

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03748

研究課題名（和文）乳がんにおける内分泌療法耐性獲得メカニズムの解析

研究課題名（英文）Study of the mechanism underlying the acquired hormone therapy resistance in breast cancer

研究代表者

太田 智彦（Ohta, Tomohiko）

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60233136

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチンリガーゼFbxo22によるリジン脱メチル化酵素KDM4B制御が乳癌および子宮内膜癌の発癌と治療に果たす役割について解析した。その結果、AKTによるKDM4Bのリン酸化が、Fbxo22によるKDM4Bのユビキチン化を阻害し、KDM4Bを介したエストロゲンシグナルを助長した。キナーゼXがKDM4BのDNA 2本鎖損傷部位への集積に重要で、その阻害剤により、DNA修復が抑制され、相同組換え修復不全を有する細胞と合成致死が生じた。タモキシフェンによる子宮内膜の変化では野生型が増殖症にとどまるのに対し子宮内膜上皮特異的なFbxo22-cKOマウスでは全例に異形性増殖症ないし内膜癌の発症を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKTによるKDM4Bのリン酸化がKDM4Bを介したエストロゲンシグナルを助長することはLuminal/HER2乳がんが内分泌療法に抵抗を示す機序として臨床的に非常に重要である。キナーゼX阻害剤が、相同組換え修復不全を有するがんの治療薬として有望である可能性が示唆された。Fbxo22欠失により、タモキシフェン投与や、E2が低下する発情後期においてもエストロゲンシグナルが継続して子宮内膜上皮の増殖を誘導して発がんすることは、乳がんタモキシフェン治療における合併症としての子宮内膜発がん発症のメカニズム解明に向けたモデルとして重要である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of the regulation of lysin demethylase KDM4B by ubiquitin ligase Fbxo22 on the carcinogenesis and the treatment of breast and endometrial cancers and found the following issues. Phosphorylation of KDM4B by AKT protected KDM4B from Fbxo22-mediated ubiquitination and prolonged KDM4B-mediated estrogen signaling. Phosphorylation of KDM4B by kinase X was critical for the retention of KDM4B at DNA double-strand breaks, and the DNA repair failure caused by inhibitors of kinase X renders synthetic lethality for cells with homologous recombination deficiency. All the mice with endometrial epithelium-specific knockout of Fbxo22 exhibited atypical endometrial hyperplasia or endometrial cancer, whereas wild-type mice treated with tamoxifen only developed hyperplasia.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん 子宮内膜がん KDM4B Fbxo22 エストロゲン DNA修復

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景

エストロゲン受容体 (ER) 陽性の Luminal 乳がんは乳がん全体の約 7 割を占め、抗エストロゲン療法に対する感受性が高く、他のタイプに比較して予後のいいがんであるが、約 2 割程度、内分泌療法に抵抗性で再発を来す高リスク群が存在する。高リスク群には化学療法など、術後に追加の補助療法が必要となるが、現状では Ki-67 以外に有効なバイオマーカーはなく、高リスク群を的確に選択できず、必要な患者に追加の補助療法が行われないだけでなく、多くの患者が不必要な化学療法を受けている。この点を補うために遺伝子発現解析のアルゴリズムを利用した高リスク群予測マーカーが開発されているが、それらの有用性は日本では未だに確立しておらず、コストが高く、検査の所要時間が長いことから実臨床では問題点が多い。この問題を解決し、的確な内分泌療法感受性バイオマーカーを開発するとともに、非感受性群に特異的に効果のある創薬を開発することが求められているが、そのためには内分泌療法耐性の背景にある分子メカニズムを解明することが必要で、これがこの研究課題の学術的な「問い」である。研究代表者らは、内分泌療法感受性の新規メカニズムとともに、感受性マーカーとして Fbxo22 を同定した。Fbxo22 が陰性の Luminal 乳がんは内分泌療法抵抗性で予後が不良であった (*J Clin Invest.* 128:5603-5619, 2018)。

