

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15397

研究課題名（和文）乳癌におけるエクソソームの機能解析：微量金属元素による新たな分泌制御機構の解明

研究課題名（英文）Function of exosomes in breast cancer: The novel mechanism of exosome secretion by trace metals

研究代表者

岩渕 英里奈 (Iwabuchi, Erina)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70837278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：乳癌組織を用いた免疫組織化学にて細胞内小器官への亜鉛の取り込みに関わる亜鉛トランスポーターの発現と、乳癌の悪性度の指標となるいくつかの臨床病理学的因子との間に有意な逆相関が認められた。また、乳癌培養細胞を用いた検討では亜鉛トランスポーターが成長因子のシグナル伝達経路を介して癌細胞の遊走能の抑制に関与することが示唆された。したがって、亜鉛トランスポーターが乳癌の進展において抑制的に働いている可能性が考えられた。また、亜鉛添加により、エクソソーム分泌に関わるタンパク質間相互作用関連因子の発現増加傾向が認められており、亜鉛がエクソソームの分泌に関わる可能性も示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞内小器官内外の輸送に関与する亜鉛トランスポーターが乳癌細胞の悪性化を抑制することが示唆され、亜鉛トランスポーターの乳癌に対する新しい知見を得た。また、その抑制機序として成長因子のシグナル伝達経路を介して機能していることも示した。本研究により乳癌の新しい進展経路を明らかにし、今後の乳癌の診断や治療の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, immunohistochemical analysis in breast cancer cases revealed a significant inverse association between the expression of zinc transporters and some clinicopathological factors that are indicators of breast cancer malignancy. Furthermore, in vitro studies suggested that zinc transporters are involved in the inhibition of cell migration via the signaling pathway of growth factors. Our results indicated that the zinc transporter could suppress the progression of breast cancer. In addition, ZnCl<sub>2</sub> treatment of breast cancer cells increased the expression of protein-protein interaction-related factors involved in exosome secretion, indicating the possibility that zinc is involved in exosome secretion.

研究分野：人体病理学，腫瘍学

キーワード：乳癌 亜鉛トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは内包するタンパクおよび核酸により癌の浸潤・転移、薬剤耐性、アポトーシス回避、腫瘍免疫抑制などに関与することが報告されており (Lowry MC et al., Clin Chem, 2015), 癌細胞や間質の正常細胞から分泌されるエクソソームが癌の進展に関わり、個別化医療実施のための解析対象として注目されている。一方、乳癌においては細胞内への亜鉛の取り込みに関与する Zip6 はエストロゲン受容体陽性乳癌において上皮間葉転換 (EMT) の抑制やアポトーシス促進に、Zip10 は癌細胞の遊走促進に働くことも報告されている (Takatani-Nakase T et al., Biol Pharm Bull, 2018)。また、小胞体に存在し、細胞内小器官外への亜鉛の排出に関わる Zip7 のリン酸化は、内分泌療法剤タモキシフェンの耐性に関わることも報告されており (Ziliotto S et al., Metallomics, 2019), 亜鉛トランスポーターが細胞内小器官の機能や乳癌の進展に関与する可能性が示唆されているが、多くの亜鉛トランスポーターの機能に関しては明らかではない。本研究では、エクソソーム分泌機構に関わる因子として微量金属元素・亜鉛に着目し、亜鉛の細胞内外および細胞内小器官内外の輸送に関わるトランスポーターが乳癌に及ぼす影響とエクソソーム分泌との関係について検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、乳癌組織を用いた免疫組織化学を実施し亜鉛の細胞内外および細胞内小器官内外への輸送を担う亜鉛トランスポーターの発現と臨床病理学的因子との関係を検討した。また、亜鉛トランスポーターは二量体を形成することから、乳癌組織での二量体の検出も試みた。乳癌細胞株を用いた検討では、亜鉛トランスポーターが乳癌細胞の増殖能や遊走能に及ぼす影響を明らかにし、さらに RNA-seq および抗体アレイにより、その機能に関与するシグナル伝達経路を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫組織化学

乳癌組織 114 症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を本研究では使用した。ストレプトアビジン・ビオチン法による免疫組織化学にて、亜鉛トランスポーターの発現を検討し、臨床病理学的因子との関係を解析した。

#### (2) 近接ライゲーションアッセイ

Duolink In Situ PLA kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) を使用し、サンプルにはホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。DAPI による核染を行い、蛍光顕微鏡にて二量体を検出した。

#### (3) 増殖能および増殖能の検討

乳癌細胞株として MCF-7 および T-47D を用いて実施した。100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 存在下で siRNA を用いて ZnT5 の発現をノックダウンし増殖能は WST-8 アッセイ、遊走能は創傷治癒アッセイにて評価した。

#### (4) EMT マーカーの発現検討

100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 存在下で siRNA を用いて ZnT5 の発現をノックダウンし、RNA を抽出した後 cDNA を作製して qPCR により EMT 関連マーカーの発現変動を検討した。

