

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893022

研究課題名(和文) 乳癌におけるダイオキシン受容体を介した増殖および浸潤・転移抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) AhR signaling suppresses tumor progression and metastatic potential of breast cancer cells by inducing ubiquitin ligase CHIP.

研究代表者

日吉 裕美 (HIYOSHI, Hiromi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10406530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんの死亡原因のほとんどが転移であるが、転移を抑制する治療薬はまだない。本研究では、芳香族炭化水素受容体(AhR)を介した新規乳がん抑制メカニズムを解明することを目的として研究を行った。AhRにリガンド(YL-109)が結合すると、活性化されたAhRによりがん抑制因子であるCHIPの発現が増加することが明らかとなった。この発現誘導されたCHIPによって、乳がんの増殖や浸潤を抑制することが示唆された。また、YL-109による抗乳がん作用は、マウスモデルにおいても確認できた。今回の結果は、乳がんに対する新たな治療戦略を提示するものであり、新規治療薬の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer has poor survival and high recurrence rates for aggressive metastatic disease. There is no preferred agent for metastasis of breast cancer. In this study, I show that aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand, YL-109 has ability to inhibit breast cancer cell growth and invasiveness in vitro and in vivo. YL-109 increased the expression of carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP), which suppresses tumorigenic and metastatic potential of breast cancer cells. YL-109 induced CHIP transcription because of the recruitment of the AhR to upstream of CHIP gene in breast cancer cells. Consistently, the antitumor effects of YL-109 were depressed by CHIP or AhR knockdown in breast cancer cells. Taken together, my findings indicate that a novel agent YL-109 inhibits cell growth and metastatic potential by inducing CHIP expression through AhR signaling in breast cancer cells. It suggests that YL-109 is a potential candidate for breast cancer therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん AhR

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、日本人女性の乳がん罹患率は胃がんを超えて第一位であり、罹患率・死亡率ともに今後も上昇していくと予想されている。乳がんの死亡原因のほとんどが転移によるものであるが、乳がん治療薬として現在用いられている薬剤は、転移を抑制できない。また、薬剤耐性の出現も問題となり、新たな治療薬開発が望まれている。

(2) 近年、別名ダイオキシン受容体とも呼ばれる芳香族炭化水素受容体 (AhR) が乳がんの新たな治療ターゲットとして注目されている。しかしながら、AhR を介した乳がん細胞の増殖抑制メカニズムには不明な点もまだ多い。また、乳がん治療の問題となっている浸潤・転移に対する作用はほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、AhR により制御を受け、乳がんの増殖や浸潤・転移に対して抑制的に働く因子を同定することで、AhR を介した新規乳がん抑制メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) AhR が増殖および浸潤を抑制する乳がんタイプの特定；乳がんは、ホルモン受容体等の発現有無の組み合わせにより、タイプが分類されている。AhR はどのタイプの乳がんにも発現しているとされているが、増殖や浸潤を抑制し得るかはわからない。そこで、主要な分類であるエストロゲン受容体の有無によって、AhR を介した乳がん細胞の増殖および浸潤の抑制効果が異なるのかについて検討を行った。細胞増殖は MTT アッセイおよびコロニー形成アッセイ、細胞浸潤はマトリゲル浸潤アッセイにより評価した。また、AhR アンタゴニストとして  $\alpha$ -ナフトフラボン、AhR ノックダウンには AhR 特異的 siRNA を用いた。

(2) 乳がん細胞において AhR による抗増殖・抗浸潤作用を制御する因子の同定；研究代表者の所属する研究室では、乳がんの増殖および浸潤・転移を抑制するタンパク質として CHIP を見出した (Kajiro M. et al., *Nat. Cell Biol.* 2009)。AhR が乳がんの増殖および浸潤の両方を抑制し得ることから、AhR の抗乳がん作用に CHIP が寄与しているのではないかと考え、AhR リガンドによる CHIP 発現の変動を検討した。mRNA レベルはリアルタイム PCR 法を、タンパクレベルはウェスタンブロット法を用いて検討を行った。また、siRNA を用いた CHIP ノックダウンによって、AhR の抗乳がん作用にどのような影響が見られるのか検討を行った。