(2) 基礎メカニズムに関する背景

ユビキチンリガーゼ (E3) は細胞内で標的蛋白質をユビキチン化し、特異的に分解する酵素である。SCF は SKP1, CUL1, F-box 蛋白質, ROC1 の 4 つのサブユニットからなる細胞内蛋白質分解機構の主体をなす E3 複合体で、F-box が基質を規定するレセプターである。研究代表者らは転写調節因子であるリジン脱メチル化酵素 KDM4B が SCF^{Fbxo22} の基質であることを同定した。

ER 陽性乳がんが内分泌療法耐性を獲得する機序として、ER 経路と HER2/PI3K/AKT 経路のクロストークが古くより知られている。Luminal/HER2 乳がんが内分泌療法耐性を獲得しやすいこと、Luminal 乳がんにおいても PI3K/AKT 経路の活性化が内分泌療法耐性の獲得と密接に関連していることは、このクロストークメカニズムによると考えられている。そのもっとも重要な分子機構として AKT による ER のリン酸化によって、ER がリガンド非依存的に転写活性を持つことが提唱されてきた。しかし、ER の Ser167 残基 (ER S167) が AKT によってリン酸化されること、HER2/PI3K/AKT 経路の活性化によって ER の下流シグナルが亢進することは立証されているものの、実際に細胞内で Ser167 を非リン酸化残基に置換しての内分泌療法抵抗性の獲得の証明はこれまでに成功しておらず、ER のリン酸化は単に付随的に起こるもので AKT による他の因子のリン酸化が ER 下流シグナルを亢進させ、内分泌療法抵抗性の原因となる可能性がある。

2. 研究の目的

研究代表者らは、Fbxo22 がエストロゲンシグナルの停止に必須で、乳がんの内分泌療法感受性の制御に重要な役割を果たしていることを発見した (*J Clin Invest.* 128:5603-5619, 2018)。タモキシフェンに代表される選択的 ER モジュレーター (SERM) がアンタゴニスト作用を発揮するためには、ER に結合した転写活性化因子 (SRC) が解離し、抑制化因子 (N-CoR) に変換される必要があり、この解離・変換に ER の AF1 ドメインに結合した転写調節因子 KDM4B が Fbxo22 によりユビキチン化され、分解される必要があることを見出した。Fbxo22 陰性の高リスク乳がんでは SRC から NCoR への変換が起こらず、SERM はアゴニスト作用を発揮する。一方、アロマトラーゼ阻害剤 (AI) によりエストロゲンが枯渇した際に ER 作用が停止するのにも Fbxo22 による KDM4B の分解が必要で、Fbxo22 がないと SRC は結合し続け、シグナルも維持される。したがって、Fbxo22 陰性の Luminal 乳がんは内分泌治療抵抗性で予後不良である。さらに、AKT による KDM4B のリン酸化が KDM4B を Fbxo22 によるユビキチン化から防御し、SERM 投与、あるいはエストロゲン枯渇状況においても KDM4B のユビキチン化が起こらないことが判明した。このことから Fbxo22 存在下であっても AKT による KDM4B のリン酸化が ER シグナルを継続させることが予想され、これが ER 経路と HER2/PI3K/AKT 経路のクロストークの本体であると考えられた。

本研究はこれらの新規に発見したメカニズムに基づき、AKT による KDM4B のリン酸化が内分泌療法抵抗性を決定する因子であること、Fbxo22 による KDM4B 制御が、Fbxo22 陽性の Luminal/HER2 乳がん、あるいは PI3K/AKT 経路が活性化した Luminal 乳がんでもキーマカニズムとして重要な役割を果たしていることを明らかにすることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗体の作成

KDM4B Ser666 残基のリン酸化 (pS666) ペプチドを作成しこれに対するウサギポリクローナル抗体を作成した。抗体の特異性は KDM4B 免疫沈降物のウェスタンブロットおよびそれに対する AKT 阻害剤による抑制にて検証した。また、新規マウス抗 Fbxo22 モノクローナル抗体を作成した。

