

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10571

研究課題名(和文) 乳癌悪性化を担うTRIMファミリー蛋白質の作用メカニズムと臨床応用

研究課題名(英文) Investigation on the breast cancer-promoting effects of TRIM family proteins and its clinical application

研究代表者

東 浩太郎 (Azuma, Kotaro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30401110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌患者の手術検体の免疫染色により、TRIM25、TRIM44、TRIM47という3種類のTRIMファミリー蛋白質が予後悪化因子であることを示した。このうち、TRIM44およびTRIM47においては、メカニズムとしてNF-kappaBシグナルの亢進を示し、TRIM47に関してはさらに2種類の蛋白質との相互作用を介するメカニズムを見出した。また、動物モデルによりTRIM47発現抑制の治療応用への可能性を示唆する結果を得た。TRIM25に関しては、自然免疫の分野で相互作用が指摘されている分子が乳癌の悪性化にも関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、複数の乳癌の予後不良因子を蛋白質レベルで同定した点に学術的な意義を有する。遺伝子の増幅やメッセンジャーRNAレベルで示した報告に比べて、実際に機能している分子である蛋白質レベルにおける証明はより説得力を有している。さらに、TRIM47の機能解析において、新たな分子との相互作用を介したメカニズムを示した点においても学術的な新規性を有する。本研究で同定した予後不良因子や関連蛋白質の知見を活用することにより、有効なオーダーメイド医療を行う道が開け、現在の日本の乳癌の罹患率の高さや死亡数の増加傾向を鑑みると、社会的な意義も有しているといえる。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical analysis of clinical samples from breast cancer patients revealed that three kinds of TRIM family proteins, namely TRIM25, TRIM44, and TRIM47, are poor prognostic factors. It is suggested that enhanced NF-kappaB signaling is the underlying mechanism for TRIM44 and TRIM47. In addition, interaction of TRIM47 and certain proteins could cause the enhanced NF-kappaB signaling. Further, xenograft mice model suggested suppression of TRIM47 expression could have a therapeutic value. On the other hand, immunohistochemical analysis suggested that a TRIM25-interacting molecule in the context of innate immunity also has pathological role in the progression of breast cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん ホルモン療法耐性 治療抵抗性 TRIM25 TRIM44 TRIM47 TRIM39 NF-kappaBシグナル

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始するまでに、私は Estrogen 受容体 (ER) のシグナルに着目し、ER 陽性の乳癌における新規のメカニズムを明らかにして来た。ER が細胞質において tubulin および histone deacetylase 6 (HDAC6) と複合体を形成し、微少管の脱アセチル化を介して乳癌細胞の運動能や造腫瘍能の亢進にかかわる新規の核外作用を解明した (文献 1, 2)。一方で、分担研究者の井上らはエストロゲン応答遺伝子として Efp/TRIM25 を同定し、それが細胞周期の抑制作用を有する 14-3-3 σ 蛋白質の分解に関わるユビキチンリガーゼであり、乳癌の増殖を促進し、NF- κ B シグナルともかかわることを解明した (文献 3, 4)。また、ER 陽性の乳癌細胞株 MCF-7 細胞をヌードマウスの皮下に接種した乳癌腫瘍モデルにおいて、Efp/TRIM25 の siRNA の注射により腫瘍増殖の抑制効果を認め、Efp/TRIM25 が治療標的になり得ることを示した (文献 5)。

井上らが解析を行ってきた Efp/TRIM25 は TRIM (Tripartite Motif) ファミリー蛋白質の一種であり、他の TRIM ファミリー蛋白質同様 Ring finger ドメイン、B-box ドメイン、coiled-coil ドメインを共通して有している。TRIM ファミリー蛋白質は Ring finger ドメインの働きによりユビキチンリガーゼとして、蛋白質分解に関わることが推測されている。70 種類以上の蛋白質が TRIM ファミリーに分類されており、発生や神経変性、自然免疫、悪性腫瘍など多彩な生命現象にかかわることが報告されていた。

本研究では、Efp/TRIM25 と同様のドメイン構造を持ち、同一染色体上でクラスターを形成する TRIM47 にも着目した。TRIM47 蛋白質の発現は前立腺癌において予後の悪さと相関していることを分担研究者らは報告しており (文献 6)、ONCOMINE データベースによると非浸潤性乳癌に比べ、浸潤性の乳癌においてより多くの mRNA の発現が認められていた。さらに類縁分子として、乳癌における働きが研究開始の時点で報告されていなかった TRIM44 にも着目した。

