

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860212

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌での核内PAG1のプロテアソーム非依存的増殖制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of proteasome-independent nuclear-PAG1 on the growth of triple negative breast cancers

研究代表者

小松 正人 (KOMATSU, Masato)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・助教

研究者番号：50531753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳癌(以下TNBC)は高悪性度乳癌の一つであるが、いまだ詳細な増殖機構は未知の部分が多い。遺伝子発現解析や免疫組織学的解析により、核内にPAG1(プロテアソーム構成分子のひとつ)という分子が高発現するTNBC症例の生命予後が不良であったことより、核内PAG1の機能について探索を行った。核内PAG1に結合しうる分子を解析したところ、PARP1が核内PAG1に結合しうることを見出した。PARP1はDNA複製に關与する分子で、PARP阻害剤は乳癌治療に臨床応用されつつある。従って、PARP1に対し核内PAG1が結合することで、PARP阻害剤の感受性を変化させる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Triple negative breast cancers (TNBC) is one of the most aggressive subtype of breast cancers, and little is known about tumor aggressiveness. Based on the evidence through gene expression and immunohistochemical analyses that prognosis of TNBC patients with higher nuclear-PAG1 expression was worse than that with lower nuclear-PAG1 expression, we focused on the role of nuclear-PAG1 on the aggressiveness of TNBC. Then, we revealed that PARP1 might interact with nuclear-PAG1 through high-throughput proteomics analyses, 2DICAL. PARP1 is considered to be involved in DNA repair, and PARP inhibitors are currently approved to clinical setting for treatment of breast cancers including TNBC and ovarian cancers. Therefore, the interaction of nuclear-PAG1 and PARP1 might lead to alteration of the sensitivity of PARP1 inhibitors in breast cancer cells.

研究分野：がん分子生物学、病理学

キーワード：TNBC 核内PAG1 PARP1

1. 研究開始当初の背景

- (1) 乳癌のサブタイプのうち、ホルモンレセプターと HER2 の発現を欠くトリプルネガティブ乳癌(TNBC)は極めて悪性度が高いサブタイプであり、増殖機構も未知な部分が多く有効な分子標的治療薬が存在しないなど問題が山積している。
- (2) TNBC の遺伝子発現情報やパスウェイ解析から各種プロテアソーム構成因子が TNBC で高発現し、細胞周期など種々の増殖に必須なパスウェイに参与していることが明らかとなった。
- (3) TNBC で高発現しているプロテアソーム構成因子のうち、PAG1 という分子が核内に高発現している症例の予後が不良であることを見出した(図 1)。

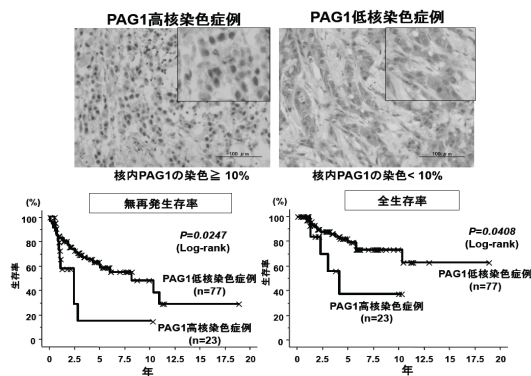


図1. PAG1の免疫組織染色

- (4)核内 PAG1 の機能を探索することが、TNBC の治療標的の創出に繋がる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

- (1) 核内 PAG1 との結合タンパクの同定
- (2) 結合タンパクの機能から類推される PAG1 の機能を解明する
- (3) PAG1 の機能阻害した場合のがん細胞に与える影響を検討する。
- (4) PAG1 高発現のメカニズムの解明

3. 研究の方法

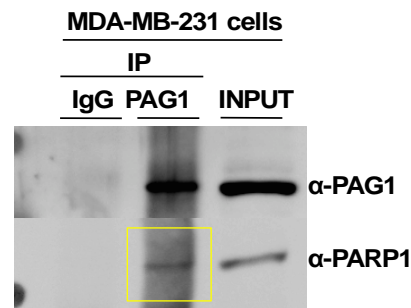
- (1) PAG1 発現 TNBC 細胞の核抽出物抗 PAG1 抗体を用いた免疫沈降を行い、免疫沈降産物をトリプシン消化する。2DICAL 法を用いて消化産物のアミノ酸配列をしらべ、PAG1 結合蛋白のリスト化を行った。
- (2) (1)で挙げた核 PAG1 と結合する可能性のある核内蛋白について、免疫沈降法およびウエスタンブロット法を用いて結合の有無を評価した。
- (3) 結合が確認された場合、その結合が細胞の増殖にどのような影響を与えているかについて検討を行い、結合を阻害した場合の影響について探索を行う。具体的には、結合配列を数アミノ酸長まで絞りこみ、そのアミノ酸配列を用いたドミナントネガティブペプチドを作成し、ペプチド添加時に細胞にどの

ような影響を与えるのかを検討する。

- (4) PAG1 高発現のメカニズムについては、TNBC で高発現している転写因子 E2F1 による正の転写制御に着眼し、レポーターアッセイと ChIP assay(クロマチン免疫沈降法)で検討を行った。

