

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08358

研究課題名(和文)新規転写抑制因子標的遺伝子群から見た非浸潤性乳癌進行の分子病理学的機構

研究課題名(英文) Downstream of newly identified transcriptional repressor and its role in the progression of non-invasive breast cancer.

研究代表者

笠井 謙次 (KASAI, KENJI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌の進展過程で発現低下する遺伝子TSHZ2を同定した。TSHZ2はHedgehogシグナル伝達に關与する転写活性化因子GLI1及び転写抑制共役因子CtBP2と核内複合体を形成し、正常乳管上皮細胞でGLI1による標的遺伝子転写活性化を抑制していることを見出した。さらにGLI1標的遺伝子以外でTSHZ2により制御される遺伝子群を見出すため、網羅的発現遺伝子解析とNCBIデータベース検索を行った結果、FAM64A、FAM83D、DLGAP5、FOXM1、DONSONを見出した。特にFAM64Aは、トリプルネガティブ乳癌においてクロマチン制御因子を介して細胞生存に關わる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：I identified TSHZ2 as a down-regulated gene during breast carcinogenesis. TSHZ2 was found to make a ternary complex with GLI1 and CtBP2 in the nucleus of normal duct epithelium and suppress the target gene expression of GLI1. This indicates that down-regulated TSHZ2 and in turn up-regulated target genes of GLI, such as CXCR4 and AEBP1, would be responsible for breast cancer progression. I next identified FAM64A, FAM83D, DLGAP5, FOXM1 and DONSON as candidates of TSHZ2 target genes. Especially, I found that FAM64A associates with several nuclear proteins which are involved in chromatin remodeling and DNA replication.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 遺伝子制御 Hedgehog TSHZ2 FAM64A

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌進展に関わる責任遺伝子について、多くの網羅的解析研究が国内外で進行している。

その結果、現在までにいくつかの遺伝子増幅あるいは欠失領域が同定されているが、これら遺伝子の機能に関する知見は十分ではない。

また乳癌の発生・進展あるいは癌幹細胞形成において、Wnt、NOTCH や Hedgehog (Hh) シグナルの関与や、これらシグナルの治療標的としての可能性が重要視されている。しかし、Hh シグナル伝達機構自体や乳癌における Hh シグナル活性化機序は十分に解明されていない。

(2) 一方、本研究代表者による予備研究では、正常乳腺組織と比べ乳癌組織では TSHZ2 遺伝子の発現低下が観察された。

さらに TSHZ2 は正常乳管上皮において Hh シグナル系転写因子 GLI1 及び転写抑制共役因子 CtBP2 と核内複合体を形成し、GLI1 の転写活性化能を抑制することも明らかとなった。

すなわち乳癌の発生進展過程では、TSHZ2 の発現低下と共に、GLI1 標的遺伝子を含む TSHZ2 支配下の遺伝子群の活性化があるものと考えられた。

(3) しかし GLI1 系以外の TSHZ2 標的遺伝子やその機能は明らかではない。また浸潤性乳管癌 (IDC) と非浸潤性乳管癌 (DCIS) での TSHZ2 標的遺伝子の発現差なども不明である。

2. 研究の目的

本研究では TSHZ2 の機能解析を通じて、乳癌の進展機序、特に IDC と DCIS の細胞生物学的・病理学的差異を明確にすることを目指した。

具体的には、以下の各項を目的とした。

- (1) TSHZ2 標的遺伝子の解明
- (2) TSHZ2 標的遺伝子の機能解析
- (3) TSHZ2 及び標的遺伝子から見た IDC と DCIS の生物学的差異の解明

3. 研究の方法

(1) TSHZ2 標的遺伝子

元来内在性 TSHZ2 発現が低下しているヒト乳癌培養細胞株での TSHZ2 強制発現系または内在性 TSHZ2 発現を有する不死化ヒト乳管上皮細胞での TSHZ2 遺伝子干渉系を樹立し、これらと対照細胞を用いた遺伝子発現の網羅的解析から、TSHZ2 標的遺伝子候補を明らかにする。

