

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390301

研究課題名(和文) 乳癌の血管内皮増殖因子関連マイクロRNAの同定と抗VEGF療法感受性予測への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism in direct effect of VEGF onto breast cancer cells

研究代表者

佐藤 史顕 (SATO, FUMIAKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20467426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳癌細胞では、VEGFからの直接作用が抗VEGF療法の作用機序となっているとの仮説を立てた。その乳癌細胞におけるVEGFの直接作用の分子機序の解明が、本研究の目的である。MDA-MB-231乳癌細胞株のVEGFノックアウト株、可溶性NRP1発現株を作成することで、MB-231細胞が、VEGFよりVEGFR経由でなくNRP1経由でシグナルを得ていることが判った。またこれらの細胞株の遺伝子発現解析から、下流の因子Xとcdc42を制御しfilopodia形成を促進させることで、細胞形態を紡錘形にさせ、cell migrationを亢進していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of direct effect by VEGF to breast cancer cells. In this study, VEGF signal into MB-231 cells was blocked by VEGF-knockout and soluble NRP1 expression. Experiments using these cells showed that MB-231 cells are directly stimulated by VEGF via NRP1 not VEGFR, which contributes to spindle-like morphology formation and higher cell migration activity of breast cancer cells. According to microarray-based gene expression analysis of these cells, VEGF/NRP1 signaling modulates the expression of factor X that is negative regulator of cdc42. In summary, VEGF changes morphology of MB-231 cells and stimulates motility of MB-231 cells by VEGF/NRP1/factor X/cdc42 signaling pathway.

研究分野：乳腺外科

キーワード：乳癌 VEGF NRP1 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

抗 VEGF 抗体薬である Bevacizumab は、2004年米国食品医薬品局 (FDA) により未治療転移性大腸癌の治療薬として承認され、2008年には、HER2 陰性の未治療転移性乳癌に対する治療薬としてパクリタキセルとの併用療法において追加承認された。日本においても厚生労働相が、2007年に治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対する治療薬として承認し、2011年9月に手術不能又は再発乳癌に対して適応拡大の承認をした。乳癌において、Bevacizumab 療法は、奏効率や無増悪生存期間の延長を認めるものの全生存期間の改善が認められていない(Brufsky AM, Rugo HS, et al, 2011 JCO)。Bevacizumab 有効症例はサブタイプ分類とは独立しており、Bevacizumab 有効症例の層別化が重大な臨床課題となっているが、奏功症例を予測する有効なバイオマーカーはまだ見出されていない。

Bevacizumab の臨床治験である NO16966 (転移性大腸癌, Foerzler, et al. ASCO GI 2010) AVAGAST (胃癌, Shah et al, ESMO, 2010) に於いて、VEGF のコレセプターである neuropilin(NRP1) の発現量が Bevacizumab 奏功度と弱いながらも逆相関する事が示されている。この知見は、Bevacizumab による VEGF 中和は血管内皮細胞だけでなく癌細胞にも影響を及ぼしていることを示唆している。

一方、遺伝子発現の調節分子の一つで小分子 RNA であるマイクロ RNA (microRNA) が、癌の発生・進展・悪性度に関与することが判明し注目を浴びるとともに、そのバイオマーカーとしての重要性も認識されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、「乳癌細胞は VEGF から直接作用を受けており、抗 VEGF 療法の作用機序となっており、そこに microRNA を介する分子機序が関与している」という仮説を立てた。その乳癌細胞における VEGF の直接作用と、それに関連 microRNA を同定し、その機能を明らかにする事で、乳癌の抗 VEGF 療法の効果予測に応用することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 使用細胞株

VEGF 発現を RT-PCR 法で確認し、MDA-MB-231 細胞を選択した。

2) VEGF の Loss of function 実験

Bevacizumab (Bev) の暴露、CRSPr/Cas9 システムによる VEGF のノックアウト細胞を作成。また、VEGF の受容体の一つの NRP1 の細胞外ドメインのみ発現した soluble NRP1 (sNRP1)