2. 研究の目的

乳癌は、日本人女性における部位別の癌罹患率の第 1 位を占め、その罹患率は他の癌と比べて顕著に増加している。平成 25 年の統計によると、日本において年間 7 万人以上が乳癌と診断されており、約 1 万 3000 人が乳癌のために死亡している。乳癌は、エストロゲン受容体の発現の有無、HER2 蛋白質の有無により異なる治療戦略がとられる。エストロゲン受容体 (ER) 陽性の乳癌の治療に際しては、再発や転移した場合には、選択的エストロゲン受容体作動薬やアロマターゼ阻害薬による内分泌療法が用いられることが多い。しかし、最終的にはほとんどの症例で内分泌療法は効かなくなり、抗がん剤治療に移行する。また、ER、プロゲステロン受容体、HER2 蛋白質が陰性のトリプルネガティブ乳癌は、予後が悪いことが知られ、ER や HER2 を標的とした治療を行えないために、抗がん剤治療が行われる。内分泌療法耐性となった乳癌およびトリプルネガティブ乳癌に対するより効果的な治療法の探索は、本邦における高い乳癌罹患率および死亡者数の増加を鑑みると意義深いことであると言える。本研究においては、このような乳癌に対する新たな治療標的の探索および検討を目的とした。

具体的には、我々が着目している TRIM ファミリー蛋白質のいくつかは、乳癌の予後推定のバイオマーカーとなりうるかについて、臨床サンプルを用いた検証を行うことを目的とした。さらに、免疫不全マウスの皮下移植モデルを用いた、TRIM ファミリー蛋白質の治療標的としての有用性の評価、遺伝子改変動物および乳癌細胞株を用いた、TRIM ファミリー蛋白質の乳癌細胞の生理的、病理的な役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

臨床検体は、倫理委員会の承認を得て、虎の門病院等における乳癌患者の手術検体を用いた。標本の免疫組織学的染色には、ウエスタンブロッティングで特異性の確認された抗体を用い、DAB 染色にて目的とする蛋白質の発現を評価した。分子メカニズムの解析は、エストロゲン受容体陽性乳癌のモデルとして乳癌細胞株 MCF-7 細胞を用い、内分泌療法耐性モデルとして MCF-7 細胞を 4OH-tamoxifen 存在下で培養したタモキシフェン耐性株、トリプルネガティブ乳癌のモデルとして MDA-MB-231 細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) TRIM47 の乳癌細胞における臨床的意義および機能の解明

平成 29 年度には、本研究で着目している TRIM ファミリー蛋白質である TRIM47 の発現が予後予測のバイオマーカーとなるかどうかを手術検体の免疫組織学的染色により検討し、TRIM47 の高発現が予後不良因子であることを見出した。エストロゲン受容体陽性乳癌細胞株 MCF-7 および MCF-7 より樹立したタモキシフェン耐性株を用いた機能解析において、TRIM47 の発現を

抑制すると細胞増殖が抑制されることを示した。また、TRIM47 の発現抑制により、NF- κ B シグナルが抑制されていることを示した。平成 30 年度は、TRIM47 の作用メカニズムを解明するために、結合蛋白精製等を行い、複数の結合タンパク質を同定した。そのうち、結合タンパクとして同定した Factor X (論文未発表のため名前は伏せさせていただきます)が、TRIM47 の存在下で安定化し、NF- κ B シグナルを活性化することを示すことができた。さらに、Factor X を修飾する Factor Y も TRIM47 結合蛋白質であり、TRIM47 が Factor X および Y と複合体を形成することにより乳癌の悪性化に関わるメカニズムを解明した。さらに、xenograft 動物モデルにおいて、TRIM47 の siRNA の投与により腫瘍の増大が抑制され、治療標的としての意義も示された。

(2) TRIM44 の乳癌細胞における臨床的意義および機能の解明

臨床サンプルの免疫組織学的染色により、エストロゲン受容体陽性および陰性乳癌双方の予後不良因子であることを見出していた TRIM44 に対し、そのメカニズムの解析を行い、TRIM44 の発現抑制により、エストロゲン受容体陽性乳癌細胞株 MCF-7 およびエストロゲン受容体陰性乳癌細胞株 MDA-MB-231 の増殖が抑制されることを示した。また、TRIM44 の発現抑制により、MDA-MB-231 の細胞運動能が低下することも見出した。さらに、そのメカニズムとして NF- κ B シグナルの活性化、CDK19 遺伝子の抑制、MMP1 遺伝子の誘導を示した。本研究成果を、2017 年に International Journal of Molecular Science 誌に発表した (文献 7)。

また、TRIM44 が腎臓がんの悪性化に関与することを示した東大泌尿器科との共同研究にも参加し、co-author として 2020 年に Cancer Science 誌に結果を発表した (文献 8)。

(3) TRIM25 のエストロゲン受容体陽性乳癌における新たな作用メカニズムの解析

TRIM25 は、エストロゲン受容体陽性乳癌の予後悪化因子であり、そのメカニズムとして、14-3-3 σ 蛋白質のユビキチン化による分解を既に私たちは示していたが、本研究においては、TRIM25 の他の結合因子である Factor Z (論文未発表のため名前は伏せさせていただきます)に着目した。Factor Z の抗体を用いた、乳癌臨床サンプルの免疫組織学的染色により、Factor Z の免疫反応性が高い症例は、予後が悪いことが示された。また、TRIM25 の免疫組織学的染色の結果を合わせて解析することにより、TRIM25 と Factor Z の発現が蛋白質レベルで相関することが見出され、さらに両者の蛋白質を合わせて解析することにより、より正確な予後推定が可能となった。

