

令和元年6月14日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09809

研究課題名(和文) エストロゲン応答遺伝子による女性がん増悪メカニズムの解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of cancer-promoting mechanism of estrogen-responsive genes and its application to molecular target in female cancers

研究代表者

佐藤 航 (Sato, Wataru)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：10772783

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)：女性ホルモンであるエストロゲンは女性のがんの発生・進展に関わっているが詳細な機構は明らかではない。本研究において、エストロゲン応答遺伝子Efpは細胞内の炎症応答シグナルを活性化することで、ホルモン非依存性かつ治療薬抵抗性を有する子宮体がん細胞の増殖、移動能を促進することを示した。また、もう1つのエストロゲン応答遺伝子EBAG9は、がん細胞からエクソソームと呼ばれる小顆粒(細胞外小胞)として分泌され、近傍のがん細胞に取り込まれてがんを促進する一方で、免疫細胞(T細胞)にも取り込まれ、細胞障害活性を抑制し、腫瘍免疫チェックポイントとして機能することを解明した。これらは新規治療標的として期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんにおいて治療抵抗性の獲得は臨床上大きな問題であるが、抵抗性獲得のメカニズムは未だ解明されておらず、効果的な対処法に乏しい。本研究は、子宮体がんをはじめとする女性のがんにおいて、エストロゲン応答遺伝子の機能解明からこの問題の解決策を探る特色がある。Efpが制御する新しい細胞内シグナル経路の同定、ならびにEBAG9がエクソソームを介して腫瘍免疫に作用することを明らかにしている知見等は、学術的に新しく、内分泌学とその関連領域の発展に資すると考えられる。免疫チェックポイント機構を標的としたがん治療薬は、最近最も注目されている分野の1つであり社会的な意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Estrogen, a female hormone, is involved in development and progression of cancer in women; however, the precise mechanism is still unknown. In this study, we revealed that the estrogen-responsive gene Efp promotes growth and migration of hormone-independent and therapeutic drug-resistant endometrial cancer cells through activating intracellular inflammation signal. In addition, the other estrogen-responsive gene EBAG9 is shown to be secreted from cancer cells as exosomes (small extracellular vesicles). The exosome-mediated EBAG9 transfer stimulated migration of cancer cells while inhibited cytotoxicity of immune T-cells, indicating a role in immune checkpoint regulation. These findings may provide novel molecular targets for cancer therapy.

研究分野：腫瘍

キーワード：ステロイドホルモン 遺伝子発現 がん 腫瘍免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

性ホルモンであるエストロゲンは女性の生殖系臓器に発生するがん、特に、乳がんと子宮体がんに関与している。国立がん研究センターのがん統計によると、乳がん、子宮体がんはともにその罹患率が近年増加しており、年間死亡数(2013年)は乳がん 13,000人、子宮体がん 6,000人を超えている。乳がん細胞や子宮体がん細胞の多くはエストロゲン受容体(ER)を発現しており、エストロゲン依存性の増殖を示すことが知られている。現在、乳がんの内分泌療法として ER に対する阻害剤(タモキシフェンなど)やエストロゲン産生をブロックするためのアロマターゼ阻害剤などが臨床応用されており、効果を発揮している。しかしながらこれらの薬剤の長期投与によって耐性を獲得するがんが生じることが問題となっており、このような耐性がんに対しては有効な治療方法に乏しい。また、内分泌療法に対して耐性を獲得した後も ER が陽性のままであることが多く、耐性獲得と内分泌系の制御に関してその分子動態の多くは不明である。子宮体がんでは、内分泌療法としてプロゲステロン療法が行われるものの、生存率の改善効果が乏しいことから、内分泌療法の使用は限定的である。これらの状況を克服するには、乳がんと子宮体がんにおけるエストロゲン応答性の特異性、内分泌療法に対する反応性、ならびにエストロゲン依存性から非依存性の増殖機構を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

