

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03923

研究課題名(和文)細胞質ポリアデニル化複合体に着目した上皮悪性腫瘍抑制分子の研究

研究課題名(英文) Investigation of inhibitor molecules focusing on cytoplasmic polyadenylation complex in epithelial malignant tumor

研究代表者

永岡 謙太郎 (NAGAOKA, KENTARO)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60376564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質ポリアデニル化とは、細胞質内でmRNAのポリA鎖を伸縮させる現象であり、マスター遺伝子としてCPEB1が知られている。ヒトと犬猫の臨床サンプルを用いた解析により、乳癌組織では正常組織に比較してCPEB1遺伝子発現が低下していることを確認し、CPEB1の乳癌抑制遺伝子として可能性を示した。また、臨床分野で重要な情報となる乳癌のサブタイプ毎にポリA鎖の長さに応じた遺伝子のプロファイリングを実施した。さらに、*in vitro*アッセイ系により、CPEB1発現を増加させる低分子化合物29種を同定し、新規乳癌抑制・治療につながるシードを見つけることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は日本人の「国民病」と称され、現代の高齢化社会と相まって癌に罹患する可能性は2人に1人と推測される。癌の種類は発生する部位や由来する細胞により様々であるため、癌の治療や予後予測には、それぞれの癌の浸潤・転移の能力を把握することが重要とされ、現在、国を挙げた包括的かつ効率的な対策が進められている。本研究において、低分子化合物ライブラリースクリーニングにより、乳癌に対する新規治療薬のシードを見つけた意義は学術的にも社会的にも大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic polyadenylation is a phenomenon that stretches and contracts the poly-A tail of mRNA in the cytoplasm, and CPEB1 is known to be the master gene. Analysis of human and cat clinical samples confirmed that CPEB1 gene expression was down-regulated in breast cancer tissues compared to normal tissues, demonstrating the potential of CPEB1 as a breast cancer suppressor gene. We also performed gene profiling according to the length of the poly-A tail in each subtype of breast cancer. Furthermore, the *in vitro* assay system identified 29 small molecule compounds that increased CPEB1 expression, which are potential seeds that could lead to novel breast cancer suppression and treatment drugs.

研究分野：獣医学 生理学

キーワード：乳癌 転写後調節 低分子化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌は日本人の「国民病」と称され、現代の高齢化社会と相まって癌に罹患する可能性は2人に1人と推測される。癌の種類は発生する部位や由来する細胞により様々であるため、癌の治療や予後予測には、それぞれの癌の浸潤・転移の能力を把握することが重要とされ、現在、国を挙げた包括的かつ効率的な対策が進められている。一方で、高齢化に伴う医療費の高騰が我が国の社会保障制度を圧迫していることから、癌対策においても治療から予防へのパラダイムシフトを考慮する必要がある。獣医領域においても動物の高齢化とともに癌患者が急速に増えており、癌対策が緊急の課題である。保険制度が未熟であることに加え、飼い主に対する治療費には確固たる限界が存在するため、新しい治療法の開発とともに癌予防へのニーズが大きい。

細胞質ポリアデニル化とは、細胞質内で mRNA のポリ A 鎖を伸縮させる現象であり、制御因子として CPEB1、ポリ A 鎖合成酵素として Gld2、ポリ A 鎖分解酵素として PARN が知られている。長いポリ A 鎖を持つ mRNA は安定的となりタンパクへの翻訳効率が高まることから、転写活性プロセスを経ずにタンパク量の調節が可能となる。我々は、健康な乳腺組織は CPEB1 発現が高く、細胞質ポリアデニル化複合体を正常に機能しているが、細胞老化などによる CPEB1 発現の低下が複合体機能に障害を与え、細胞極性や癌関連遺伝子の発現調節に異常が生じると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は上記仮説を立証すべく、1) 正常乳腺細胞と乳癌細胞における複合体機能の相違点、2) CPEB1 (および PARN) 発現制御メカニズム、3) CPEB1 遺伝子を制御する定分子化合物の探索といった検討を行い、得られる結果を有機的に組み合わせることで、細胞質ポリアデニル化複合体を標的とした新規乳癌(上皮悪性腫瘍)予防且つ治療薬シードの開発を目的とした。