(3) 乳がん細胞における AhR による CHIP の発現制御機構の解明；AhR を介した CHIP

の増加が転写レベルによる制御かについて、転写活性化能、転写量、転写調節領域への AhR のリクルートの面から検討を行った。転写活性化能はルシフェラーゼアッセイ、転写量はリアルタイム PCR、CHIP 遺伝子転写調節領域への AhR のリクルートはクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を用いて検討を行った。

(4) 抗がん剤ターゲットとしての AhR の役割；in vitro における AhR の抗乳がん作用が、in vivo においても見られるかについて検討を行った。乳がん細胞をマウス皮下に移植する Xenograft モデルを用いて腫瘍増殖に対する効果を、乳がん細胞をマウス尾静脈より注入する肺転移モデルを用いて転移に対する効果を検討した。

(5) 乳がん患者における AhR の発現；乳がんにおける AhR 発現についての臨床データはほとんど発表されていない。そこで、データベースを用いて、乳がんにおける AhR の発現と様々な因子との相関関係について、検討した。乳がんの分類マーカーとして用いられているエストロゲン受容体 (ER) や HER2 の発現および乳がんの悪性度と、AhR の発現が相関しているかについて、Oncomine データベースを用いて調べた。また、乳がん患者の生存率や予後と AhR の発現パターンに相関が見られるかについて、Prognoscan データベースを用いて解析した。

### 4. 研究成果

(1) ER の発現している乳がん細胞株 MCF-7 と発現していない乳がん細胞株 MDA-MB-231 における AhR の発現を検討したところ、両細胞株ともに AhR の発現が確認された。次に、AhR アゴニストとしてすでに報告されている 2-(4-aminophenyl)-benzothiazole 体の類似体である 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-benzothiazole (YL-109) を用いて、乳がん細胞に対する AhR の作用を検討した。YL-109 は、乳がん細胞の細胞増殖ならびに浸潤を抑制し、この抑制は AhR アンタゴニスト共存下や siRNA を用いた AhR 発現ノックダウンにより抑制された。以上の結果から、乳がん細胞では ER 発現の有無に関わらず、AhR を介した抗乳がん作用が認められることが示唆された。

(2) AhR リガンドである YL-109 は乳がん細胞において CHIP の発現量を mRNA レベル、タンパクレベルともに増加させた。この増加は AhR ノックダウンにより抑制された。このことから、CHIP の発現は AhR を介して制御されていることが示唆された。また、CHIP ノックダウンにより、YL-109 の抗乳がん作用が認められなくなった。以上の結果から、YL-109 の抗乳がん作用は AhR シグナルにより発現誘導された CHIP を介している可

能性が示唆された。

(3) YL-109 は乳がん細胞において、CHIP 遺伝子の転写活性を上げ、転写量の増加を引き起こした。また、CHIP 遺伝子上流には AhR が結合するとされているコア配列が存在することを見出し、YL-109 刺激によってその領域に AhR がリクルートされることを示した。これらの結果から、乳がん細胞において AhR が転写レベルで CHIP の発現を調節していることが示唆された。

(4) 腫瘍増殖に対して YL-109 は抑制効果を示した。また、肺転移に対しても YL-109 は抑制効果を示した。これらの結果から、YL-109 は in vivo においても抗乳がん作用を発揮することが示唆された。

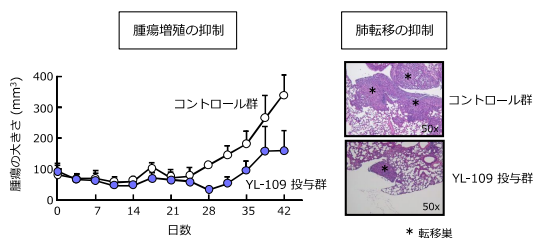


図1. AhR リガンドによる抗乳がん作用

(5) Oncomine データベースを用いた解析を行ったところ、乳がんの悪性度が高いと AhR の発現が低いという解析結果が得られた。しかしながら、乳がんにおける AhR の発現と ER または HER2 との発現の間に相関は認められなかった。また、Prognoscan データベースより、AhR の発現が高いほど生存率が高く、予後が良好であるという解析結果も得られた。

