

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15470

研究課題名(和文) 乳腺内物質動態制御に着目した新規乳がんリスク因子の実験的検証と関連分子機構の解明

研究課題名(英文) Research on the novel risk of breast cancer focusing of the regulation of endo/exogenous substances in mammary glands

研究代表者

豊田 優 (Toyoda, Yu)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80650340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、我が国の乳がん患者を対象とした疫学調査が実施され、ヒトABC輸送体ABCC11の野生型アレルが乳がんリスク・予後不良と正に相関するという知見が報告されている。ABCC11が排出型輸送体であることを踏まえると、ABCC11を介した乳腺内への物質放出が表現型の獲得に関連している可能性が考えられたが、その是非は明らかとなっていない。そこで本研究は、この仮説を検証することを目的として立案された。本研究により、動物モデルや細胞系を用いてABCC11を介して乳汁中に放出される物質を探索するための準備が整い、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, based on an epidemiological study focusing on the patients with breast cancer in Japan, it has been pointed out that the ABCC11 wild type (WT) could be associated with the risk of breast cancer. However, it has not been well understood whether ABCC11 WT really contributes to the breast cancer risk. The aim of this study was to clear the latent relationship. Since in vivo and in vitro models are arranged as well as metabolomics technique, key molecules that are substrates for ABCC11 and could affect the nature of mammary gland should be determined in the near future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳がん トランスポーター メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

我が国において、女性の乳がん罹患率は16人に1人とされ、発がん機序や予後因子の解明は焦眉の急である。近年、我が国の乳がん患者を対象とした疫学調査により、ヒト *ATP-binding cassette subfamily C member C11* (*ABCC11*) の遺伝子型が乳がんリスク・予後不良と正に相関することが報告された。しかし、このことを裏付ける分子機構は明らかとなっていない。

ABCC11 は、1382個のアミノ酸残基から構成され、12個の膜貫通領域を有するトランスポーター(膜輸送体)タンパク質である。*ABCC11* の生理的役割には未だ不明な点が多いものの、これまでに知られている他のABC輸送体と同様に、ATPの加水分解エネルギーを駆動力とする排出型輸送体として機能することが知られている。また、ヒトABC輸送体の多くが、がん細胞に多剤耐性能を与える薬物排出ポンプの実体として同定されてきた経緯を踏まえ、*ABCC11* による抗がん剤輸送が検討されている。その結果、*ABCC11* が5-フルオロウラシル(5-FU)やメトトレキサート(MTX)に代表される抗がん剤を輸送することが *in vitro* 輸送実験で確かめられている。

近年、*ABCC11* 遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP) 538G>A (Gly180Arg) がヒトの耳垢型(湿潤型・乾燥型)決定因子であること(1) および乳がん患者死亡率と湿潤型耳垢との間に正の相関があること(2) を糸口として、我が国の乳がん患者と健常人とを対象とした疫学研究が実施され、乳がんリスクと当該遺伝子多型の野生型アレルの存在(*ABCC11* 538G)との間に正の相関が見出された(3)。また、*ABCC11* が高悪性度の乳がんを高発現し、予後の悪さと相関することも報告された(4)。これらの知見に加え、野生型 *ABCC11* が湿潤型耳垢型や腋臭症リスクに代表されるアポクリン腺関連形質の決定因子であることを踏まえると、アポクリン腺と同様の分泌様式を示す分泌腺である乳腺の性質も、当該遺伝子多型(*ABCC11* c.SNP 538G>A)の影響を受けうることを示唆された。特に、野生型 *ABCC11* を発現するアポクリン腺が顕著な組織発達を示すこと、乳腺の増殖性変化が重要な乳がんリスク因子であることなどを合わせると、野生型 *ABCC11* が乳腺における増殖性の亢進を通じて発がんリスクを高める可能性が考えられた。

研究代表者らは、生体物質の体内動態を制御するABC輸送体に着目し、その生理的役割や疾患リスクとの関連を解明することで、ヒトの健康の維持や疾患の克服に貢献することを目指した研究を行っている。このうち

ABCC11 については、変異型である *ABCC11* Arg180 タンパク質が劣性表現型をもたらす細胞内分子機構を明らかにしたこと(5) などのみならず、*ABCC11* 遺伝子型とヒトにおけるアポクリン腺関連形質との関係に着目した研究を展開してきた背景を有する。このような状況のなか、先述した知見などを踏まえ、排出型膜輸送体 *ABCC11* タンパク質による乳腺内の物質動態制御が乳腺の性状変化を通じて、乳がんリスクの増加や予後の増悪に寄与するのではないかと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究で取り組む「排出型膜輸送体 *ABCC11* による乳腺内物質動態制御に関連した乳がんリスク仮説」は、(i) 本邦で行われた疫学調査の結果、*ABCC11* c.SNP 538G>A (Gly180Arg) が乳がんリスクと正の相関を示したこと、(ii) *ABCC11* Arg180 タンパク質が細胞内で速やかに分解されるタイプの機能欠損型タンパク質であること、などを発想のきっかけとしている。加えて、*ABCC11* 遺伝子多型と抗がん剤副作用との関連(6) などから推測される薬剤耐性を踏まえ、乳がん細胞への薬剤耐性付与とも協調しながら、*ABCC11* が乳がんの増悪に寄与する可能性を考えた。このような背景のもと、*ABCC11* に着目した本研究は企画されている。