#### (5) 抗体アレイ

100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 存在下で siRNA を用いて ZnT5 の発現をノックダウンした乳癌細胞株よりタンパクを抽出して成長因子抗体アレイにより種々の増殖シグナルに関連するタンパク発現の変動を検討した。

#### (6) RNA-seq

100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 存在下で siRNA を用いて ZnT5 の発現をノックダウンした乳癌細胞株より RNA を抽出して RNA-seq を実施し、そのデータをもとに発現変動遺伝子解析を行った。(Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd., China)

#### (7) 乳癌細胞株由来エクソソームの検出

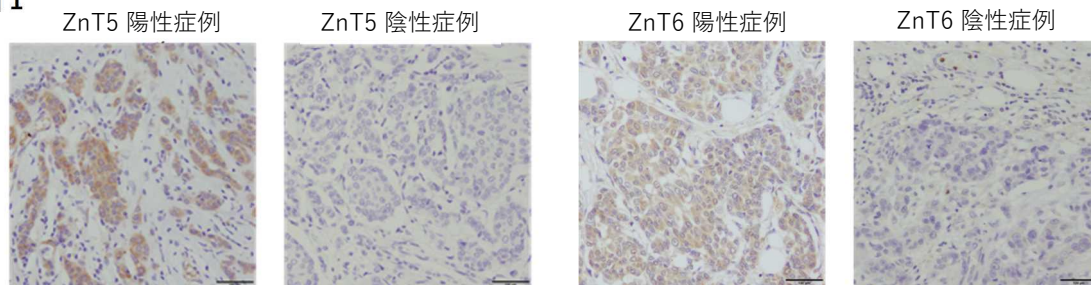
エクソソームマーカーに対する抗体を固相化したマイクロプレートを用いて、サンドイッチ ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) にて乳癌細胞株由来エクソソームを検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳癌組織における亜鉛トランスポーターの発現と臨床病理学的因子との関係

免疫組織化学によりヒト乳癌組織にて亜鉛トランスポーターの発現が認められた (図 1). また, 亜鉛トランスポーターの発現と, 乳癌の悪性度の指標となるいくつかの臨床病理学的因子との間に有意な逆相関が認められた. その他の亜鉛トランスポーターに関しても現在解析を進めている. また, ZnT5 および ZnT6 の二量体の検出も乳癌組織にて確認した.

図 1



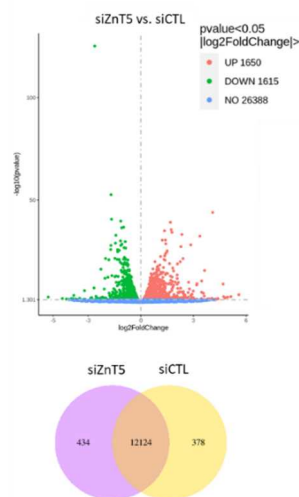
##### (2) 亜鉛および亜鉛トランスポーターの発現が乳癌細胞に与える影響

ZnT5 および ZnT6 は二量体を形成して亜鉛の細胞内小器官への取り込みに関与することから ZnT5 をノックダウンして乳癌細胞株における影響を検討した. ZnT5 ノックダウンによる増殖能への有意な影響は認められなかった一方で, 遊走能に関しては亜鉛存在下で乳癌細胞での抑制が認められた. また亜鉛存在下で ZnT5 ノックダウンにより乳癌細胞の遊走能は有意に促進され, さらに上皮系マーカーの発現減少と間葉系マーカーの発現上昇が認められたことから, ZnT5 ノックダウンにより EMT が促進する可能性が示唆された.

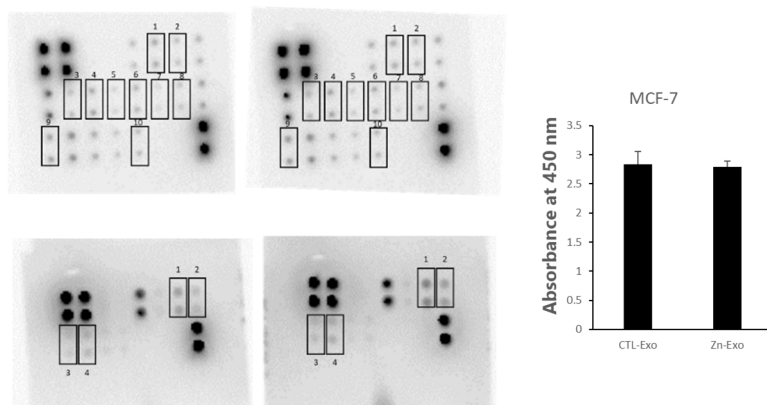
抗体アレイおよび RNA-seq の結果から ZnT5 ノックダウンにより, TGF- $\beta$  経路にかかわる遺伝子やタンパク発現の増加が認められた (図 2A). したがって ZnT5 ノックダウンによる遊走能の促進は TGF- $\beta$  経路が関わることを示唆された. また, その他の成長因子の発現変動も認められているため, 現在検証を進めている.