我々は性ホルモン依存性がんにおける病態解明を目指し、独自にエストロゲン応答遺伝子やマイクロ RNA (miRNA)などの非コード RNA の同定ならびにその機能解析を行ってきた。エストロゲン応答遺伝子として同定した Efp は、細胞周期のブレーキ役である 14-3-3 $\sigma$  の分解を促進するユビキチンリガーゼであることを解明し、がん耐性獲得の新しいメカニズムとなることを示した(Urano et al., *Nature* 417, 871, 2002)。特に、Efp に特異的な siRNA (siEfp)によって、乳がん細胞の増殖が抑制されることを培養細胞系ならびにヌードマウスを用いた腫瘍移植モデルによって明らかにした(*Cancer Gene Ther* 17, 624, 2010)。その他のエストロゲン応答遺伝子として EBAG9 などを同定している。EBAG9 は乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膀胱がんなど様々ながん種において過剰発現し、予後不良因子として作用することが当研究グループを含め国内外の他のグループからも報告されている。我々は EBAG9 に特異的な siRNA が、がん細胞の移動能を抑制することを培養細胞系およびヌードマウスを用いた腫瘍移植モデルによって明らかにし、がん治療への応用を提唱した。一方、Ebag9 ノックアウトマウスを宿主とした場合、皮下移植した膀胱がん細胞の局所での腫瘍形成ならびに肺への転移が顕著に抑制されることを見出し、腫瘍免疫を制御する重要な役割を有することを解明した(*Oncogenesis* 3, e126, 2014)。本研究では、Efp、EBAG9 などのエストロゲン応答遺伝子の発現制御、機能などを明らかにすることにより、内分泌療法に対する耐性機構においてどのような役割を担っているかを解明し、乳がん、子宮体がんの新しい分子標的の同定と診断・治療法への応用を目指した。

### 3. 研究の方法

Efp に関する解析において、ヒト子宮体がん細胞として、エストロゲン受容体 ER $\alpha$  を発現しホルモン依存性である Ishikawa 細胞と、ER $\alpha$  を発現せずホルモン非依存性である HEC-1A 細胞を用い、Efp に対する siRNA (siEfp)またはコントロールの siRNA (siControl)をトランスフェクションにより導入した。これらの細胞を用いて、WST-8 試薬を用いた細胞増殖試験、トランスフェクションを用いた細胞移動能の評価、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析等を行った。遺伝子発現は定量的 PCR、マイクロアレイ解析による RNA レベルの解析ならびに抗体を用いたウェスタンブロットによるタンパク質レベルでの解析を行った。免疫不全マウスを用いた腫瘍移植実験においては、がん細胞をマトリゲルとともにこれらマウスの皮下もしくは子宮に移植し、腫瘍細胞が定着した後、トランスフェクション試薬を用いて調整した siEfp もしくは siControl を腫瘍に直接(皮下移植モデル)あるいは尾静脈(同所性移植モデル)より投与し、腫瘍形成を継続的に測定した。

EBAG9 の解析においては、マウス自然発症前立腺がんモデルである transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP)マウスと Ebag9 ノックアウトマウス(Ebag9KO)を交配し、腫瘍形成と遺伝子発現における影響を評価した。エクソソームはがん細胞の培養上清から超遠心により精製した。T 細胞の障害活性は、T 細胞とがん細胞を共培養した際の培養上清にける乳酸デヒドロゲナーゼを定量することにより測定した。

### 4. 研究成果

子宮体がん細胞における Efp の機能を明らかにするため、Efp に対する siRNA (siEfp)を ER $\alpha$  陽性(エストロゲン依存性)の子宮体がん細胞である Ishikawa 細胞および ER $\alpha$  陰性(エストロゲン非依存性)の子宮体がん細胞である HEC-1A 細胞に導入し、Efp 発現量低下の影響を解析したところ、これら両方の細胞において 14-3-3 $\sigma$  タンパク質の発現レベルが増加することが明らかになった。また、siEfp はこれら両方の細胞において細胞増殖を抑制することが示され、細胞周期 S 期に存在する細胞の割合を減少させることが示された。その際、ER $\alpha$  陽性である Ishikawa 細胞における siEfp の増殖抑制効果は、ER $\alpha$  を標的とした siRNA による増殖抑制効果よりも大きいことから、エストロゲン以外の経路によって制御される割合が大きいことが示唆

された。さらに、Efp は細胞遊走能を促進する働きを有することが示された。次に、免疫不全マウスを用いた腫瘍移植モデルにより、siEfp の腫瘍増殖抑制効果を検討した。その結果、Ishikawa 細胞による皮下移植モデルならびに HEC-1A 細胞による子宮への同所性異種移植モデルの両方において、siEfp