本研究では、リガンドが結合することによって活性化された AhR が、がん抑制因子である CHIP の発現を増加させることにより、乳がんの増殖や浸潤・転移を抑制することが示唆された。AhR が抗乳がん活性、その中でも死亡の主要原因である浸潤・転移の抑制に重要な役割を持つ可能性を提示できたことの意義は大きいと考える。これは、乳がんに対する新たな治療戦略を提示するものであり、新規治療薬の開発に貢献することが期待される。

本研究結果は、Scientific Reports 誌に発表した (Hiyoshi H. et al. 2-(4-Hydroxy-3-methoxyphen-yl)-benzothiazole suppresses tumor progression and metastatic potential of breast cancer cells by inducing ubiquitin ligase CHIP. *Sci. Rep.* 4: 7095 (2014) )

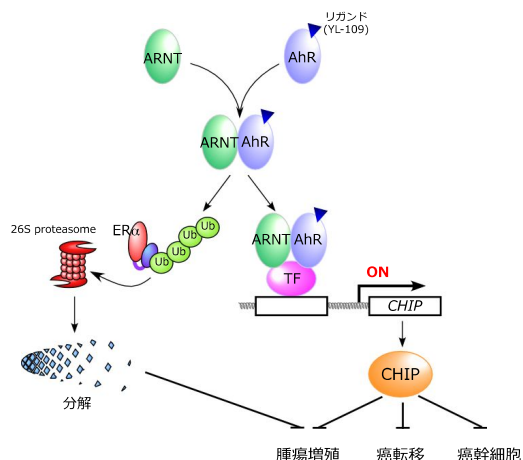


図2. AhR-CHIP を介した抗乳がん作用メカニズム

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Tsuchiya M, Nakajima Y, Waku T, Hiyoshi H, Morishita T, Furumai R, Hayashi Y, Kishimoto H, Kimura K, Yanagisawa J. CHIP buffers heterogeneous Bcl-2 expression levels to prevent augmentation of anticancer drug-resistant cell population. *Oncogene*. 査読あり、in press. doi: 10.1038/onc.2014.387.

Hiyoshi H, Goto N, Tsuchiya M, Iida K, Nakajima Y, Hirata N, Kanda Y, Nagasawa K, Yanagisawa J. 2-(4-Hydroxy-3-methoxyphen-yl)-benzothiazole suppresses tumor progression and metastatic potential of breast cancer cells by inducing ubiquitin ligase CHIP. *Sci. Rep.* 査読あり、4: 7095 (2014) doi: 10.1038/srep07095.

Oie S, Matsuzaki K, Yokoyama W, Tokunaga S, Waku T, Han SI, Iwasaki N, Mikogai A, Yasuzawa-Tanaka K, Kishimoto H, Hiyoshi H, Nakajima Y, Araki T, Kimura K, Yanagisawa J, Murayama A. *Cell Rep.* 査読あり、7: 807-820 (2014) doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.038.

Goto N, Hiyoshi H, Ito I, Iida K, Nakajima Y, Nagasawa K, Yanagisawa J. Identification of a Novel Compound That Suppresses Breast Cancer Invasiveness by Inhibiting Transforming Growth Factor-Signaling via Estrogen Receptor. *J. Cancer*. 査読あり、5: 335-343 (2014) doi: 10.7150/jca.7202.

Hiyoshi H, Johnsen JI, Andäng M, Uhlén

P. Reply: Comment on 'Quiescence and yH2AX in neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase': ouabain and cancer. Br. J. Cancer. 査読なし、108: 2191 (2013) doi: 10.1038/bjc.2013.235.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日吉 裕美 (HIYOSHI, Hiromi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10406530