

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08916

研究課題名(和文) エストロゲン制御機構とその逸脱に関わる標的分子による女性がん増悪機構の解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation of female cancer pathophysiology based on the estrogen-regulatory and -refractory systems and applications of therapeutic targets related to the estrogen evasion mechanisms.

研究代表者

佐藤 航 (Sato, Wataru)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10772783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳がん(TNBC)におけるestrogen responsive finger protein (Efp)の作用を明らかにするため、TNBC患者由来細胞などを用いてEfpの発現を解析したところ、これらTNBC由来の細胞でEfpが過剰発現していることを見出した。またEfpの発現低下系と過剰発現系により、Efpは細胞増殖、細胞移動能、細胞周期の進行に関与することを明らかにした。さらに、トランスクリプトーム解析により、Efpは細胞周期関連遺伝子などの発現制御に関与することが示された。以上より、EfpはTNBCにおいて腫瘍促進的に働くことから、治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、Efpはトリプルネガティブ乳がん(TNBC)において腫瘍促進的な役割を担っていることをはじめて明らかにした。また、Efpによって発現制御を受ける細胞周期関連遺伝子としてCDCA7とHELLSを明らかにし、Efpの細胞内作用メカニズムとして新たな経路を示す学術的知見を得た。エストロゲン受容体陽性の乳がんに加え、TNBCにおいてもEfpが治療標的となり得る可能性を明らかにしたことは、治療標的が少なく予後不良であるTNBCに対する新たな治療法開発への応用として期待され、社会的意義を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the effect of estrogen responsive finger protein (Efp) in triple negative breast cancer (TNBC), we analyzed the expression of Efp using TNBC patient-derived cells and cell line, and found that Efp is overexpressed in these cancer cells. Gain- and loss-of function analysis demonstrated that Efp is involved in the proliferation, migration, and cell cycle progression of TNBC cells. Furthermore, transcriptome analysis showed that Efp is involved in the regulation of expression of cell cycle-related genes. These findings suggest that Efp acts as a tumor-promoting factor in TNBC, implying a potential therapeutic target in clinical treatment.

研究分野：内分泌

キーワード：Efp ステロイドホルモン 遺伝子発現 トリプルネガティブ乳がん

1. 研究開始当初の背景

乳がん、子宮体がんの多くはエストロゲン受容体(ER)を発現し、エストロゲン依存性の増殖を示すことが知られている。このような特徴に基づき、乳がんの治療ではホルモン療法として 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アロマターゼ阻害剤などが用いられるが、治療過程において抵抗性を獲得するがんが生じ、難治性となることが多い。興味深いことに、ホルモン療法に抵抗性を獲得した後も ER が陽性のままであることが多く、抵抗性獲得と ER の関連について十分に明らかではない。また、ER、プロゲステロン受容体(PR)、受容体型チロシンキナーゼ(HER2)を発現しないトリプルネガティブ乳がん(TNBC)のように、初めからホルモン療法に抵抗性で予後不良のがんも存在しており、内分泌制御からの逸脱のメカニズムと治療抵抗性との関連について解明が望まれている。さらに、子宮体がんではホルモン療法による生存率の改善効果が低いことから、臨床でのホルモン療法の施行は限定的であり、ホルモン作用の組織特異性の観点からも未解明な点が残されている。

エストロゲンは標的組織の細胞内に存在するホルモン依存性転写因子である ER を活性化することによってその作用を発揮することから、エストロゲン応答遺伝子がエストロゲン作用のメディエーターとして重要な役割を担っている。従って、ホルモン療法抵抗性乳がんにおいてはエストロゲン応答遺伝子の発現変化などが想定されるが詳細は十分に明らかになっていない。我々は、独自に同定・解析を行っているエストロゲン応答遺伝子 Efp が、ER 陽性の乳がん、子宮体がんにおいて腫瘍促進因子として機能することを示してきたが(1,2)、トリプルネガティブ乳がんをはじめとするホルモン治療薬に対して抵抗性を有するがんについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

