

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012 年度

課題番号：23701046

研究課題名（和文） NF κ B による乳癌幹細胞維持の分子機構研究課題名（英文） Molecular mechanisms of maintenance of breast cancer stem cells by NF κ B

研究代表者

山口 憲孝 (YAMAGUCHI NORITAKA)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80399469

研究成果の概要（和文）：

本研究では、乳癌幹細胞維持に関わる NF κ B 標的遺伝子の特定と乳癌細胞株におけるタンパク質キナーゼ NIK 恒常的活性化機構の解析を行った。前者の解析では、乳癌幹細胞維持に関わる NF κ B 標的遺伝子として NOTCH リガンドの一つである JAG1 を同定した。後者の解析では、プロテオーム解析により NIK の活性化を促進する新規タンパク質としてユビキチン化修飾酵素 A20 を同定した。以上より、JAG1 や A20 が乳癌の新規治療標的になる可能性が見いだされた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed NF κ B target genes that leads to maintenance of breast cancer stem cells and molecular mechanisms that leads to constitutive activation of a protein kinase NIK. We found that NF κ B induces maintenance of the breast cancer stem cells through expression of JAG1, a NOTCH receptor ligand. We also found that an ubiquitin-editing enzyme A20 promotes stabilization and activation of NIK in breast cancer cells. These results suggest that JAG1 and A20 may be new therapeutic targets for the malignant type of breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：シグナル伝達・がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

NF κ B は様々な癌細胞において恒常的に活性化し細胞増殖や転移・浸潤、血管新生などに関わる様々な遺伝子の発現を誘導して癌の悪性化をもたらす。従って NF κ B は抗癌剤の格好の標的であるが、NF κ B 阻害剤の開発は難航していること、および NF κ B は免疫制御や骨代謝制御などの多様な生理機能を有することから、癌細胞において NF κ B 恒常的

活性化を導く上流のタンパク質や癌の悪性化に関わる標的遺伝子に対する阻害剤の開発が必要とされている。そこで我々は、ヒト癌細胞株を用いて NF κ B 恒常的活性化の分子機構と標的遺伝子の解析を行ってきた。

これまでに我々は、乳癌や膵癌などのヒト癌細胞株 125 種を収集し、各株の NF κ B 活性をゲルシフト法にて定量化したデータベースを作成した。私は 35 種の乳癌細胞株を担

当し、高悪性乳癌細胞において特異的に NF κ B が恒常的に活性化していることを明らかにした。さらに、これらの乳癌細胞株ではエピジェネティックな機構により NIK 遺伝子が過剰発現し NF κ B 恒常的活性化を導いていること、この NF κ B 恒常的活性化は細胞増殖に必要な役割を果たしていることを明らかにした。

興味深いことに、高悪性乳癌細胞は、乳癌幹細胞（表面マーカーの発現が CD24 $^-$ /CD44 $^+$ の細胞集団）を多く含むことが報告されている。そこで、これらの癌細胞株における NF κ B 恒常的活性化の度合いと乳癌幹細胞の割合の比較を行ったところ、両者に正の相関があることがわかった。NF κ B 活性化を誘導するタンパク質キナーゼの NIK や IKK β の過剰発現によりこれらの株の NF κ B 活性化を増強させると、乳癌幹細胞の割合が増加した。一方、NF κ B 抑制因子の I κ B α の過剰発現により NF κ B を抑制すると、乳癌幹細胞の割合は減少した。表面マーカー発現にて検出した乳癌幹細胞の割合は、スフィア形成能や NOD/scid マウスへの造腫瘍活性とも正の相関があり、確かに乳癌幹細胞が増減していることが機能的にも確かめられた。以上のことから、NF κ B の活性化が乳癌幹細胞の維持に寄与していることが考えられた。次に、乳癌幹細胞において NF κ B が強く活性化していると予想し、フローサイトメーターにて乳癌幹細胞画分と非幹細胞画分を分離してゲルシフト法にて NF κ B 活性の比較を行った。しかし、予想に反して両者の間に明確な差は認められなかった。そこで、周りの細胞の NF κ B 活性化が乳癌幹細胞の維持に寄与していると考え、NF κ B 活性化を調節した株に少量の GFP 標識した株を混合し、GFP 標識した株の乳癌幹細胞の増減を調べた。すると、IKK β 発現にて NF κ B 活性化を増強した株と混合することにより GFP 標識した株の乳癌幹細胞が増加し、一方 I κ B α 発現にて NF κ B 活性化を抑制した株との混合では GFP 標識した株の乳癌幹細胞が減少することがわかった。以上の結果から、NF κ B は乳癌幹細胞において強く

活性化しているのではなく、周りの細胞の NF κ B 標的遺伝子が乳癌幹細胞に作用してその維持に働いていると考えられた（図1）。

2. 研究の目的

上記の結果より、NIK 依存的に恒常的活性化を示す NF κ B シグナルとその標的遺伝子が乳癌幹細胞維持に寄与しており、これらやこれらの制御因子が乳癌の治療標的になることが示された。そこで、戦略1：乳癌幹細胞の維持に関わる NF κ B 標的遺伝子の探索と、戦略2：NF κ B 恒常的活性化に関わる NIK 活性化の制御機構の解析を進めることにより、NF κ B による乳癌幹細胞維持の分子機構解明を進め乳癌治療の新たな治療標的分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