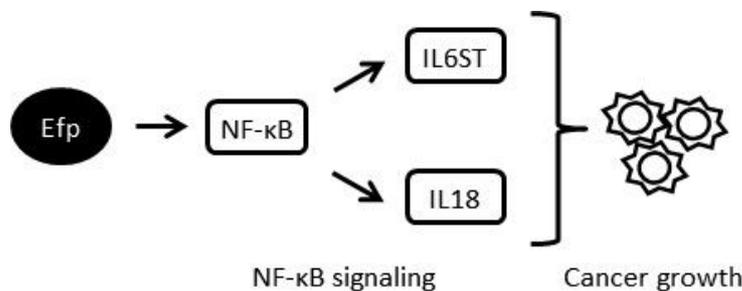


図1 子宮体がんにおけるEfpの作用機構のモデル

は腫瘍形成を抑制することが確かめられた。siEfp を投与した腫瘍において Efp タンパク質の発現は抑制され、逆に 14-3-3σ タンパク質の発現は亢進しており、siEfp が Efp 発現を特異的に抑制することにより腫瘍抑制効果を発揮したことが示唆された。Efp はウイルスに対する自然免疫において、NF-κB 経路の制御に関与することが知られてるため、子宮体がんにおいても重要な役割を担っているのではないかと仮説を立てて検証を行なった。Ishikawa 細胞と HEC-1A 細胞において NF-κB 応答配列を有するルシフェラーゼレポータープラスミドを導入して解析したところ、Efp は NF-κB の転写活性を増加させることが示された。さらに、マイクロアレイ解析によって、Efp は NF-κB の標的遺伝子である IL6ST、IL18 などの発現制御に関与することが明らかになった(図1)。これらの結果より、Efp はホルモン依存性ならびに非依存性の子宮体がんにおいて重要な機能を担っており、診断・治療において標的分子となり得ることが示唆された。

EBAG9 に関しては、前立腺がんを自然発症するトランスジェニックマウスである transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP)マウスと EBAG9 ノックアウトマウス(Ebag9KO)を交配した実験により、EBAG9 は前立腺がん発症に対して抑制的に働いていることが示され、この際、形成された腫瘍内への CD8 陽性 T 細胞の浸潤が抑制していることが示唆された。一方で、前立腺がん細胞においては、EBAG9 は上皮間葉移行(EMT)関連遺伝子の発現を増加させ、細胞移動能を亢進させることが明らかになった。これらの細胞移動能と EMT 関連遺伝子の発現制御に関わるメカニズムとして、EBAG9 が 9 回膜貫通型タンパク質である TM9SF1 と結合することが重要であることが示された。興味深いことに、EBAG9 タンパク質はエクソソームに含まれて細胞外に分泌されることが判明し、autocrine もしくは paracrine の機構でがん細胞間の情報伝達に関与していることが示唆された。さらに、EBAG9 を発現するがん細胞由来のエクソソームは、T 細胞の細胞障害性を抑制する効果が確認されたことから、EBAG9 は腫瘍免疫に関わる新しいチェックポイント分子として機能することが示唆された(図2)。これらのことより、EBAG9 はがん治療における新しい治療標的として有用であると考えられた。

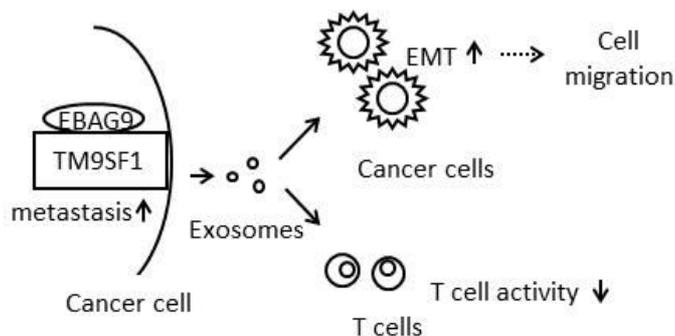


図2 エクソソームを介するEBAG9の腫瘍と腫瘍免疫における作用機構のモデル

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Sato W, Ikeda K, Urano T, Abe Y, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Efp promotes in vitro and in vivo growth of endometrial cancer cells along with the activation of nuclear factor-κB signaling. *PLOS ONE* 13, e0208351, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0208351. 査読有

Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Inoue S. Extracellular vesicle-mediated EBAG9 transfer from cancer cells to tumor microenvironment promotes immune escape and tumor progression. *Oncogenesis* 7, 7, 2018. doi:10.1038/s41389-017-0022-6. 査読有