乳がんのサブタイプの1つである TNBC は、乳がん患者全体の約 15~20%を占めており、治療薬抵抗性や転移性が高く、悪性度が高い。これまでに、TNBC の生物学的特性の解明や効率的な治療戦略の開発を目指し、基礎から臨床に渡る研究が行われており、DNA 修復機構、免疫チェックポイント、PI3K/mTOR 阻害剤、アンドロゲン除去など、いくつかの候補因子が治療標的として探索されてきたが、十分な治療効果は得られておらず、臨床上有効な TNBC の治療法はいまだに見出されていない現状である(3)。

我々は以前にエストロゲン応答遺伝子として、RING finger、B-box、coiled-coil の保存された3つのドメインからなる TRIM (tripartite motif)ファミリータンパク質の一員である Efp を見出し、様々ながん種におけるがんの進行に寄与していることを明らかにしてきた。乳がんにおいては、臨床病理学的研究により、Efp の免疫染色性は無病生存期間ならびに全生存期間の短縮と有意な相関を示すことを明らかにしている(4)。その分子メカニズムとして、ER 陽性の乳がんにおいて、Efp は細胞周期のネガティブレギュレーターとして働く 14-3-3 σ のポリユビキチン化を担うユビキチンリガーゼとして機能し、プロテアソームを介したタンパク分解を促進することで細胞周期を進行させることを明らかにしている(1)。

一方、Efp は ER 陽性・陰性のステータスに関わらず、乳がん患者の予後に関連することを示しており(4)、Efp は ER 陰性の乳がんにおいても重要な機能を有することが想定され

ている。さらに最近、Efp は ER の発現ステータスとは関係なく、乳がんの転移と関連することが見出され、特に乳がんの転移に関わる遺伝子発現のヒエラルキーにおいて、Efp が最も中心的なハブとして機能することが示された(5)。しかしながら、TNBC をはじめとするホルモン治療薬抵抗性の乳がんにおける Efp の作用メカニズムについては十分に明らかになっていない。本研究では、TNBC における Efp の作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト乳がん由来培養細胞として、ER 陽性の MCF-7 細胞と T47D 細胞、ならびに TNBC の臨床サンプルから樹立した患者由来細胞(TNBC-PDC; TNBC-patient derived cell)および TNBC 細胞株である MDA-MB-231 細胞を用いた。遺伝子発現量は特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法と特異抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて、それぞれ RNA レベルとタンパク質レベルで解析を行った。Efp の機能解析を行うため、Efp に対する siRNA を作製し、TNBC 細胞にトランスフェクションして Efp 発現のノックダウンを行った。また、Efp を発現するプラスミドベクターを作製し、TNBC 細胞にトランスフェクションにて導入し、過剰発現を行った。細胞増殖の解析は、細胞溶解液を Hoechst 33,258 蛍光色素を用いて染色することによって DNA 量の蛍光分析から細胞増殖を算定した。細胞移動能の評価は、8 μ m 孔のトランスウェルの上側に細胞を播種した後、孔を通過して下側に移動した細胞をギムザ染色で検出し細胞数を定量した。細胞周期の解析は、固定した細胞をヨウ化プロピジウムで染色した後、フローサイトメトリーを用いて DNA 含量を分析し、細胞周期の G1 期、S 期、G2/M 期の割合を算出することによって行った。Efp による細胞内シグナル経路の解析のため、Efp に対する siRNA およびコントロールの siRNA で処理した TNBC 細胞から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、包括的な遺伝子発現プロファイリングを行った。

4. 研究成果

TNBC 細胞における Efp の役割を調べるため、従前から使用されている MDA-MB-231 細胞に加えて、TNBC から樹立した患者由来がん細胞 (TNBC-PDC) を用いて Efp 発現量を解析したところ、これら TNBC 細胞において RNA レベル及びタンパク質レベルで Efp が発現していることを明らかにし、その発現レベルは ER 陽性の MCF-7 細胞や T47D 細胞に匹敵する程度であった(6)。

次に、TNBC 細胞における Efp の機能を評価するため、Efp を標的とする siRNA (siEfp) を MDA-MB-231 細胞および TNBC-PDC 細胞に導入して Efp の発現をノックダウンした細胞と、コントロールの siRNA (siControl)を導入した細胞を作製し、細胞増殖試験を行った。その結果、siEfp 処理によって細胞増殖が有意に抑制されることを明らかにした。また、細胞周期進行に対する siEfp の効果をフローサイトメトリーにより解析したところ、siControl で処理した細胞と比較して、有意に細胞周期 S 期に存在する細胞の割合が減少することを示した。さらに、MDA-MB-231 細胞および TNBC-PDC 細胞の移動能における Efp の関与を評価するため、siEfp または siControl で処理した TNBC 細胞をトランスウェルに播種して解析したところ、siEfp は移動細胞数を有意に減少させることを明らかにした。

一方、Efp の過剰発現による TNBC 細胞への影響を明らかにするため、Efp 発現プラスミドをトランスフェクションした細胞とコントロールの空ベクターをトランスフェクシ

ンした細胞を比較したところ、Efp を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞および TNBC-PDC 細胞の両方において、細胞増殖、細胞周期進行、細胞移動能がそれぞれ有意に増加することを示した。

TNBC 細胞の遺伝子発現プロファイルに対する Efp の影響を明らかにするため、siEfp または siControl で処理した MDA-MB-231 細胞と TNBC-PDC 細胞の RNA を用いてマイクロアレイ法により解析を実施した。その結果、MDA-MB-231 細胞および TNBC-PDC 細胞において、siEfp によって細胞特異的に発現変化を示す遺伝子と、これらの細胞に共通して発現変化を示す遺伝子が認められた。上記のフローサイトメトリーを用いた解析により、Efp ノックダウンによって細胞周期進行が抑制されたことから、siEfp によって発現低下する細胞周期関連遺伝子に注目したところ、興味深いことに TNBC-PDC 細胞で最も発現低下した遺伝子として細胞分裂のエピジェネティック制御に関連する CDCA7 (Cell division cycle associated 7)が認められた。さらに、CDCA7 と複合体を形成し、クロマチンリモデリングに関与する HELLS (Helicase, lymphoid specific)が、CDCA7 とともに発現低下する上位 5 遺伝子に含まれていた。これらの結果の検証として定量的 PCR 法を行い、Efp ノックダウンが MDA-MB-231 と TNBC-PDC の両細胞において CDCA7 と HELLS の発現を有意に低下させることを確かめた。そこで、CDCA7 と HELLS が TNBC 細胞の増殖を調節するか否か検討するため、CDCA7 と HELLS を標的とする siRNA をそれぞれ用いて細胞増殖試験を行ったところ、MDA-MB-231 および TNBC-PDC 細胞の増殖を有意に減少することを明らかにした(6)。

これらの結果より、Efp は細胞周期関連遺伝子である CDCA7 や HELLS などの発現を調節することにより、TNBC 細胞において腫瘍促進因子として機能することが明らかとなり(図 1)、ホルモン感受性乳がんに限らず、TNBC の治療標的としても有望であることが示唆された。

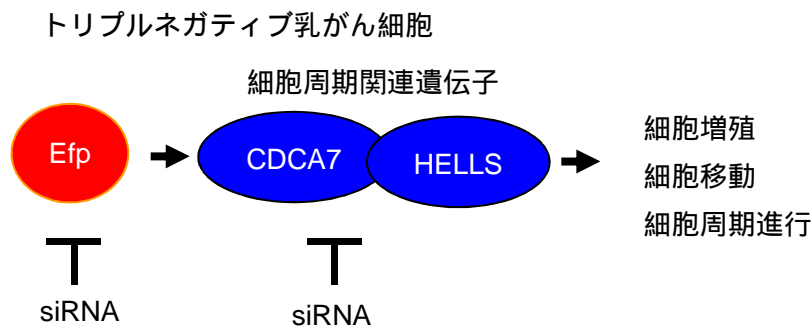


図 1 Efp は細胞周期関連遺伝子を制御し、トリプルネガティブ乳がん細胞の増殖・移動能の亢進に関与する

参考文献

1. 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*. 2002;417:871-5.
2. 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- κ B signaling. *PLoS One*. 2018; 13: e0208351.
3. Mehlich D, Marusiak AA. Kinase inhibitors for precision therapy of triple-negative breast cancer: Progress, challenges, and new perspectives on targeting this heterogeneous disease.