(2) 機能解析

上記(1)で確認された標的遺伝子について、乳癌培養細胞株または不死化ヒト乳管上皮細胞を用いた、当該遺伝子強制発現系または遺伝子干渉系を作成し、文献上予測される当該遺伝子機能についての解析実験を行う。

(3) IDC・DCIS の差異

上記(1)で確認された標的遺伝子の抗体を入手し、これら遺伝子産物の担癌乳腺組織での発現状況を免疫組織化学的に解析することにより、

IDC と DCIS の差異を明らかにする。

4. 研究成果

(1) TSHZ2 標的遺伝子

内在性 TSHZ2 発現が低下しているヒト乳癌細胞株 MCF7 を基に、レンチウイルスベクターを用いて TSHZ2 強制発現細胞株を樹立し、対照として樹立した LacZ 強制発現細胞株との間で cDNA microarray 解析を行った。

その結果、TSHZ2 強制発現株にて発現低下した遺伝子 1,114 個を同定した。この数は当初の想定よりもかなり多く、これら全ての遺伝子について実験的に検証することは困難であった。

そこでこれら遺伝子群について、NCBI 登録済みデータベースあるいは PubMed による文献との比較検討を行い、乳癌にて発現亢進している遺伝子として矛盾ないものを選択した。さらに後日の免疫組織染色による解析に備え、市販抗体が存在する遺伝子を優先的に抽出した。

その結果、1,114 個の遺伝子のうち優先的に解析すべき TSHZ2 標的遺伝子候補として、FAM64A、FAM83D、DLGAP5、FOXM1、DONSON に絞り込んだ。

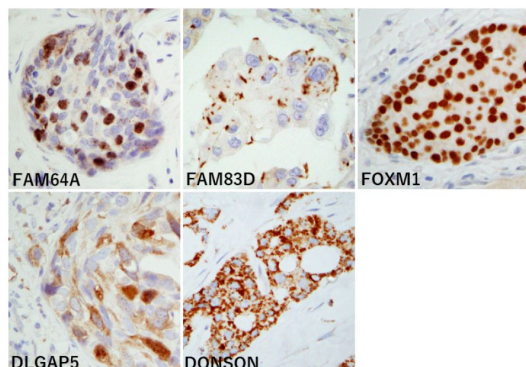
国立がん研究センター研究所清野透博士より供与を受けた不死化ヒト乳管上皮細胞 HMEC4tertshp16 細胞では、内在性 TSHZ2 に加え TSHZ1 及び TSHZ3 の発現を認めた。

そこで TSHZ2 特異的、あるいは TSHZ1-3 全てを干渉し得る siRNA を設計した。現在コントロール siRNA を含めた 3 群の siRNA にて処理した HMEC4tertshp16 細胞検体と共に、にて絞り込んだ 5 遺伝子に対する定量 RT-PCR プローブの準備を行い、TSHZ2 の有無によるこれら 5 遺伝子発現の変化を解析することにより、TSHZ2 支配の優位性を検証する予定である。

上記にて絞り込んだ 5 遺伝子産物に対する市販抗体を用いて、担癌乳腺組織の免疫組織染色を行った。その結果これら 5 遺伝子産物は、いずれも正常乳管上皮細胞に比し乳癌細胞で発現亢進していた(下写真)。

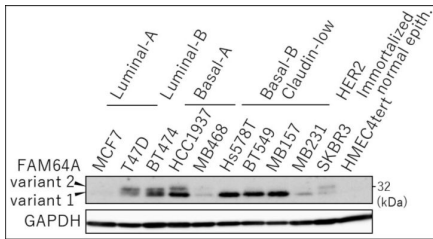
このうち FAM64A の機能は未だ明らかではないが、特にトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) 症例の半数において、その核に発現亢進を観察したことから、以下の(2)機能解析では FAM64A を優先的に研究した。

(免疫染色の仔細は(3)項参照)

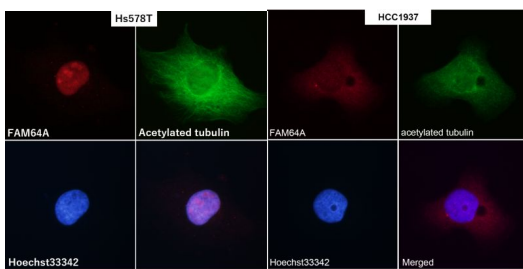


(2) 機能解析

以下の(3)に示す結果を踏まえ、各種ヒト乳癌培養細胞の Western プロット解析を行うと、一部の TNBC 細胞株ではストップコドン有する exon5 を残した、短い FAM64A バリエント 1 のみを発現していることが判明した(下図)。



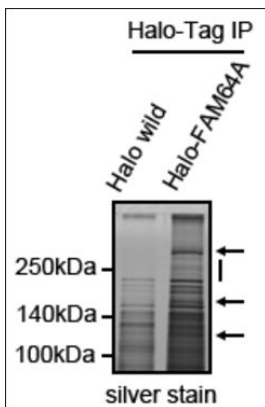
さらにこのバリエント 1 のみを発現する細胞株では、前頁乳癌症例の免疫組織染色と同様に、FAM64A は核に集積していた(下写真左側)。



次に FAM64A 特異的 siRNA を用いて遺伝子干渉実験を行うと、バリエント 1 と 2 を発現し、FAM64A の核内集積の明らかではない細胞株では細胞増殖に対する作用は明らかでなかったが、バリエント 1 のみを発現する Hs578T 細胞は細胞死に陥った。

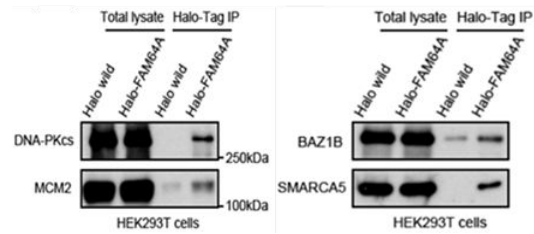
このことから、バリエント 1 のみを発現する乳癌細胞株(そして恐らく核 FAM64A 陽性の乳癌症例)では、FAM64A 依存性であると示唆された。

以上の FAM64A バリエント 1 の重要性を踏まえ、同蛋白の核内機能を明らかとするために、Halo-tag 遺伝子を対照として、Halo-tag 標識 FAM64A バリエント 1 遺伝子を HEK293T 細胞に強制発現させ、Halo あるいは Halo-FAM64A 結合蛋白を免疫沈降法にて回収し SDS-PAGE にて展開、銀染色を行った(下図)。



そして Halo-FAM64A 検体でのみ観察された数本のバンドから蛋白を回収しトリプシン消化後に液状クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)解

析を行った。その結果予測された蛋白に対する市販抗体を用いて、Western プロット解析を行った(下図)。



その結果 LC/MS 解析から FAM64A 結合を予測されたもののうち、クロマチン制御因子 SMARCA5・BAZ1B や DNA 複製に関わる DNA ヘリカーゼ MCM2、DNA 結合因子群をリン酸化する DNA-PKcs との結合を確認した。

以上から、TSHZ2 標的遺伝子候補である FAM64A はクロマチン制御因子・DNA 複製因子と結合し、一部の TNBC 細胞の生存に関与している可能性が示唆された。

(3) IDC・DCIS の差異

上記(2) で検索した遺伝子産物 FAM64A、FAM83D、DLGAP5、FOXM1、DONSON はそれぞれ IDC での発現亢進を認めたが、そのパターンは異なっていた。