Takayama K, Suzuki T, Tanaka T, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ikeda K, Inoue S. Trim25 enhances cell growth and cell survival by modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer. *Oncogene* 37, 2165-2180, 2018. doi:10.1038/s41388-017-0095-x. 査読有

Okumura T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Proteasome 26s subunit PSMD1 regulates breast cancer cell growth through p53 protein degradation. *J Biochem* 163, 19-29, 2018. doi:10.1093/jb/mvx053. 査読有

Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Estrogen signaling increases nuclear receptor

subfamily 4 group A member 1 expression and energy production in skeletal muscle cells. *Endocrine Journal* 65, 1209-1218, 2018. doi:10.1507/endocrj.EJ17-0548. 査読有  
Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S. Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein3 downregulation in skeletal muscle of females mice. *Biochem Biophys Res Commun* 480, 758-764, 2016. doi:10.1016/j.bbrc. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

池田和博、佐藤航、堀江公仁子、井上聡. エクソソームを介する EBAG9 の伝達は免疫細胞の細胞傷害性を抑制し前立腺がん細胞の免疫系からの回避を引き起こす. 第 19 回ホルモンと癌研究会 (2018 年)

東浩太郎、柴祥子、池田和博、佐藤航、堀江公仁子、田中伸哉、井上聡. エストロゲン応答遺伝子 Ebag9 欠損マウスにおける骨量減少. 第 4 回日本骨免疫学会 (2018 年)

東浩太郎、柴祥子、池田和博、佐藤航、堀江公仁子、田中伸哉、井上聡. エストロゲン応答遺伝子 Ebag9 ノックアウトマウスにおける骨表現型の解析. 第 18 回東京骨関節フォーラム (2018 年)

Okumura T, Ikeda K, Sato W, Okamoto K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Proteasome subunit PSMD1 participates in p53 degradation and regulates proliferation of breast cancer cells. AACR Annual Meeting (2017 年、国際学会)

Ikeda K, Mitobe Y, Horie K, Inoue S. Identification of hormone-dependent lncRNAs that mediate estrogen signaling pathway in breast cancer. The 43<sup>rd</sup> Naito Conference, Noncoding RNA : Biology, Chemistry, & Diseases (2017 年、国際学会)

長澤さや、池田和博、堀江公仁子、長谷川幸清、竹田省、井上聡. RNA シーケンスによって明らかにされた卵巣がん臨床検体のサブタイプ特異的遺伝子プロファイル. 第 18 回ホルモンと癌研究会 (2017 年)

Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Inoue S. エクソソームを介する EBAG9 によるがんの免疫逃避. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年)

水戸部悠一、堀江公仁子、池田和博、高木清司、鈴木貴、井上聡. 乳がん増殖と生存に関わるエストロゲン応答性長鎖非コード RNA の役割. 第 25 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (2017 年)

堀江公仁子、水戸部悠一、池田和博、井上聡. RNA 生理学の学際的アプローチ-非コード RNA の全貌を明らかにする新たな試み: Long noncoding RNAs that associate with estrogen receptor signaling and contribute to the pathophysiology of endocrine therapy-resistant breast cancer. (エストロゲン受容体シグナルに関連し治療抵抗性乳がんの病態に関わる長鎖非コード RNA). 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年)

池田和博、堀江公仁子、井上聡. 技術革新がもたらすがん治療難治性の克服に向けた新しいアプローチ: Regulatory mechanisms of mitochondrial respiratory supercomplex and metabolism in hormone-dependent cancers. (ホルモン依存性がんにおけるミトコンドリア呼吸鎖超複合体と代謝の制御メカニズム). 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年)

Ikeda K, Horie-Inoue K. Systemic identification of molecular targets involved in acquired resistance to endocrine therapy for hormone-dependent cancers based on functional screening and high-throughput sequencing. The 41<sup>st</sup> Naito Conference on "Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance" (2016 年)

井上聡、柴祥子、池田和博、宮崎利明、東浩太郎、田中伸哉、堀江公仁子. エクソソームを介してがんの免疫エスケープを引き起こす EBAG9 の新しい作用メカニズムと骨における役割. 第 2 回日本骨免疫学会 (2016 年)

〔図書〕(計 1 件)

池田和博、井上聡. 東京化学同人出版社. 田村隆明・浦聖恵 (編) 遺伝子発現制御機構 クロマチン、転写制御、エピジェネティクス. (発行年 2017 年、総ページ数 264)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：池田 和博

ローマ字氏名：(IKEDA, kazuhiro)

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 30343461

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。