(2) 細胞株の作成

CRISPR/Cas9にてKDM4Bをノックアウトした乳がん細胞株MCF-7とT-47D細胞を樹立した。さらに、CS-RfA-ETBsdベクターをレンチウイルスで導入する方法にて、Doxycyclin誘導性に野生型、非リン酸化(S666A)および疑似リン酸化(S666D)変異型のKDM4Bを発現するMCF-7とT-47D細胞を樹立した。

(3) 免疫沈降・ウェスタンによる解析：クロマチン分画をBenzonaseにて可溶化し、KDM4B抗体にて免疫沈降し、共沈する結合タンパク質を解析した。

(4) DNA二本鎖切断部位へのタンパク質の集積を、BrdU処理後の細胞にレーザーマイクロ照射を行い、蛍光免疫染色、共焦点顕微鏡にて解析した。

(5) DNA損傷修復の経過を、放射線照射後の蛍光免疫染色によるH2AX核内fociの消失にて観察した。

(6) 薬剤感受性の観察

各種薬剤感受性をclonogenic survivalアッセイ、およびCellTiter Gloにて解析した。

(7) マウスでの解析

CRISPR/Cas9にてFbxo22-floxマウスを作製し、Lactoferrin誘導性にCreを発現するLtf-iCreマウスを掛け合わせ、乳腺と子宮内膜特異的なFbxo22コンディショナルノックアウト(cKO)マウス(Fbxo22-flox/flox; Ltf-Cre/+)を作成した。

(8) オルガノイド

上記のFbxo22-cKOマウスおよび野生型マウスの発情期の子宮内膜上皮を分離し、WNT3a, Noggin, R-spondin1, FGF10, EGF, ROCK阻害剤、TGF阻害剤等の存在化にオルガノイドを作成した。

4. 研究成果

KDM4B-S666リン酸化に対する抗体を作成し、KDM4BおよびAKTを過剰発現した系で抗KDM4B抗体での免疫沈降、抗KDM4B-S666リン酸化によるウェスタンブロット、AKT阻害剤によるその抑制にて抗体の特異性を確認した。また、免疫染色診断薬用に新たに高感度のFbxo22モノクローナル抗体を作製し、乳癌臨床検体を用いてその至適条件を確立した。

ERとHER2/PI3K/AKT経路のクロストークのメカニズムとして、AKTによるKDM4BのS666のリン酸化がKDM4BとFbxo22の結合およびFbxo22によるKDM4Bのコヒキチン化を阻害し、Fbxo22の発現が正常な状態であってもKDM4Bを介したエストロゲンシグナルを助長することを証明した(*Autophagy*, 17: 3776-3793, 2021)。