3. 研究の方法

3年間に上記3項目について、以下の解析を実施した。

1) 正常乳腺細胞と乳癌細胞における複合体機能の相違点

臨床現場において乳癌細胞のサブタイプは治療方針の決定に重要である。各サブタイプのモデル細胞株として MCF7 (ルミナル A タイプ)、BTB474 (ルミナル B タイプ)、MDA-MB-453 (HER2 陽性タイプ)、MDA-MB-231 (トリプルネガティブタイプ)、および MCF10A (正常乳腺上皮細胞) を用いて、細胞質ポリアデニル化複合体の発現状況を確認した。

細胞質ポリアデニル化複合体が制御する癌関連因子を同定するため、各サブタイプの細胞株より mRNA を抽出し、複合体機能の指標となるポリ A 鎖の長さで mRNA の分画を行い、マイクロアレイ解析により各サブタイプに特徴的な mRNA を同定した。

2) CPEB1 (および PARN) 発現制御メカニズム

CPEB1 発現は老化との関連性が示唆されていることから、各性別の年齢の異なるマウスより様々な組織(卵巣と乳腺の場合、各性周期、妊娠期、泌乳期)を採取し、CPEB1 と PARN 発現をリアルタイム PCR にて解析する。mRNA レベルで発現が確認されたサンプルは、ウエスタンブロットによるタンパク解析に供する。ヒト臨床サンプルは、共同研究協定を結んだ東京医科大学・茨城医療センターにて乳癌患者の手術により摘出された乳癌を含む乳腺検体から、病理診断医により速やかに病変(癌)部と正常部各々の検体を採取した。また、パラフィンブロックを作製し、免疫染色法により ER、PrR および HER2 発現を確認しサブタイプ分類を行う。イヌやネコの臨床サンプルは、東京農工大学・動物医療センターにて乳腺腫瘍患者より摘出された乳腺腫瘍検体を採取する。得られた臨床サンプルもマウスサンプルと同様に発現解析に供した。

3) CPEB1 遺伝子を制御する低分子化合物の探索

CPEB1 発現を制御する遺伝子や低分子化合物の探索を行う。CPEB1 タンパクコード領域にルシフェラーゼタンパク遺伝子をノックインした正常乳腺と乳癌細胞株を作製した。この細胞株を用いて東京大学創薬機構より分与された約 1950 種の低分子化合物スクリーニングを実施し、CPEB1 遺伝子の発現を変化させる低分子化合物の探索を行った。また、常法に従った上流域解析も同時並行で行い、どの領域が転写活性に関与するかを調べた。

4. 研究成果

「正常乳腺細胞と乳癌細胞における複合体機能の相違点」については、各サブタイプの乳癌細胞株におけるポリアデニル化複合体構成遺伝子である CPEB1、PARN 及び Gld2 の発現プロファイルを完了した。さらに各サブタイプの乳癌細胞株より total RNA の抽出を行い、ポリ A 鎖の長さに応じた mRNA の分画を実施後、ヒト ClariomS マイクロアレイに供した。その結果、乳癌のサブタイプに応じた短鎖ポリ A mRNA、及び長鎖ポリ A mRNA の分類が可能となった。得られたポリ A 鎖の長さに応じた mRNA の発現情報は、今後の各サブタイプの乳癌治療のターゲット遺伝子の探索に重要な情報になり得る。