戦略1では乳癌幹細胞の維持に関わる NF κ B 標的遺伝子を同定する。IKK β 発現による NF κ B 活性化にて発現誘導される遺伝子、および I κ B α 発現による NF κ B 抑制にて発現低下する遺伝子をマイクロアレイ解析にて特定し、これらの遺伝子の中から過剰発現や RNAi にて乳癌幹細胞が増加もしくは減少する遺伝子を同定する。フローサイトメーターにて乳癌幹細胞画分を分離し、特定した遺伝子によるシグナル伝達系が確かに乳癌幹細胞において特異的に活性化していることを確かめる。戦略2では、乳癌細胞株における NIK の過剰発現機構や活性化機構の詳細な解析を進める。これまでの解析で乳癌細胞株では NIK の遺伝子レベルの過剰発現が NIK の機能亢進と NF κ B 恒常的活性化の一因となっていることを明らかにした。しかし、NIK 遺伝子の過剰発現がどの転写因子・シグナル伝達系によって促進されているのかは明らかになっておらず、これらを解明する必要がある。また、NIK は活性化の際にタンパク質分解が抑制されて安定化し、自己リン酸化により活性化するという興味深い性質をもつが、NIK の分解・安定化や活性化の制御機構にはまだ不明な点が多く、これらの破綻が NIK の活性化亢進に繋がっている可能性も考えられる。従って、プロテオームにより NIK 結合因子を解析し、NIK の分解・安定化や活性化の制御機構の全貌を明らかにする。

具体的な方法としては、戦略1では、まず、NF κ B 活性化や抑制を誘導した高悪性乳癌細胞株のアレイ解析を行い、NF κ B 標的遺伝子リストを作成する。次に、フローサイトメーターにて乳癌幹細胞（CD24 $^-$ /CD44 $^+$ ）を分離してアレイ解析を行い、乳癌幹細胞にて特異

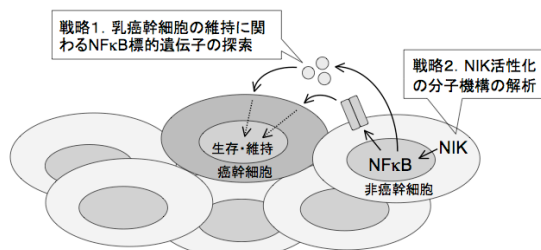


図1. NF κ Bによる乳癌幹細胞ニッチ形成の模式図
乳癌幹細胞周辺の癌細胞が発現するNF κ B標的遺伝子により乳癌幹細胞が維持されている。

的に活性化しているシグナル伝達系を特定する。特定したシグナル伝達系を参考にして、NF κ B 標的遺伝子リストの中から過剰発現や発現抑制にて乳癌幹細胞が増加や減少する遺伝子を特定する。戦略2では、NIK 遺伝子のプロモーター解析とプロテオーム解析による結合因子探索を行う。プロモーター解析では、レポーター解析により転写に必要な領域を特定し、転写因子結合配列を調べてNIK 遺伝子の発現に関わる転写因子を同定する。プロテオーム解析では高純度な複合体解析が可能な Tandem affinity purification (TAP)法を行う。

4. 研究成果

戦略1においては、乳癌幹細胞維持に関わるNF κ B 標的遺伝子としてNOTCH リガンドの一つである JAG1 を同定した。マイクロアレイ解析から、NF κ B 活性化と発現量に相関のある遺伝子群を同定し、この中に乳癌幹細胞維持に関わることが知られたNOTCH シグナルのリガンドである JAG1 を見いだしたため解析を進めた。実際に JAG1 の mRNA, タンパク質発現を解析すると、NF κ B 恒常的活性化レベル並びにサイトカイン刺激によるNF κ B 活性化レベルと正の相関が認められた。乳癌細胞のNF κ B を遺伝子導入やサイトカイン刺激により上昇させると乳癌幹細胞の割合が増加することを見いだしていたが、JAG1 の発現抑制によりこの増加は顕著に抑制された。また、NOTCH 阻害薬の添加によっても同様に抑制された。乳癌幹細胞を精製してNOTCH シグナルの標的遺伝子発現を解析すると、確かにこのシグナル系の標的遺伝子が高く発現しており、それがNF κ B 活性化によって上昇した。乳癌組織の構成細胞である繊維芽細胞やマクロファージにサイトカイン刺激を加えてNF κ B を活性化させると、乳癌細胞と同様に JAG1 発現が増加した。このことから、乳癌細胞やそれを取り巻く正常細胞群のNF κ B が活性化されると、JAG1 の発現が増加してNOTCH シグナルが活性化し乳癌幹細胞の増加に寄与すると考えられた。

