

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790326

研究課題名(和文)

癌抑制遺伝子 R b の上皮細胞における機能と癌の浸潤・転移機構の解析

研究課題名(英文)

Significance of Rb pathway in the epithelial to mesenchymal transition inducing cancer invasion and metastasis

研究代表者

有馬 好美 (ARIMA YOSHIMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20309751

研究成果の概要(和文): 上皮性癌の転移は多段階のステップを踏んで成立することが知られており、癌細胞が原発巣の母集団から離れ、周囲組織へ浸潤する過程は、上皮間葉転換(EMT)という現象に起因することが近年明らかになりつつある。本研究により、癌抑制遺伝子 *Rb* の発現減少が EMT の誘導に関与し、*Rb* には上皮細胞において EMT を阻害する機能があることがわかった。*Rb* の不活化が、EMT を誘導することによって浸潤・転移にも影響を及ぼして癌の悪性化に関わっていると考えられる。

研究成果の概要(英文): Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is characterized by the loss of epithelial features and the acquisition of a mesenchymal phenotype. The EMT is considered as critical physiological processes in metazoan embryogenesis and wound healing. In carcinoma cells, EMT can be associated with increased aggressiveness, and invasive and metastatic potential. Therefore, suppression of EMT and mesenchymal phenotype can be a new therapeutic approach for cancers. We found that inactivation of a tumor suppressor *Rb* plays a crucial role in induction of EMT phenotype which is associated with aggressiveness of 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	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌抑制遺伝子、*Rb*、癌、EMT、浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)は、上皮細胞が間葉系様細胞に形質変化する現象であり、初期胚発生や創傷治癒の過程における重要なイベントであることが明らかにされてきた。EMT が運動能の亢進や細胞外マトリックスの産生量の亢進をもたらすことから、癌の浸潤・転移の

プロセスに関与することが示唆されており、近年その関与が明らかにされつつある(Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Thiery JP, *Nat Rev Cancer* 2:442-454, 2002)。

(2) *Rb* 遺伝子は遺伝性網膜芽細胞腫の原因遺伝子として単離されたが、その後の膨大な研究により遺伝性の腫瘍だけでなく肺癌、乳癌、

膀胱癌、前立腺癌などの一般的な腫瘍においても異常が見られる。とくに悪性度の高い癌において Rb タンパク質の発現異常が指摘されており、癌細胞の低分化度・高増殖能・高転移能との関連性が示唆されている。Rb の不活化が発癌や癌細胞の増殖に関与することはよく知られているが、癌細胞の浸潤・転移能との関連はあまり明らかになっていない。

(3) 申請者は、上皮性ヒト乳癌細胞における Rb の発現抑制により EMT 様の著しい形態変化が誘導されることを見出した(Arima Y et al., *Cancer Res* 68: 5104-5112, 2008)。また、EMT 誘導時に Rb タンパク質量の減少がみられたこと、Rb の強制発現により EMT が抑制されたことから、Rb の減少が EMT の誘導に関与すると考えられる。E-カドヘリンは上皮細胞の代表的な接着分子であり、EMT 時にその発現が抑制されることから EMT の代表的な指標となっている。さらに、ヒト乳癌組織において E-カドヘリンと Rb の発現を調べたところ、癌の浸潤先端部の EMT を起こしていると思われる領域では、E-カドヘリン、Rb ともに発現がみられなかった。Rb は E-カドヘリンの発現を正に調節することによって上皮性の表現型を維持しており、Rb が不活化すると E-カドヘリンの発現低下によって EMT が誘導され、癌の浸潤・転移に発展する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

発現減少あるいはリン酸化による Rb の不活化が、細胞周期停止機構の破綻によって発癌や高増殖能に関与するだけでなく、EMT を誘導することによって浸潤・転移にも影響を及ぼして癌の悪性化に関わっている可能性がある。そこで、Rb の不活化が関与する EMT 誘導作用の分子背景を明らかにし、さらに、Rb の不活化により誘導される EMT が癌細胞の浸潤・転移に貢献するかを明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

浸潤・転移能の高いトリプルネガティブ乳癌において、Rb タンパク質の免疫組織染色を行うことにより、Rb 不活化と浸潤・転移能の関連について検討を行った。さらに、Rb ノックダウン時に発現が誘導される EMT 関連転写因子群を明らかにし、どの転写因子が Rb 不活化の下流で EMT 誘導に関与しているかについて検討を行った。