3. 研究の方法

研究代表者は、これまでの研究でヒト *ABCC11* を発現する遺伝子改変マウス(*ABCC11* トランスジェニックマウス)の樹立に成功している。マウスをはじめとする齧歯類には *Abcc11* 遺伝子(および対応する遺伝子)がゲノム上に存在しないため、本研究では野生型マウスを陰性対照として用いることが可能である。また、実験動物の飼育環境は、水道水(東京都水)およびエサ(滅菌済み固形飼料)を自由に与え、室温 25°C、日照サイクル 12 時間である。なお、本研究における動物実験は、東京大学大学院医学系研究科・医学部に設置されている動物実験委員会の承認を得たうえで、東京大学大学院医学系研究科・医学部動物実験指針に従って実施された。

本研究では、輸送体としての *ABCC11* 機能によって、乳腺上皮細胞から乳腺内腔へと放出される内因性物質を探索するために、*ABCC11* トランスジェニックマウスと野生型マウスの乳汁成分を対象としたメタボローム差異解析を実施する。具体的には、授乳期にある各遺伝子型の雌マウスから、愛護的に乳汁を採取し、高分解能・精密質量分析を可

能とするオービトラップ型質量分析計 (Q exactive: サーマフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いて分析した後に、差異解析ソフト SIEVE プログラムを用いて取得データを解析し、ABCC11 トランスジェニックマウス群で有意に変動 (増加) している物質情報を取得することとなる。なお、マウスからの搾乳方法については、先行研究を参考に、オキシトシン投与方法を用いる。

ABCC11 依存的な薬剤耐性獲得について検討するために、試験薬物存在下で、ABCC11 発現細胞を用いた細胞生存試験を行う。過去の研究代表者の研究により、ABCC11 を哺乳類細胞に発現させるためのベクターは構築済みであったが、本研究で使用するための適切な ABCC11 の高発現細胞株を保有していなかったため、安定発現株を樹立し、実験に用いることになる。

4. 研究成果

ABCC11 発現動物モデルおよび ABCC11 高発現細胞モデルを用いた ABCC11 を介した物質動態制御の検討を行うための準備を進めた。

ABCC11 が雌マウスの個体生存に与える影響を調べるために、ABCC11 トランスジェニックマウスと野生型マウス (いずれも雌) を通常飼育し、生存期間を計測した。得られた結果をもとに、ログランク検定を行ったところ、ABCC11 トランスジェニックマウス群の生存期間が、野生型マウス群と比較して有意に短いことが判明した。現在、個体数を増やして実験結果の再現性を確かめるとともに、新たに見出されたこの表現型が乳がんの発症などと関連するかどうかについて検討を進めている。

マウスの乳汁を用いたメタボローム差異解析に関しては、授乳期にある雌マウスから安定的に搾乳する方法を確立するとともに、非ターゲットメタボロミクス手法を用いた差異解析ならびに構造情報の取得に必要な実験系を確立した。特に、後者については、ABCC11 と同じタンパク質ファミリーに分類され、基質特異性に関する情報が豊富な ABCC2 を対象として、構築した実験系が ABC 輸送体の新たな基質探索に応用可能であることを示すこともできた。現在、取得した乳汁試料を用いたメタボローム差異解析を行いながら、有意に変動が認められたピークに関して、構造情報の取得や ABCC11 による直接輸送の評価など、さらなる検討を行うための準備を進めている。

本研究において研究対象としている ABCC11 の発現ベクターは構築済みであった。

そこで、保有する発現ベクターを種々の培養細胞に導入し、薬剤耐性を利用した選別の後、ウエスタンブロットングを行った結果、期待される分子量のシグナルを検出することができた。また、細胞毒性試験により、樹立した ABCC11 発現 MDCKII 細胞が、Mock 細胞と比較して、抗がん剤耐性を示すことを確認した。また、安定発現株における目的遺伝子の挿入コピー数を制御するために、研究代表者が過去の研究において作製した ABCC11/pcDNA5/FRT ベクターを用いた、Flp-In system による安定発現株の樹立も進んでいる。現在、抗がん剤耐性を示したクローンのうち、今後の実験に使用するものを選別している。

< 引用文献 >

- (1) Yoshiura K. *et al.*, *Nat. Genet.* 38(3):324-30, 2006.
- (2) Petrakis NL. *Science* 173(3994):347-9, 1971.
- (3) Ota I. *et al.*, *Anticancer Res.* 30(12):5189-94, 2010.
- (4) Yamada *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.* 137(3):773-82, 2013.
- (5) Toyoda Y. *et al.*, *FASEB J.* 23(6):2001-13, 2009.
- (6) Magdy T. *et al.*, *Pharmacogenomics* 14(12):1433-48, 2013.