Cancer Lett. 2022; 547: 215775.

4. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 6148-54.
5. Walsh LA, Alvarez MJ, Sabio EY, Reyngold M, Makarov V, Mukherjee S, Lee KW, Desrichard A, Turcan Ş, Dalin MG, Rajasekhar VK, Chen S, Vahdat LT, Califano A, Chan TA. An Integrated Systems Biology Approach Identifies TRIM25 as a Key Determinant of Breast Cancer Metastasis. *Cell Rep.* 2017; 20: 1623-1640.
6. Sato W, Ikeda K, Gotoh N, Inoue S, Horie K. Efp promotes growth of triple-negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022; 624: 81-88.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Wataru, Ikeda Kazuhiro, Gotoh Noriko, Inoue Satoshi, Horie Kuniko	4. 巻 624
2. 論文標題 Efp promotes growth of triple-negative breast cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81～88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.07.071	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 Kitayama Sachi, Ikeda Kazuhiro, Sato Wataru, Takeshita Hideki, Kawakami Satoru, Inoue Satoshi, Horie Kuniko	4. 巻 12
2. 論文標題 Testis-expressed gene 11 inhibits cisplatin-induced DNA damage and contributes to chemoresistance in testicular germ cell tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-21856-3	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 Takeiwa Toshihiko, Ikeda Kazuhiro, Suzuki Takashi, Sato Wataru, Iino Kaori, Mitobe Yuichi, Kawabata Hidetaka, Horie Kuniko, Inoue Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 PSPC1 is a potential prognostic marker for hormone-dependent breast cancer patients and modulates RNA processing of ESR1 and SCFD2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13601-7	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 Kamada Shuhei, Ikeda Kazuhiro, Suzuki Takashi, Sato Wataru, Kitayama Sachi, Kawakami Satoru, Ichikawa Tomohiko, Horie Kuniko, Inoue Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinicopathological and Preclinical Patient-Derived Model Studies Define High Expression of NRN1 as a Diagnostic and Therapeutic Target for Clear Cell Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 758503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2021.758503	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 Mitobe Yuichi, Ikeda Kazuhiro, Sato Wataru, Kodama Yukinobu, Naito Mitsuru, Gotoh Noriko, Miyata Kanjiro, Kataoka Kazunori, Sasaki Hitoshi, Horie Inoue Kuniko, Inoue Satoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Proliferation associated long noncoding RNA, TMPO AS1, is a potential therapeutic target for triple negative breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2440 ~ 2450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14498	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤航、池田和博、堀江公仁子、井上聡
2. 発表標題 Efpはトリプル陰性乳がん細胞の増殖と移動能を促進させる
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤航、池田和博、堀江公仁子、井上聡
2. 発表標題 患者由来トリプルネガティブ乳がん細胞においてEfpは細胞周期関連因子を標的として細胞増殖をもたらす
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会 学術集会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東浩太郎、池田和博、柴祥子、佐藤航、堀江公仁子、田中伸哉、井上聡
2. 発表標題 エストロゲン応答遺伝子Ebag9欠損マウスにおける骨形成低下とオートファジー制御
3. 学会等名 第39回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Kamada, Kazuhiro Ikeda, Takashi Suzuki, Wataru Sato, Sachi Kitayama, Satoru Kawakami, Tomohiko Ichikawa, Kuniko Horie, Satoshi Inoue
2. 発表標題 Patient-derived renal cancer cell model reveals nunitin1 as a tumor promoting and prognostic factor
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 エストロゲン応答遺伝子Ebag9欠損マウスにおける骨脆弱化とその分子メカニズム
3. 学会等名 第40回 日本骨形態計測学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	池田 和博 (Ikeda Kazuhiro) (30343461)	埼玉医科大学・医学部・准教授 (32409)	

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