4. 研究成果

乳癌の中で、ER(-), PGR(-), HER2(-)のトリプルネガティブに分類されるタイプは、全乳癌の 15-20%で、浸潤・転移能が高く、予後不良であることが知られている。これらの症例において、Rb タンパク質の発現を免疫組織染色法により調べたところ、Rb が発現していない症例は 22 例中 12 例あり、Rb が発現している症例についてリン酸化抗体を用いて染色したところ、Rb が過剰にリン酸化されている症例が 6 例あり、これらを合わせると、Rb の不活化が 22 例中 18 例でみられた。トリプルネガティブ乳癌は、遺伝子の発現パターンから分類される basal type に類似しており、Basal type 乳癌の細胞株は、E-cadherin(-), Vimentin(+)で、浸潤能が高く、形態も線維芽細胞様で、間葉系の性質をもっている。これらの細胞においても Rb が発現していないか、低発現か、過剰なリン酸化によって不活化されていることがわかった。

Rb の下流でどんな分子が関与して EMT を制御しているのか、Rb をノックダウンしたときにどんな遺伝子の発現が高くなるのか、まずは、EMT 誘導に関与する主要な転写因子、Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2 について調べたところ、Rb をノックダウンすると Zeb1, Zeb2 の発現が顕著に上昇することがわかった(図 1)。Zeb は Zinc finger domain を介して E-cadherin promoter の E ボックスに結合し、その発現を抑制することが知られている。

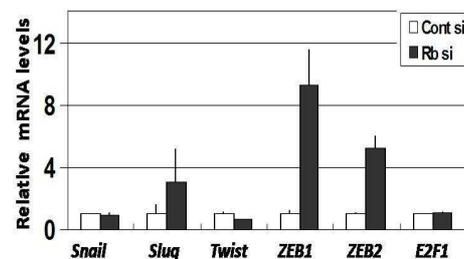


図1 ZEB1 and ZEB2 are upregulated in RB-depleted T47D cells

この Zeb の発現を抑制すると、RB ノックダウンで誘導される EMT 様の形態変化と浸潤能が抑制された(図 2)。このとき、E2F1 のノックダウンでは EMT 様の変化は抑制できなかったことから、Rb の下流で EMT に関与する因子として Zeb が重要であると考えられた。

さらに、Zeb は、Rb が不活化型であった basal-type の乳癌細胞株で高い発現がみられた(図 3)。

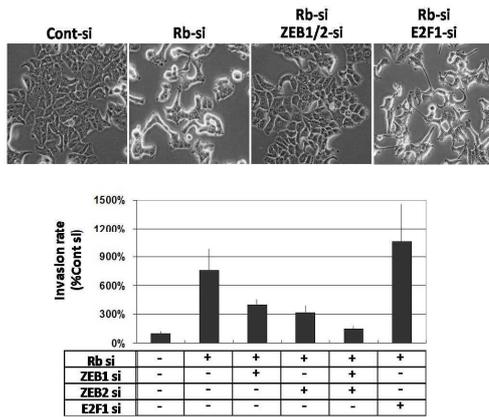


図2 ZEB1/2 knockdown inhibits EMT induced by Rb-depletion in T47D cells

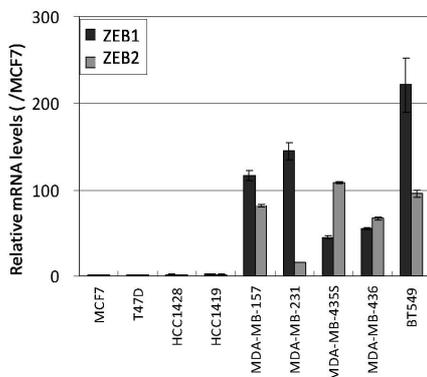


図3 ZEB1 and ZEB2 are upregulated in basal type breast cancer cell lines

乳癌臨床サンプルにおける Zeb1 タンパク質の発現について調べたところ、正常乳腺の上皮細胞では、Zeb1 は陰性であったが、悪性度の高い乳癌領域では、陽性であった(図4)。さらに、Rb タンパク質の発現との相関を調べたところ、Rb 発現と Zeb1 発現はちょうど逆の関係にあることがわかり、生体内においても Zeb が Rb の下流で機能している可能性が示唆された。