さらに, 亜鉛添加と培養上清中のエクソソーム分泌量との関係を ELISA にて検討したが, 有意な変化は認められなかった (図 2B).

図 2 A



B



本研究では, エクソソーム分泌の制御機構に関わる因子として亜鉛に着目し, 合わせて亜鉛の細胞内および細胞内小器官内への輸送を担う亜鉛トランスポーターが乳癌細胞に及ぼす影響を検討した. ヒト乳癌組織を用いた免疫組織化学では細胞内小器官への亜鉛の取り込みに関わる亜鉛トランスポーターの発現と, 乳癌の悪性度の指標となるいくつかの臨床病理学的因子との間に有意な逆相関が認められた. また, 乳癌細胞株を用いた検討から亜鉛トランスポーターの発現が乳癌細胞の TGF- $\beta$  経路を介した遊走能や浸潤能の抑制に関わることを示唆された. 本研究では, 亜鉛添加と培養上清中のエクソソーム分泌量との関係を ELISA にて検討したが, 有意な変化は認められなかった. 一方で亜鉛添加により, エクソソーム分泌に関わるタンパク質間相互作用関連因子の発現増加傾向が認められており, 亜鉛がエクソソームの分泌に関わる可能性も示された. 亜鉛および亜鉛トランスポーターの乳癌細胞に及ぼす影響とエクソソーム分泌との関係について今後も検討を続ける予定である.

<引用文献>

- ① Lowry MC, Gallagher WM, O'Driscoll L. The Role of Exosomes in Breast Cancer. Clin Chem. 2015 Dec;61(12):1457-65.
- ② Takatani-Nakase T. Zinc Transporters and the Progression of Breast Cancers. Biol Pharm Bull. 2018;41(10):1517-1522.
- ③ Ziliotto S, Gee JMW, Ellis IO, Green AR, Finlay P, Gobbato A, Taylor KM. Activated zinc transporter ZIP7 as an indicator of anti-hormone resistance in breast cancer. Metallomics. 2019 Sep 1;11(9):1579-1592.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|                                                                                                                             |                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Iwabuchi Erina, Miki Yasuhiro, Sasano Hironobu                                                                    | 4. 巻<br>54            |
| 2. 論文標題<br>The Visualization of Protein-Protein Interactions in Breast Cancer: Deployment Study in Pathological Examination | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA                                                                                  | 6. 最初と最後の頁<br>177～183 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1267/ahc.21-00084                                                                             | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>—             |

|                                                                                                                        |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Iwabuchi Erina, Miki Yasuhiro, Suzuki Takashi, Sasano Hironobu                                               | 4. 巻<br>2               |
| 2. 論文標題<br>Visualization of the protein-protein interactions of hormone receptors in hormone-dependent cancer research | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Endocrine Oncology                                                                                           | 6. 最初と最後の頁<br>R132～R142 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1530/E0-22-0059                                                                          | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>—               |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

|                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Erina Iwabuchi, Yasuhiro Miki, Ayako Kanai, Takanori Ishida, Hironobu Sasano |
| 2. 発表標題<br>The exosome marker CD63 and Caveolin-1 in breast cancer patients             |
| 3. 学会等名<br>American Association for Cancer Research Annual Meeting 2021（国際学会）           |
| 4. 発表年<br>2021年                                                                         |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>岩渕英里奈                      |
| 2. 発表標題<br>タンパク質間相互作用可視化技術の乳癌病理検査への展開 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本組織細胞化学総会・学術集会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2021年                       |

|                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Erina Iwabuchi, Yasuhiro Miki, Ayako Kanai, Takanori Ishida, Hironobu Sasano |
| 2. 発表標題<br>Association between Caveolin-1 and exosomes in breast cancer                 |
| 3. 学会等名<br>第80回 日本癌学会学術総会                                                               |
| 4. 発表年<br>2021年                                                                         |

|                                            |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>岩渕英里奈                           |
| 2. 発表標題<br>タンパク質間相互作用可視化技術 ～新しい乳癌病理検査への展望～ |
| 3. 学会等名<br>仙台内分泌フォーラム2022（招待講演）            |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Erina Iwabuchi, Yasuhiro Miki, Junyao Xu, Takanori Ishida, Hironobu Sasano              |
| 2. 発表標題<br>Zinc transporter ZnT5 Involvement in Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer |
| 3. 学会等名<br>END02022（国際学会）                                                                          |
| 4. 発表年<br>2022年                                                                                    |

|                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Erina Iwabuchi, Kento Iida, Yasuhiro Miki, Koki Hasegawa, Takumi Fukasawa, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Takashi Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Detection of somatostatin receptors using ligand derivative staining in breast cancer                                       |
| 3. 学会等名<br>第81回 日本癌学会学術総会                                                                                                              |
| 4. 発表年<br>2022年                                                                                                                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|