戦略2においては、プロテオーム解析によりNIK の活性化を促進する新規タンパク質としてユビキチン化修飾酵素 A20 を同定した。A20 はNIK 活性化乳癌細胞株において高く発現しており、RNAi ノックダウンにて発現を抑制するとNIK 恒常的活性化は抑制され、さらにNF κ B の活性化も低下した。ノックダウン細胞では細胞増殖が低下し、さらに抗癌剤耐性も下がっていた。A20 遺伝子を欠損するマ

ウス繊維芽細胞を用いてNIK 活性化を導くサイトカイン刺激を行うと、NIK の活性化が顕著に減弱した。従って、このタンパク質は乳癌細胞のみならず、正常細胞においてもNIK 活性化を促進する重要因子であると考えられた。A20 は脱ユビキチン化活性とユビキチンリガーゼ活性の異なる酵素活性を有するが、NIK の活性化にはその酵素活性は必要ないことも明らかにした。詳細な機能解析の結果、A20 はNIK の分解を誘導するユビキチンE3 リガーゼ cIAP1 の制御を介してNIK を安定化していることも見いだした。A20 と cIAP1 との結合は、A20 のC末端のZinc finger もチーフを介しており、既知の酵素活性を担う領域とは異なっていることも明らかにした(図2)。現在、A20 が cIAP1 を制御する分子機構について in vitro 再構築系などを用いて詳細な解析を進めている。

NIK プロモーター解析も進めており、転写開始点近傍に転写活性化に重要な領域があることを突き止めた。現在、in silico 解析にてその領域に結合配列を持つ転写因子を特定しており、過剰発現やノックダウン解析を行っているところである。今後、Chip アッセイなども行って、NIK 遺伝子発現に関わる転写因子を特定する予定である。

以上より、本研究によって、JAG1 や A20 が乳癌の新規治療標的になる可能性が示された。JAG1 は細胞外タンパク質であり、抗体医薬の開発が可能である。従って、今後は JAG1 と NOTCH 受容体の結合を阻害するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いて乳癌幹細胞を抑制できるかどうか検討する予定である。また、A20 は cIAP1 を抑制してNIK 安定化を導くことから A20 と cIAP1 の結合を抑制する低分子化合物はNIK-NF κ B 経路を抑制できると予想される。タンパク質間相互作用を抑制する低分子化合物開発は一般的には困難とされているが、Birecore など分子間相互作用解析装置を用いた開発も進められており、必ずしも不可能ではない。既に A20 と

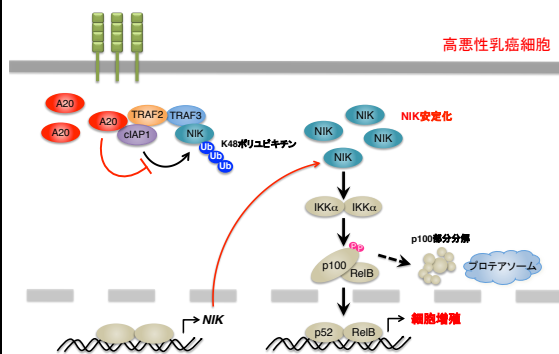


図2. A20によるcIAP1を介したNIK安定化

cIAP1 の大腸菌リコンビナントタンパク質作製系は構築しているため、今後はこれらを用いて A20 と cIAP1 の結合阻害薬についても開発を進めたいと考えている。

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 1 件)

(1) Noritaka Yamaguchi, Mami Yokota, Yuu Taguchi, Jin Gohda, and Jun-ichiro Inoue
cIAP1/2 negatively regulate RANKL-induced osteoclastogenesis through the inhibition of NFATc1 expression.
Genes to Cells 12, 971-981 (2012) 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12012.

[学会発表] (計 6 件)

(1) Noritaka Yamaguchi and Jun-ichiro Inoue
Identification of a novel function of an ubiquitin-editing enzyme A20 by a proteomic analysis
第 35 回日本分子生物学会年会 12/14/2012, 福岡

(2) Noritaka Yamaguchi and Jun-ichiro Inoue
TRAF6はRasによるトランスフォームに必須ではない
第 71 回日本癌学会学術総会 9/19/2012, 札幌

(3) Noritaka Yamaguchi and Jun-ichiro Inoue
Functional analysis of cIAPs in RANK signaling in osteoclast precursor cells
Keystone symposia, 3/21/2012, Whistler, Canada

(4) Noritaka Yamaguchi, Mami Yokota, Yuu Taguchi, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Jin Gohda, and Jun-ichiro Inoue
Functional analysis of cIAPs in RANK signaling in osteoclast precursor cells
第 34 回日本分子生物学会年会 12/5/2011, 横浜

(5) Noritaka Yamaguchi, Mami Yokota, Yuu Taguchi, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Jin Gohda, and Jun-ichiro Inoue

Functional analysis of cIAPs in RANK signaling in osteoclast precursor cells
The 8th China-Japan Joint Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction, 11/21/2011, Beijing, China

(6) Noritaka Yamaguchi, Yuu Taguchi, and Jun-ichiro Inoue
Functional analysis of cIAPs in RANK signaling in osteoclast precursor cells
第 70 回日本癌学会学術総会 10/4/2011, 名古屋

[その他]
ホームページ等
<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/maku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
山口 憲孝 (YAMAGUCHI NORITAKA)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 80399469

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: