や癌悪性化との関連についても調べている。

戦略 2 においては、NF κ B が乳癌幹細胞の維持に関わるシグナル伝達系の活性化因子の発現を促進していることを明らかにした。実際に NF κ B やその因子の機能を増強もしくは抑制すると、乳癌幹細胞の割合が機能に相関して増加や減少することがわかった。このことから、NF κ B が乳癌幹細胞の維持に重要であることが明らかとなった。さらに、癌細

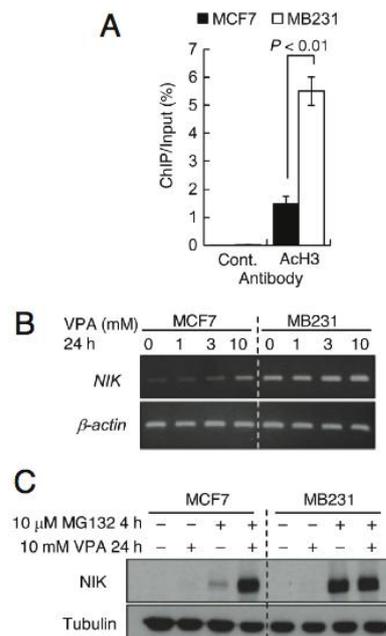


図 1. 高悪性乳癌細胞における NIK 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構

A. 高悪性乳癌細胞 (MB231) では、コントロール細胞 (MCF7) と比較して NIK 遺伝子のプロモーター領域のヒストンアセチル化が高いことを示す。B. コントロール細胞ではヒストン脱アセチル化阻害剤 (VPA) にて NIK 遺伝子の発現が誘導されるが、高悪性乳癌では誘導されない。C. コントロール細胞では VPA により NIK タンパク質も誘導される。

胞の転移・浸潤を促進する新たな細胞骨格制御因子も同定した。この因子は細胞骨格制御を介して癌悪性化に深く関わるシグナル伝達系の活性化を促進することも見出し、シグナル伝達系の新たなクロストークの存在を示せると考えている。現在、その分子機構について詳細な解析を進めているところである。

本研究成果により、高悪性乳癌のNF- κ B恒常的活性化機構やNF- κ Bの役割の一端が明らかになりつつあり、これらの解析を進めることにより新たな乳癌治療薬開発の足がかりになると期待している。

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 Epigenetic alteration of the NF- κ B-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer.

Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, Ishida T, Semba K, Watanabe S, Yamaguchi N, Inoue J. Cancer Sci. 101, 2391-2397 (2010) 査読有り

- ② NIK is involved in constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway and proliferation of pancreatic cancer cells.

Nishina T, Yamaguchi N, Gohda J, Semba K, and Inoue J. Biochem Biophys Res Commun. 388, 96-101 (2009) 査読有り

[学会発表] (計7件)

- ① NIK-dependent constitutive activation of NF- κ B is involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines.

Yamaguchi N, Kureha-Ito T, Yamamoto M, and Inoue J
Keystone Symposia, Keystone USA, 2011年3月6日-10日

- ② 乳癌源細胞における転写因子NF- κ B活性化の役割

山本瑞生、山口憲孝、渡邊慎哉、仙波憲太郎、井上純一郎
第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月24日

- ③ 乳癌における新規NF- κ B標的遺伝子の探索

伊藤拓、山口憲孝、渡邊慎哉、仙波憲太郎、井上純一郎
第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22日

- ④ Constitutive activation of NF- κ B in human cancer cell lines.

山口憲孝、井上純一郎
第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9日

- ⑤ 膵臓がん細胞において Nuclear factor- κ B inducing kinase (NIK) はNF- κ Bの恒常的活性化と細胞増殖に寄与する

仁科隆史、山口憲孝、仙波憲太郎、井上純一郎
第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月2日

- ⑥ 乳癌における新規NF- κ B標的遺伝子の探索

伊藤拓、山口憲孝、仙波憲太郎、井上純一郎
第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月1日

- ⑦ Basalタイプ乳癌細胞におけるNF- κ B inducing kinase (NIK)発現亢進のメカニズム解析

山本瑞生、山口憲孝、仙波憲太郎、井上純一郎
第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月1日

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/BunshiHatsugan/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 憲孝 (YAMAGUCHI NORITAKA)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：80399469

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：