一方、KDM4Bの核内局在を解析している中で、KDM4BがDNA損傷局所に集積し、KDM4Bノックアウト(KO)MCF-7細胞では放射線照射後のH2AX核内fociの消失が遅延することから、その集積がDNA損傷修復に重要な役割を果たしていることが判明したため、令和3年からはこの機能に着目して解析を進めた。また、AKTに加えてMAPKの下流因子であるキナーゼXによってもKDM4BのS666残基がリン酸化され、キナーゼX阻害剤によって抑制されることが判明した。内因性のKDM4B S666リン酸化を質量分析計およびpS666特異抗体を用いたウェスタンブロットにて同定し、このリン酸化がキナーゼX阻害剤によって抑制されることが確認した。興味深いことに、このキナーゼX阻害剤はKDM4Bのレーザーマイクロ照射によるDNA二本鎖切断部位への集積を抑制し、放射線照射後のH2AX核内fociの消失も有意に遅延した。そこで、MCF-7に加え、T47D細胞からKDM4B-KO細胞を作成し、さらに両細胞にdoxycyclin(Dox)誘導性に野生型、非リン酸化変異S666A、疑似リン酸化変異S666Dが発現する安定細胞株を作成した。野生型に比べてS666A変異細胞ではDNA損傷局所への集積が抑制されるのに対して、S666D変異細胞では集積が著明に亢進し、キナーゼX阻害剤によって抑制されないことから、KDM4BがキナーゼXによってリン酸化され、このリン酸化がKDM4BのDNA損傷局所への集積に必要なことが判明した。このことはクロマチン分画の免疫沈降/ウェスタンブロットにて内因性のKDM4BとヒストンH3の結合が放射線照射後に著明に亢進し、キナーゼX阻害剤によって完全に阻害されることから裏付けられた。さらに、キナーゼX阻害剤で遅延した放射線照射後のDNA修復(H2AX核内fociの消失)が、S666Dによってレスキューされることから、キナーゼXがKDM4Bのリン酸化を介してKDM4BをDNA二本鎖損傷部位への集積に重要な役割を果たしていること、その阻害剤により、修復が抑制することが示された。KDM4BはBRCA1などの修復因子の損傷局所への集積に必須で、DNA二本鎖損傷修復における相同組換え修復に関与しているという報告があるが、KDM4B-KO細胞では相同組換え修復の指標であるBRCA1、BARD1およびRAD51の集積には影響はなく、PARP阻害剤との合成致死も生じないことなどから、非相同末端再結合ないし代替非相同末端再結合に必要と考え、キナーゼXとDox誘導性shRNAによるBRCA1およびBARD1のノックダウンとの合成致死性を解析したところ、MCF-7、T47D、HeLaおよびU2OS細胞全てで著明な合成致死を認めた。以上より、キナーゼX阻害剤が相同組換え修復不全を有するがんの治療薬として有望である可能性が示唆された。

上記とは別途、*in vivo*におけるFbxo22の機能とエストロゲン依存性発がんにおける役割を解析するために乳腺と子宮内膜上皮に特異的なFbxo22-cKOマウスし、発情周期及び発がんに及ぼす影響を解析した。その結果、膣スミアを用いた発情周期の解析では、野生型マウスが全て4日の周期を示したのに対し、Fbxo22-cKOマウスでは8匹中7匹は各周期が非常に遷延しており、明らかな発情周期の異常を認めた。また、妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)とヒト絨毛性ゴ

ナドトロピン (hCG) で発情周期を同調させた後の子宮内膜の経時的な変化を解析した結果、cKO マウスでは間質細胞は浮腫を伴う分泌期の形態であるのに上皮細胞のみが Ki-67 の異常高発現を伴う増殖期の形態を示す、ヒトにおける不規則成熟子宮内膜様の形態が認められた。このことから、Fbxo22 欠失により、E2 が低下する発情後期においても ER シグナルが継続し上皮特異的な増殖が続いていることが示唆された。

子宮内膜増殖性病変に関する解析では、Fbxo22-cKO マウスは生後 3 ヶ月で 5 例中 1 例に内膜増殖症 (endometrial hyperplasia: EH)、1 例に内膜異型増殖症 (atypical endometrial hyperplasia: AEH)、生後 4 ヶ月で 5 例中 2 例に EH、1 例に AEH、生後 6 ヶ月で 2 例に EH、1 例に AEH を認めた。さらに、生後 2 ヶ月より TAM を投与したところ、1 ヶ月投与にて 5 例中 2 例に AEH、3 例に内膜がん (endometrial cancer: EC) を認め、2 ヶ月投与では 5 例中 3 例に AEH、2 例に EC を認めた。一方、野生型マウスでは 1 ヶ月投与 3 例、2 ヶ月投与 5 例、計 8 例全例ともに内膜変化は構造異型 (complex) が顕著な EHにとどまり、AEH、EC は認められなかった。以上より、Fbxo22 の欠失は TAM 誘導性子宮内膜発がんを誘導することが判明した。上記表現型の分子生物学的なメカニズムを解明するために野生型と Fbxo22-cKO マウス子宮内膜上皮のオルガノイド作成に取り組み、野生型についてはオルガノイドの作成に成功した。