FAM83D は細胞間領域あるいはゴルジ野と思われる領域に顆粒状陽性像を示した。DLGAP5 は腫瘍細胞内の一部の細胞において細胞質にびまん性陽性像を示した。FOXM1 は検索した殆ど全ての腫瘍細胞の核に、ほぼ均一な陽性像を示した。SIGMA 社抗体を用いた DONSON はほぼ全ての腫瘍細胞の細胞質に顆粒状陽性像を呈したが、文献的に予測される細胞内局在とは異なるものであったので、今後別抗体での検証を要する。

FAM64A について、術前化学療法を受けていない 98 例の乳癌手術材及び対照である正常乳腺部分から tissue microarray ブロックを作製し、免疫組織染色を行った。

その結果、Luminal 型などに比べ、TNBC ではその半数に核内 FAM64A の発現亢進を認めた(下表)。

FAM64A staining	Case	Case with Nuclear FAM64A(%)	Case with cytoplasmic FAM64A(%)
Luminal	63	3 (4.7%)	4 (6.3%)
Luminal HER2	12	2 (16.6%)	1 (8.3%)
HER2	5	1 (20.0%)	0 (0%)
TNBC	18	9 (50.0%)	0 (0%)
Total	98	15 (15.3%)	5 (5.1%)

FAM64A は正常乳管上皮の陽性率は極めて低いものの、高い核グレードの DCIS では陽性像を認めた。しかし、数少ないものの、微小浸潤を伴う症例での管内病変と浸潤病変の差異は明瞭ではなかった。

以上から、TSHZ2 標的遺伝子候補 FAM64A、

FAM83D, DLGAP5, FOXM1, DONSON のうち、特に FAM64A は TNBC の半数例でクロマチン制御因子等とのネットワークを介して腫瘍細胞の生存に關与している可能性が判明した。

FAM64A など上記遺伝子が真に TSHZ2 の支配下にあるかは、TSHZ2 あるいは TSHZ1-3 全ての siRNA 遺伝子干渉実験あるいは各遺伝子の転写調節領域の解析などを通じて判断する必要がある。

今後は FAM64A の核内機能をさらに解析すると共に、残り 4 遺伝子の乳癌発生・進展における役割も検討する必要があると考える。

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)

Riku M, Inaguma S, Ito H, Tsunoda T, Ikeda H, Kasai K.

“Down-regulation of the zinc-finger homeobox protein TSHZ2 releases GLI1 from the nuclear repressor complex to restore its transcriptional activity during mammary tumorigenesis.”

Oncotarget (査読有)2016;7(5):5690-701.

doi: 10.18632/oncotarget.6788.

Inaguma S, Riku M, Ito H, Tsunoda T, Ikeda H, Kasai K.

“GLI1 orchestrates CXCR4/CXCR7 signaling to enhance migration and metastasis of breast cancer cells.”

Oncotarget (査読有)2015;6(32):33648-57.

doi: 10.18632/oncotarget.5203.

[学会発表](計 3 件)

陸美穂、笠井謙次他

「新規転写抑制因子 TSHZ2 からみた乳癌進展機構」

第 104 回日本病理学会総会

平成 27 年 4 月 30 日 名古屋国際会議場

稲熊真悟、笠井謙次他

「ヘッジホッグ系転写因子 GLI1 は CXCL12/CXCR4 経路の活性化により乳癌細胞の遊走能を亢進させる」

第 104 回日本病理学会総会

平成 27 年 4 月 30 日 名古屋国際会議場

笠井謙次

「Hedgehog シグナル伝達から見た膵臓癌の分子病態」

第 64 回日本病理学会秋期特別総会 A 演説

平成 27 年 11 月 6 日 東京大学安田講堂

[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

愛知医科大学ホームページ

(<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/05.html>)

researchmap ホームページ

(<https://researchmap.jp/kenjikasai>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠井 謙次(KENJI KASAI)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号:70242857

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

池田 洋(HIROSHI IKEDA)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号:00131219

稲熊 真悟(SHINGO INAGUMA)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号:80410786

伊藤 秀明(HIDEAKI ITO)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号:90711276

(4)研究協力者

なし