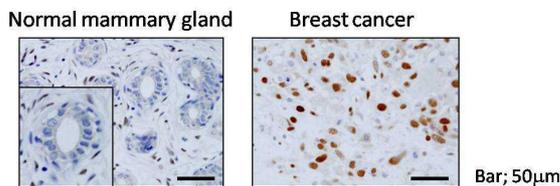


図4 Expression of ZEB1 in breast cancer specimens

そこで、間葉系の性質をもつ Basal type の乳癌細胞株において、Zeb の発現を抑制するという実験を行ったところ、浸潤能が顕著に

抑制された(図5A)。さらに上皮マーカーである E-cadherin と Cytokeratin18 の発現が亢進し(図5B,C) 上皮様に性質が変化した。

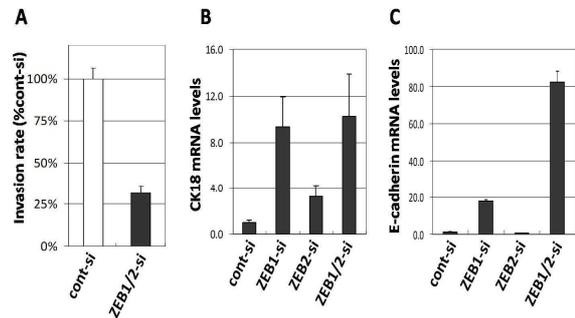


図5 ZEB1/2 depletion induces the epithelial phenotype in basal type breast cancer MDA-MB-231 cells

このように、Zeb の発現を抑制することによって、間葉系の性質をもっていた乳癌細胞の性質を上皮様に変化させることができたことから、Zeb は間葉系の性質を維持する重要な分子であると考えられる。これらの内容は、第 82 回日本生化学会大会、第 18 回日本乳癌学会、第 69 回日本癌学会にて発表し、現在、論文を作成中である。

また、乳癌のみならず、遺伝子疾患であるレックリングハウゼン病患者でみられる神経線維腫においても、Zeb1 が高発現しており、EMT シグナルが亢進している可能性について報告した(第 1 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会、Arima Y et al., Exp Derm 2009)。

Zeb は治療の標的になる可能性があり、Zeb を標的とした治療法の考案と Zeb の発現制御機構の解明を目指してさらに研究を進めたいと考えている。

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7件)

1. Arima Y, Hayashi H, Kamata K, Goto T, Sasaki M, Kuramochi A, Saya H: Decreased expression of neurofibromin contributes to epithelial mesenchymal transition in neurofibromatosis type 1 (NF1). *Experimental Dermatology* 19:e136-41, 2010 査読あり

2. Kai K, Arima Y, Kamiya T and Saya H:

Breast cancer stem cells. (Review)
Breast Cancer 17: 80-5, 2010 査読なし

3. 有馬好美、佐谷秀行：トリプルネガティブ乳癌における Rb 不活化と上皮間葉転換について
乳癌の臨床 Vol.25 No.6, 617-621, 2010 査読なし
4. 有馬好美、神谷敏夫、佐谷秀行：上皮間葉転換ががんの浸潤転移に果たす役割
細胞工学 別冊「がん転移 臨床と研究の羅針盤」 166-169, 2010 査読なし
5. 有馬好美、佐谷秀行：神経線維腫形成の分子機構に対する新たな治療戦略の考案
日本レックリングハウゼン病学会雑誌 第1巻第1号, 11-15, 2010 査読なし
6. Kai K, Nagano O, Sugihara E, Arima Y, Sampetean O, Ishimoto T, Nakanishi M, Ueno N, Iwase H, Saya H: Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Science* 100: 2275-82, 2009 査読あり
7. 有馬好美、神谷敏夫、佐谷秀行：上皮間葉転換と癌浸潤転移
細胞工学 Vol.28 No.7, 655-658, 2009 査読なし

〔学会発表〕(計4件)

1. Arima Y, Saya H
Significance of EMT in breast cancer cells (シンポジウム口頭発表)
第69回日本癌学会 2010年9月22日~24日(大阪)
2. Arima Y, Saya H
トリプルネガティブ乳癌における Rb 不活化と上皮間葉転換誘導因子 ZEB の発現について (シンポジウム口頭発表)
第18回日本乳癌学会 2010年6月24日~25日(札幌)
3. Arima Y
神経線維腫形成の分子機構 (教育講演口頭発表)
第1回日本レックリングハウゼン病学会 学術大会 2009年11月15日(東京慈恵会医科大学)
4. Arima Y, Saya H
癌における Rb 不活化に基づく上皮間葉

転換 (EMT) 誘導 (シンポジウム口頭発表)

第82回日本生化学会大会 2009年10月21日~24日(神戸)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 好美 (ARIMA YOSHIMI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20309751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし