

機関番号：81303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：H21～H22年度

課題番号：21791265

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌悪性化形質におけるユビキチン依存性輸送系の役割

研究課題名（英文） Role of ESCRT system in triple negative breast cancer

研究代表者 多田 寛 (TADA HIROSHI)

宮城県立がんセンター（研究所）・共同研究員

研究者番号：50436127

研究成果の概要（和文）：乳癌は比較的若年者に頻繁に発生することから、単に生命予後のみならず Quality of Life の観点からもその克服が急務である。特に、エストロゲン受容体（ER）陰性・プロゲステロン受容体（PgR）陰性かつ Her2 陰性のいわゆる「トリプルネガティブ乳癌（TNBC）」は特に予後不良であり、悪性形質発現の解析が必要である。癌の浸潤・転移には上皮-間葉転換（EMT）という過程が必須である。EMT では癌細胞形質の変化が起こるが、この過程は ESCRT 細胞内輸送系によって制御されている可能性がある。そこで本研究では細胞内小胞輸送系、特に Vps4 等から構成される ESCRT 系を介した悪性形質制御を解析した。不活型 Vps4 を発現する細胞株では、*in vitro* における形態変化、運動性の亢進に有意な差はなかったが、マウスにおける造腫瘍性が軽度亢進した。EMT 誘導因子を発現させた乳がん細胞では、SP, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> が2倍以上に増加した。トリプルネガティブ乳がんにおいては ESCRT がよく発現しており、癌幹細胞を増加させることにより悪性を制御しうることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：Because breast cancer often affects relatively younger females, underlying mechanisms which control the malignant phenotype is of great significance. In this study, we investigated how breast cancers including the triple negative breast cancers are controlled by EMT, a phenomenon in which solid tumors change their shapes and start migration. A breast cancer cell line in which ESCRT, a vesicular transport system that determines proteins lifetime, is abrogated, *in vivo* proliferation of tumors was attenuated. Cells with forced expression of either twist or snail, two key transcriptional factors which induce EMT, resulted in an increase in cancer stemness, as judged by side population and CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>. These results suggest that ESCRT system and EMT may positively control the malignant phenotypes of breast cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：臨床医学・乳腺外科

キーワード：酵素、蛋白質、ユビキチン、小胞輸送

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は比較的若年者に頻繁に発生することから、単に生命予後のみならず Quality of Life の観点からもその克服が急務である。浸潤・転移を早期から惹起する乳がんは治療抵抗性が高く、臨床的に問題となる。最近になって、各種マーカーによる乳がんの亜分類が進められ、エストロゲン受容体 (ER) 陰性・プロゲステロン受容体 (PgR) 陰性かつ Her2 (Human Epidermal Receptor 2) 陰性のいわゆる「トリプルネガティブ乳癌 (TNBC)」が特に予後不良であることが指摘されている。さらに、EGF 受容体を過剰発現する症例は極めて予後不良であることから、悪性形質発現機構の解明が必須である。最近になって癌の浸潤・転移には上皮間葉転換 (EMT; endothelial-mesenchymal transition) という多段階の細胞生物学的過程が必須であることが判明した。EMT の促進には EGF 受容体等の増殖因子系シグナル伝達が関与すると指摘されているが、乳癌の悪性形質発現における EMT の関与についてはこれまで十分に解析されていない。さらに、EGF 受容体等のがん細胞発現タンパク質の多くがユビキチン化され小胞輸送によって細胞内に運ばれ、最終的にライソソームにおいて分解される。これらがん細胞発現タンパク質は「ESCRT 小胞輸送系」と呼ばれる特異な小胞輸送蛋白群によって輸送・分解され、量的調節を受ける。EMT および ESCRT は相互に関連して癌細胞の悪性を誘導している可能性があるが、乳がんにおける役割については不明の点が少ない。

### 2. 研究の目的

ヒト癌細胞において ESCRT 分子群のうち Hrs の発現を人為的に抑制すると細胞内小胞の形態・機能に異常が認められた。癌の悪性と小胞輸送の関係を示唆する実験結果が報告されており、ヒト癌の悪性化において小胞輸送系は重要な役割を果たすと考えられる。本研究ではトリプルネガティブ乳癌に焦点を当て、細胞内小胞輸送系を介した悪性形質制御機構の解明と治療法開発を目指す。悪性化における ESCRT の役割を明らかにするため ESCRT 系の最終段階を制御する重要分子 VPS4 に焦点を当てる。①乳がん癌細胞株を用いた in vitro 実験系、②乳がん癌細胞株を用いた in vivo 実験系、の両面から解析することで、小胞輸送による乳がん癌制御、さらに TNBC における役割を明らかにすることを目的と