(引用文献)

1. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R. Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. *FEBS Lett.* 577(3):339-344, 2004
2. Azuma K, Urano T, Horie-Inoue K, Hayashi S, Sakai R, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res.* 69(7):2935-2940, 2009
3. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature.* 417(6891):871-875, 2002
4. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 446(7138):916-920, 2007
5. Ueyama K, Ikeda K, Sato W, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and in vivo tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 17(9):624-632, 2010
6. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y. Increased Expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 Is a Negative Prognostic Predictor in Human Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 14(4):298-303, 2016
7. Kawabata H, Azuma K, Ikeda K, Sugitani I, Kinowaki K, Fujii T, Osaki A, Saeki T, Horie-Inoue K, Inoue S. TRIM44 Is a Poor Prognostic Factor for Breast Cancer Patients as a Modulator of NF- κ B Signaling. *Int J Mol Sci.* 18(9):1931, 2017
8. Yamada Y, Kimura N, Takayama KI, Sato Y, Suzuki T, Azuma K, Fujimura T, Ikeda K, Kume H, Inoue S. TRIM44 promotes cell proliferation and migration by inhibiting FRK in renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 111(3):881-890, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Y, Kimura N, Takayama KI, Sato Y, Suzuki T, Azuma K, Fujimura T, Ikeda K, Kume H, Inoue S.	4. 巻 111
2. 論文標題 TRIM44 Promotes Cell Proliferation and Migration by Inhibiting FRK in Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 881-890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14295.	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 Kawabata Hidetaka, Azuma Kotaro, Ikeda Kazuhiro, Sugitani Ikuko, Kinowaki Keiichi, Fujii Takeshi, Osaki Akihiko, Saeki Toshiaki, Horie-Inoue Kuniko, Inoue Satoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 TRIM44 Is a Poor Prognostic Factor for Breast Cancer Patients as a Modulator of NF- B Signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1931 ~ 1931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms18091931	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤順一朗、東浩太郎、木脇圭一、小倉拓也、池田和博、藤井丈士、北川昌伸、川端英孝、井上聡
2. 発表標題 乳癌におけるRetinoic acid-inducible gene I (RIG-I)蛋白質の免疫組織化学的な発現解析
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東浩太郎、池田和博、鈴木貴、堀江公仁子、井上聡
2. 発表標題 乳がんにおける新規タモキシフェン耐性予測因子TRIM47のNF-kappaBシグナル活性化メカニズム
3. 学会等名 第20回ホルモンと癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogura T, Azuma K, Sato J, Kinowaki K, Ikeda K, Kawabata H, Inoue S.
2. 発表標題 TRIM39 is a poor prognostic factor for breast cancer patients and promotes proliferation and migration of breast cancer cells.
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川端英孝、東浩太郎、池田和博、杉谷郁子、木脇圭一、藤井丈士、大崎昭彦、佐伯俊昭、堀江公仁子、井上聡
2. 発表標題 乳癌の悪性化に関わるTRIM44の標的因子の探索と同定
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawabata Hidetaka, Azuma Kotaro, Ikeda Kazuhiro, Sugitani Ikuko, Kinowaki Keiichi, Fujii Takeshi, Osaki Akihiko, Saeki Toshiaki, Horie-Inoue Kuniko, Inoue Satoshi
2. 発表標題 TRIM44 is a possible poor prognostic factor for breast cancer patients and positively regulates NF-kB signaling pathway
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東浩太郎、井上聡
2. 発表標題 TRIM47の乳がんにおける新規予後マーカーとしての役割とそのメカニズム
3. 学会等名 TOBIRA第6回研究交流フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Azuma Kotaro, Ikeda Kazuhiro, Takashi Suzuki, Osaki Akihiko, Saeki Toshiaki, Horie Kuniko, Inoue Satoshi
2. 発表標題 Increased expression of TRIM 47 as a novel prognostic factor related to tamoxifen resistance of breast cancer patients
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kawabata Hidetaka, Azuma Kotaro, Ikeda Kazuhiro, Sugitani Ikuko, Kinowaki Keiichi, Fujii Takeshi, Osaki Akihiko, Saeki Toshiaki, Horie-Inoue Kuniko, Inoue Satoshi
2. 発表標題 Expression of TRIM44 in breast cancer is a novel prognostic factor affecting cellular growth and motility
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東浩太郎、池田和博、井上聡
2. 発表標題 乳がんに対するホルモン療法耐性予測因子TRIM47の作用メカニズム
3. 学会等名 首都大バイオコンファレンス 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Azuma Kotaro, Inoue Satoshi	4. 発行年 2017年
2. 出版社 InTech	5. 総ページ数 12
3. 書名 Vitamin K, SXR, and GGCX	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	井上 聡 (Inoue Satoshi) (40251251)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長 (82674)	