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 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nagasawa S, Kuze Y, Maeda I, Kojima Y, Motoyoshi A, Onishi T, Iwatani T, Yokoe T, Koike J, Chosokabe M, Kubota M, Seino H, Suzuki A, Seki M, Tsuchihara K, Inoue E, Tsugawa K, Ohta T, Suzuki Y	4. 巻 4
2. 論文標題 Genomic profiling reveals heterogeneous populations of ductal carcinoma in situ of the breast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01959-9	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 Suzuki Y, Wu W, Ohta T, Hayashi S	4. 巻 29
2. 論文標題 Molecular targeted drugs resistance impairs double-strand break repair and sensitizes ER-positive breast cancer to PARP inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breast Cancer.	6. 最初と最後の頁 77-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-021-01282-5	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 Katsuki Y, Abe M, Park SY, Wu W, Yabe H, Yabe M, Attikum HV, Nakada S, Ohta T, Seidman MM, Kim Y, Takata M	4. 巻 37
2. 論文標題 RNF168 E3 ligase participates in ubiquitin signaling and recruitment of SLX4 during DNA crosslink repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 109879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109879	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 該当する

1. 著者名 Johmura Y, Harris A, Ohta T, Nakanishi M	4. 巻 111
2. 論文標題 FBX022, an epigenetic multiplayer coordinating senescence, hormone signaling, and metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2718-2725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14534	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 Zhu M, Wu W, Togashi Y, Liang W, Miyoshi Y, Ohta T	4. 巻 11
2. 論文標題 HERC2 inactivation abrogates nucleolar localization of RecQ helicases BLM and WRN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79715-y	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 Suzuki N, Johmura Y, Wang TW, Migita T, Wu W, Noguchi R, Yamaguchi K, Furukawa Y, Nakamura S, Miyoshi I, Yoshimori T, Ohta T, Nakanishi M	4. 巻 17
2. 論文標題 TP53/p53-FBX022-TFEB controls basal autophagy to govern hormesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 3776-3793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.1897961	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 乳がんの臨床を左右する新規エピジェネティックメカニズム
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木友菜, 豊澤大地, 呉文文, 太田智彦, 林慎一
2. 発表標題 ER陽性乳癌細胞における、薬剤耐性獲得に伴うDNA修復機構異常とPARP阻害薬感受性
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 DNA修復脆弱性を標的としたがん治療
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川紗紀, 宮下穰, 江幡明子, 佐藤章子, 原田成美, 濱中洋平, 甘利正和, 平川久, 大井恭代, 太田智彦, 多田寛, 石田孝宣
2. 発表標題 エストロゲン受容体の発現を制御するFbxo22は浸潤性小葉癌の予後因子となりうるか
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木友菜, 豊澤大地, 呉文文, 丹羽俊文, 太田智彦, 林慎一
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬耐性細胞はDNA修復機構に異常をきたしPARP阻害薬に反応する
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田智彦
2. 発表標題 BRCA1 N末端の変異とPARP阻害剤感受性: E3リガーゼ活性についての再考
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 太田智彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 688
3. 書名 乳癌診療 state of the art - 科学に基づく最新診療「遺伝性乳癌に対する遺伝子修復不全標的治療」	

1. 著者名 Ohta T, Wu W	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 324
3. 書名 Hereditary Breast and Ovarian Cancer「Molecular Basis of BRCA1 and BRCA2: Homologous Recombination Deficiency and Tissue-Specific Carcinogenesis」	

1. 著者名 太田智彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 425
3. 書名 乳腺腫瘍学「7. BRCA変異診断、ゲノム診断」	

1. 著者名 郷田敦史, 吳文文, 太田智彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ「BRCA遺伝子変異による臓器特異的な発がん」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

聖マリアンナ医科大学大学院 医学研究科 応用分子腫瘍学
<http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------