する。

### 3. 研究の方法

1) ドキシサイクリン誘導性癌細胞を用いた in vitro 悪性化の解析  
ドキシサイクリン誘導系癌細胞株を樹立し、癌における ESCRT 小胞輸送系の役割を解析する。輸送系異常による悪性化を検証するため、乳がん細胞株 MCF-7 を用い不活性型 VPS4 をドキシサイクリン依存性に発現する細胞株 (MCF-7/Tet-onVPS4dn) を作製する。非活性型 VPS4 発現するレトロウイルスベクターを導入し、人為的に輸送系蛋白の発現量を変化させる。細胞形態の変化: EMT に類似した紡錘状形態への誘導、遊走能、細胞増殖能の変化を検証する。

2) 不活性型 VPS4 を発現する乳癌細胞株を用いた in vivo 悪性化の解析  
MCF-7/Tet-onVPS4dn を用いて造腫瘍性を解析する。悪性化に変化がないか調べる。

### 3) EMT 誘導と癌悪性化の解析

EMT の誘導に重要な Snail, twist を乳がん細胞株に導入し、がん幹細胞の表現系が発現するか Side Population (SP), CD44+, CD24-/low などを指標に FACS 解析を行う。

4) トリプルネガティブ乳がん細胞株 (BT20, MDA-MB-231) を用いて、ESCRT 発現と幹細胞マーカー、および EMT 制御因子 (twist, snail) の機能を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 誘導性癌細胞を用いた in vitro 悪性化解析: 一般的細胞株として知られている MCF7 を対象として ESCRT 系を阻害する実験系を構築した。レトロウイルスベクター (pRetroX) によって不活性型 Vps4 をドキシサイクリン依存性に発現する細胞株 MCF-7/Tet-onVPS4dn の樹立に成功し、増殖能を調べた。明らかな差異はなかった。そこで EMT、形態変化、運動性の亢進、の変化を検討した。EMT に関する遺伝子として twist1, snail, slug の mRNA を検討したが有意な差はなかった。

(2) ドキシサイクリン誘導性癌細胞を用いた悪性化解析: MCF-7/Tet-onVPS4dn を用いて、ESCRT 輸送系タンパク質 Vps4 (不活性型) を発現させ、超免疫不全

NOG マウスに移植したところ、造腫瘍能が変化し、腫瘍サイズの増加が軽度認められた。

(3) MCF-7細胞に対し snail, twist をレトロウイルスベクターで導入したところ、がん幹細胞性に関連する SP, CD44+/CD24-/low が2倍以上に増加したことから、乳がんにおいて EMT 関連分子が癌幹細胞を増加させることがわかった。

(4) BT20, MDA-MB-231 はいずれも ESCRT 分子を高度発現しており、EMT 関連分子が発現していた。CD44 が高度発現していた。以上の結果から、トリプルネガティブ乳癌では ESCRT による癌幹細胞性制御がなされている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

多田寛、河合賢朗、大内憲明：「乳がん検診」  
治療 93 巻 5 号 1217-1222. 2011

多田寛、石田孝宣、甘利正和、河合賢朗、大内憲明：  
更年期医療：更年期における乳腺の画像診断  
臨床検査 55 巻 3 号 272-276. 2011

多田寛、鈴木昭彦、大内憲明：「乳がん検診における  
デジタルマンモグラフィの座標と今後への期待」  
新医療37巻12号97-100. 2010

[学会発表] (計 1 件)

Hiroshi Tada, Takanori Ishida, Motohiro Takeda, Masakazu Amari, Masaaki Kawai, Kentaro Tamaki, Noriaki Ohuchi. Breast conserving surgery with volume replacement using lateral tissue-flap. The 3rd International Oncoplastic Breast Surgery Symposium Tokyo 2011.11.25

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 寛 (TADA HIROSHI)

宮城県立がんセンター (研究所)・  
免疫学部・共同研究員

研究者番号：50436127

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：