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 4 件)

- (1) Yu Toyoda, Tappei Takada, Tuneaki Gomi, Hiroshi Nakagawa, Toshihisa Ishikawa, and Hiroshi Suzuki. Clinical and molecular evidence of ABCC11 protein expression in axillary apocrine glands of patients with axillary osmidrosis. *International Journal of Molecular Sciences* 18(2):417, 2017. (査読あり) doi: 10.3390/ijms18020417.
- (2) Yu Toyoda, Tappei Takada, Hiroshi Miyata, Toshihisa Ishikawa, and Hiroshi Suzuki. Regulation of the Axillary Osmidrosis-Associated ABCC11 Protein Stability by N-linked Glycosylation: Effect of Glucose Condition. *PLoS ONE* 11(6):e0157172, 2016. (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0157172.
- (3) Yu Toyoda, Tappei Takada, and Hiroshi Suzuki. Halogenated hydrocarbon solvent-related cholangiocarcinoma risk:

biliary excretion of glutathione conjugates of 1,2-dichloropropane evidenced by untargeted metabolomics analysis. *Scientific Reports* 6:24586, 2016. (査読あり)
doi: 10.1038/srep24586.

- (4) Yu Toyoda, Tsuneaki Gomi, Hiroshi Nakagawa, Makoto Nagakura, and Toshihisa Ishikawa. Diagnosis of human axillary osmidrosis by genotyping of the human ABCC11 gene: Clinical practice and basic scientific evidence. *BioMed Research International* 2016:7670483, 2016. (査読あり)
doi: 10.1155/2016/7670483.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 豊田 優, 高田 龍平, 宮田 大資, 石川 智久, 鈴木 洋史. *N-結合型糖鎖によるヒト ABCC11 タンパク質の安定性制御とグルコースによる影響*. **第 89 回日本生化学会大会**, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城・仙台), 2016 年 9 月 25 日~27 日.
- (2) 豊田 優. *メタボロミクスを活用した、トランスポーター関連疾患の研究*. **生化学若い研究者の会 2016 春のセミナー**, 東京大学本郷キャンパス(東京・本郷), 2016 年 4 月 29 日.(招待講演)
- (3) 豊田 優, 中川 大, 高田 龍平, 五味 常明, 石川 智久, 鈴木 洋史. *アデノウイルスベクターを介した一過性導入法によるヒト ABC 輸送体 ABCC11 の in vivo 安定性評価*. **第 28 回 日本動物細胞工学会 2015 年度大会**, 東北大学 片平さくらホール(宮城・仙台), 2015 年 7 月 9 日~10 日.
- (4) Yu Toyoda, Tappei Takada, Hiroshi Nakagawa, Hiroshi Miyata, Tuneaki Gomi, Yoh-ichi Tagawa, Toshihisa Ishikawa, and Hiroshi Suzuki. Untargeted metabolomics analysis in ABCC11 Tg mouse. **Gordon Research Conference 2015 "Multi-Drug Efflux Systems" A paradigm shift from fundamental mechanisms to practical applications**, Lucca (Barga) (Italy), 2015 年 4 月 26 日~5 月 1 日.
- (5) Yu Toyoda and Toshihisa Ishikawa. Biomolecular characterization of human ABCC11 and its clinical implications. **Gordon-Kenan Research Seminar 2015 "Multi-Drug Efflux Systems" Learning from the Past to Innovate the Future**,

Lucca (Barga) (Italy), 2015 年 4 月 25 日~26 日.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) (Book chapter)
Toshihisa Ishikawa, and Yu Toyoda. Human ABC transporter ABCC11: Looking back pioneers' odyssey and creating a new path toward clinical application. in; Anthony M. George (Ed.) *ABC Transporters - 40 Years on* Springer International Publishing, pp.297-318, 2016.
doi: 10.1007/978-3-319-23476-2_12

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

自己紹介(研究室ホームページ内)
http://plaza.umin.ac.jp/~todaiyak/y_toyoda.php

6. 研究組織

- (1)研究代表者
豊田 優 (TOYODA, Yu)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 80650340
- (2)研究分担者
高田 龍平 (TAKADA, Tappei)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90376468
- 中川 大 (NAKAGAWA, Hiroshi)
中部大学・応用生物学部・講師
研究者番号: 40397039
- (3)連携研究者
該当なし
- (4)研究協力者
該当なし