を Lenti-virus ベクターで強制発現させ、VEGF を中和させる細胞株も作成した。

3) 遺伝子発現解析

① mRNA 発現解析: Agilent 社製マイクロアレイを使用。

② miRNA 発現解析: 東レ社製 3D-Gene miRNA chip

4) 表現型解析

① 細胞増殖: WST-8 法を採用

② 細胞形態: 細胞周囲径を Image-J を用いて計測

③ 細胞運動能: Transwell チャンバーを用いた cell migration 能を評価

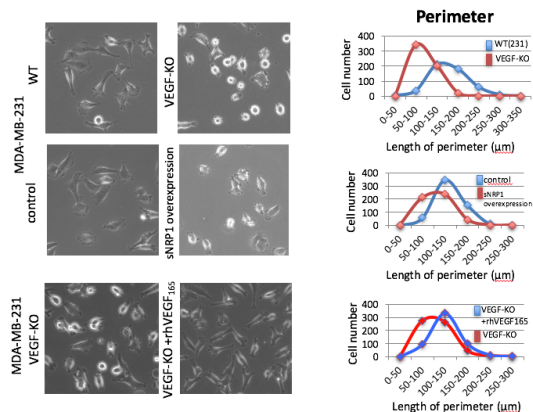
5) 因子 X の loss of function 実験

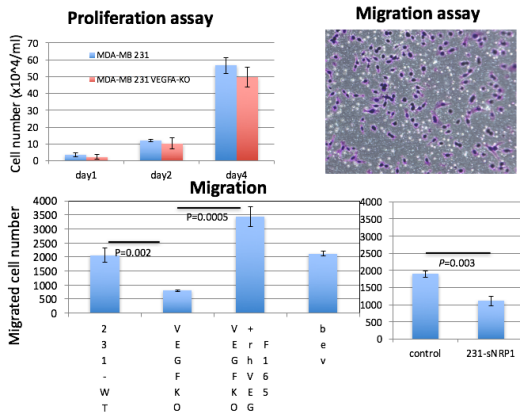
因子 X に対する siRNA を 2 種類合成 (siX-3, siX-5) し、リポフェクション法で導入した。

4. 研究成果

1) まず、MB-231 細胞に Bev を暴露によって変化する microRNA を同定するために、Bev 暴露 MB-231 細胞とコントロール MB-231 細胞の microRNA 発現プロファイルを microRNA マイクロアレイ法で比較した。しかし、複数回施行した実験で一定して変化する microRNA を同定できなかった。また、細胞増殖、細胞形態、細胞運動能にも Bev 暴露は影響を与えなかった。

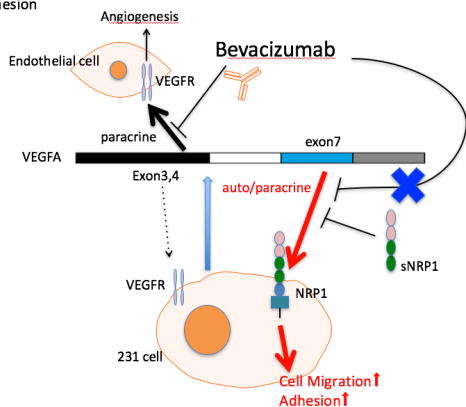
2) MB-231 細胞が本当に抗 VEGF 療法の直接作用に対して耐性であるかどうかの確認のため、VEGF をノックアウトした MB-231 細胞を CRSPr/Cas9 システムで作成した (231-VEGF/KO)。すると、細胞形態が 231-VEGF/KO 細胞は、小型円形になっており細胞周囲径を計測すると有意に短縮していた。また、Transwell による cell migration 能も有意に低下した。





3) この Bev 暴露と VEGF ノックアウトでの表現型の差から、MB-231 細胞は VEGF からの刺激を VEGFR 以外の受容体を介して得ているとの仮説を得た。VEGFR 以外の VEGF 受容体として NRP1 を想定した。VEGFA の exon3-4 からのアミノ酸部位が VEGFR に結合するのを Bev は阻害するが、NRP1 には VEGFA の exon7 からの部位が結合することが判っている。そこで可溶性 NRP1 (sNRP1) を強制発現させ、自ら分泌した VEGF を中和させる MB-231 細胞を作成した (231-sNRP1)。この細胞の細胞形態、細胞運動能は、231-VEGF/KO 細胞と同様の表現型をもっていることが示された。

Schematic of the VEGFA/NRP1 signaling pathway to promote cell migration and adhesion



#### 4) Recovery 実験

231-VEGF/KO 細胞にヒト recombinant VEGFA165 を投与すると、細胞形態と cell migration 能の表現型の変化が、野生型 MB-231 細胞のものに戻ることを確認した。つまり、上記を総合すると、MB-231 細胞は VEGF から刺激を受けているが、それは VEGFR 経路ではなく、NRP1 経路であるため Bev 治療耐性である事が判明した。

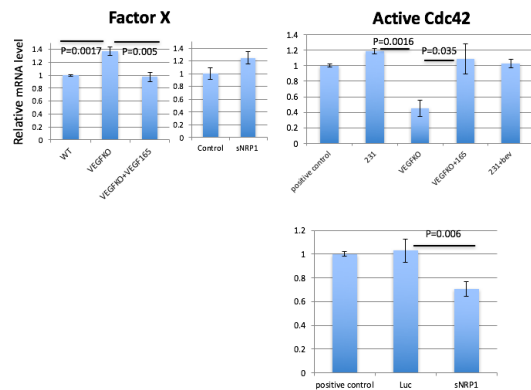
5) 次に、VEGF/NRP1 シグナルの下流で細胞形態と細胞運動能に関与する遺伝子の同定を試みた。MB-231 細胞、231-VEGF/KO、231-sNRP1、231-VEGF/KO+rVEGFA165 の 4 種類の細胞の遺伝子発現を Agilent 社製 mRNA マイクロアレイチップを使って解析した。そこで、MB-231 細胞と 231-VEGF/KO+rVEGFA165 に比べて 231-