「CPEB1 発現制御メカニズム」については、ヒト臨床サンプル 24 検体(それぞれ正常部と癌部

を別々に採取)を用い、CPEB1 と PARN 遺伝子の発現解析を行った結果、正常部では CPEB1 発現が高く、癌部では PARN 発現が高いことを mRNA レベルで明らかにした。また、免疫蛍光染色によって CPEB1 タンパク局在の確認も行った。ヒト 乳癌細胞に対する性ホルモンの作用を調べた結果、CPEB1 発現はエストロゲンにより抑制されプロゲステロンにより刺激される結果が得られた。In vitro における試験において、エストロゲンによる CPEB1 発現低下は乳癌細胞増殖促進に關与することを明らかにした。さらに、犬および、猫の乳腺腫瘍サンプルにおいても、ヒトサンプルと同様に腫瘍サンプルで CPEB1 発現が低下していることが確認できた。以上の結果は、これは、乳癌治療における CPEB1 発現制御の重要性を改めて示す結果である。

「CPEB1 遺伝子を制御する低分子化合物の探索」については、CPEB1 プロモーター(上流 2 kb) 制御 NanoLuc 発現乳癌細胞を作成し、東京大学創薬機構より分与された既知薬理活性試薬 1950 化合物についてルシフェラーゼ活性の変化を調べた。その結果、CPEB1 プロモーター活性を 2 倍以上増加させる化合物 36 種類、半分以下に低下させる化合物 60 種類を同定した。さらに 2 次スクリーニングとして、変化の見られた化合物について内因性 CPEB1 発現の変化をリアルタイム PCR で確認した結果、活性を増加させた化合物 36 種のうち 29 種類について RNA レベルでの発現増加が確認された。現在、これらの化合物について、乳癌細胞増殖に与える影響について検討を行っている。以上の結果から、乳癌抑制遺伝子 CPEB1 の遺伝子発現を潜在的に増加させる化合物が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saab S, Chang OS, Nagaoka K, Hung MC, Yamaguchi H	4. 巻 9
2. 論文標題 The Potential Role of YAP in Axl-mediated Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2719-2729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Ohno H, Takahashi K, Yanuma N, Ogawa M, Hasegawa A, Sugita K, Kawano K, Sasaki K, Shirai J, Nagaoka K, Ohmori K.	4. 巻 81
2. 論文標題 Effects of a Selective Casein Kinase 1 and Inhibitor on Fc RI Expression and IgE-mediated Immediate-Type Cutaneous Reactions in Dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1680-1684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0756	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yin N, Zhang H, Ye R, Dong M, Lin J, Zhou H, Huang Y, Chen L, Jiang X, Nagaoka K, Zhang C, Jin W	4. 巻 20
2. 論文標題 Fluvastatin Sodium Ameliorates Obesity through Brown Fat Activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E1622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms20071622.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Kanekura K, Harada Y, Fujimoto M, Yagi T, Hayamizu Y, Nagaoka K, Kuroda M	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of membrane penetration and cytotoxicity of C9orf72-encoding arginine-rich dipeptides.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 12740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-018-31096-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Haolin, Hiratani Moe, Nagaoka Kentaro, Kawano Ryuji	4. 巻 9
2. 論文標題 MicroRNA detection at femtomolar concentrations with isothermal amplification and a biological nanopore	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 16124 ~ 16127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7NR04215A	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Zhang H, Liu Y, Weng J, Usuda K, Fujii K, Watanabe G, Nagaoka K	4. 巻 63
2. 論文標題 Decrease of lactogenic hormones induce epithelial-mesenchymal transition via TGF β 1 and arachidonic acid during mammary gland involution	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 325-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2016-157	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石井由里子、Sovijit Warcharee、金蔵孝介、渡辺元、永岡謙太郎
2. 発表標題 細胞質ポリアデニル化複合体発現調節を介した乳がん抑制因子の探索
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sovijit W, Nagaoka K, Watanabe G
2. 発表標題 Studies on posttranscriptional gene regulation in cancer progress
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学獣医生理学研究室
http://web.tuat.ac.jp/~nvetphys/
東京農工大学獣医生理学研究室
http://web.tuat.ac.jp/~nvetphys/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 知之 (FUJITA TOMOYUKI) (00419392)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	
研究分担者	金蔵 孝介 (KANEKURA KOUSUKE) (10508568)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	伊藤 昌彦 (ITO MASAHIKO) (50385423)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	