VEGF/KO、231-sNRP1 細胞で有意に変化している遺伝子のリストを得た。その中で因子 X が 231-VEGF/KO、231-sNRP1 細胞で上昇していることに着目した。

6) そこで、因子 X は下流の cdc42 の活性型を減少させる事が知られているので、VEGF/NRP1 シグナルは、因子 X を減少させることで活性型 cdc42 を増加させ、filopodia 形成を促進させることで、紡錘型細胞形態と cell migration 能の亢進をさせているとの仮説を立てた。

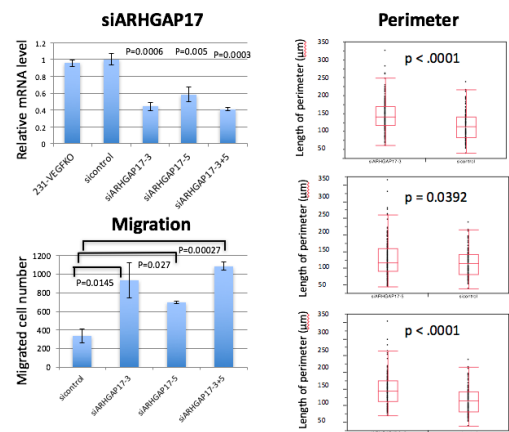
#### 7) 活性型 cdc42 の測定。

野生型 MB-231 細胞に対して、231-VEGF/KO、231-sNRP1 細胞では活性型 cdc42 は増大しており、231-VEGF/KO+rVEGFA165 は野生型と差がなかった。



#### 8) Recovery 実験 2

231-VEGF/KO で上昇している因子 X を siRNA で低下させたところ、細胞周囲径が増大し、cell migration 能が回復した。



#### 9) まとめ

MDA-MB-231 細胞が、VEGF より VEGFR 経路でなく NRP1 経路でシグナルを得て、下流の因子 X と cdc42 を制御し filopodia 形成を促進させることで、細胞形態を紡錘形にさせ、cell migration を亢進していることが判明した。

## 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5件)

① Sato F, Saji S, Toi M. Genomic tumor evolution of breast cancer. *Breast Cancer*, 23(1), p4-7, 2016. (査読あり)  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12282-015-0617-8>, doi:  
10.1007/s12282-015-0617-8

② Li W, Saji S, Sato F, Noda M, Toi M. Potential clinical applications of matrix metalloproteinase inhibitors and their future prospects. *Int J Biol Markers*. 2013 Jun 28;28(2):117-30. (査読あり)  
<http://www.biological-markers.com/article/potential-clinical-applications-of-matrix-metalloproteinase--inhibitors-and-their-future-prospects>, doi:  
10.5301/jbm.5000026.

③ Itou J, Tanaka S, Sato F, Akiyama R, Kawakami Y, Toi M. An optical labeling-based proliferation assay system reveals the paracrine effect of interleukin-6 in breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jan;1853(1):27-40. (査読あり)  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488914003553>, doi:  
10.1016/j.bbamcr.2014.10.004.

④ Itou J, Tanaka S, Li W, Matsumoto Y, Sato F, Toi M. Data of a fluorescent imaging-based analysis of anti-cancer drug effects on three-dimensional cultures of breast cancer cells. *Data Brief*. 2015 Oct 8;5:429-33. (査読あり)  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352340915002310> doi:  
10.1016/j.dib.2015.09.037.

⑤ Li W, Itou J, Tanaka S, Nishimura T, Sato F, Toi M. A homeobox protein, NKX6.1, up-regulates interleukin-6 expression for cell growth in basal-like breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 2016 May 1;343(2):177-89. (査読あり)  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482716300635>, doi:  
10.1016/j.yexcr.2016.03.023.

[学会発表] (計2件)

① 木曾 末厘乃、佐藤 史顕、蒲 風玲、佐治 重衡、戸井 雅和  
乳癌細胞における血管内皮増殖因子(VEGF)関

連 microRNA の解析。

第17回日本がん分子標的治療学会(京都)  
2013年6月13日

② Marina Kiso, Fumiaki Sato, Sunao Tanaka, Masakazu Toi.  
VEGFA/NRP1 signal contributes to cell adhesion and motility in breast cancer cells. 米国癌学会 (New Orleans)  
2016年4月17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  
特に無し。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 史顕 (SATO, Fumiaki)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 20467426

(2) 研究分担者

戸井 雅和 (TOI, Masakazu)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 10207516

上野 貴之 (UENO, Takayuki)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
(転出→杏林大学・講師)  
研究者番号: 40452362

佐治 重衡 (SAJI, Shigehira)

京都大学・大学院医学研究科・特定准教授  
(転出→福島県立医科大学・教授)  
研究者番号：80446567

(3)連携研究者

三上 芳喜 (MIKAMI, Yoshiaki)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
(転出→熊本大学・大学院医学研究科・教授)  
研究者番号：90248245