4. 研究成果

- (1) MDA-MB-231 細胞の核抽出物と抗 PAG1 抗体を用いた免疫沈降産物、およびショットガンプロテオミクス解析(2DICAL 法)により、内在性核内 PAG1 と結合する分子がいくつか同定され、その中でも PARP1 に着目した。PARP1 は DNA 傷害時の DNA 修復に関連する酵素で、現在 PARP1 阻害剤は乳癌や卵巣癌の治療に臨床応用されつつあり、いくつかの臨床試験も進行している。PAG1 が PARP1 に結合することが、PARP1 の機能修飾を行っている仮説を立てた。
- (2) プロテオミクス解析で可能性が示唆された PARP1 と PAG1 の結合については、免疫沈降法およびウエスタンブロット法で、実際に細胞内での結合が確認された(図 2)



IP : immunoprecipitation

図2. PAG1とPARP1との結合

次に、この結合を阻害した場合に与える影響について検討を行うために、PARP1-PAG1 の結合領域を調べることにした。PARP1 と PAG1 の結合について、PAG1 の HA-タグ付き欠損変異体コンストラクトを作成し、HEK293T 細胞に遺伝子導入を行った後に、免疫沈降およびウエスタンブロットで検討を行ったが、ペプチド作成に必要なアミノ酸長まで結合配列を絞り込むことは困難であった。今後は PARP1 の欠損変異体を作成し、PARP1 の結合領域を探索し、PARP1 のドミナントネガティブペプチドを樹立予定である。

- (3) PARP1 は DNA 修復に関与する酵素であるので、RNA 干渉法を用いた PAG1 の発現抑制時において、DNA 障害性薬剤(アドリアマイシン)に対し、がん細胞の感受性の変化が生じるか検討を行った。TNBC 株である BT-549, MDA-MB-231 細胞では、PAG1 発現抑制時に若干アドリアマイシンに対する感受性低下はみられるものの、いずれも有意な感受性変化はなかった。しかし、PARP1 は近年 DNA 修復のみならず、ヒストン修飾などのエピジェネティックな方面に作用する

機能も有していることが明らかとなり、こういった方面に、PAG1-PARP1 の結合がどのように関わっているか探索を深めることは非常に意義深いことと思われる。また、PARP 阻害剤耐性・不応性も近年問題となっており、TNBC において PARP 阻害剤不応性において PAG1 がどのような働きを担うのかも注目値する。

(4) PAG1 が高発現する機序については、a) PAG1 が細胞周期依存的に、G1/S 期を極期に発現上昇すること、b) 網羅的遺伝子発現情報解析(Komatsu et al, 2013; 42(2):478-506)から転写因子 E2F1 が TNBC で強く発現していること、c) また PAG1 の 5'-プロモーター領域に E2F1 の結合モチーフが保存されることより、E2F1 による正の転写制御の可能性が考えられた。実際にヒト胎児腎線維芽細胞 HEK293T 細胞に E2F1 を過剰発現させると PAG1 の発現は 3 倍程度有意に上昇し(図 3)、siRNA で E2F1 をノックダウンすると PAG1 の発現も低下した。レポーターアッセイでも E2F1 導入時に強く転写活性が上昇することが明らかとなった(図 4)

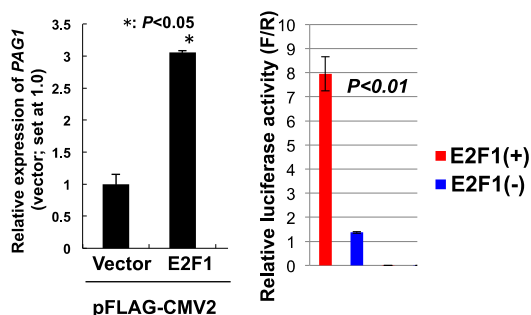


図3 (リアルタイム-PCR) 図4 (レポーターアッセイ)

また、BT-549 細胞と MDA-MB-231 細胞を用いた ChIP-assay から、E2F1 は直接 PAG1 のプロモーター領域(2 箇所)に結合することもわかり、E2F1 により PAG1 が正の転写調節を受けることが明らかとなった(図 5)。

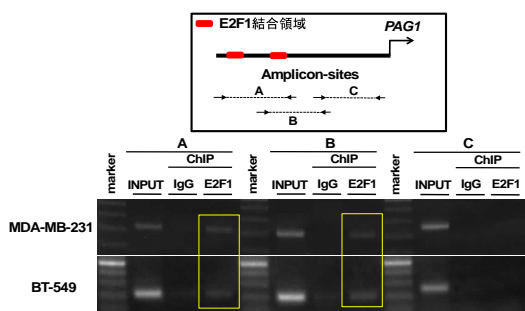


図5. PAG1プロモーター領域に対する抗E2F1抗体を用いたクロマチン免疫沈降法

最終的に、乳癌大規模発現データベース(RNA シーケンス解析(TCGA)とマイクロアレイ解析(GSE2034))を用いて、E2F1 と PAG1 の発現をしらべたところ、実験結果を裏付けるように E2F1 と PAG1 の発現には若干相関係数は低いものの、有意な正の相関がみられた(図 6)。

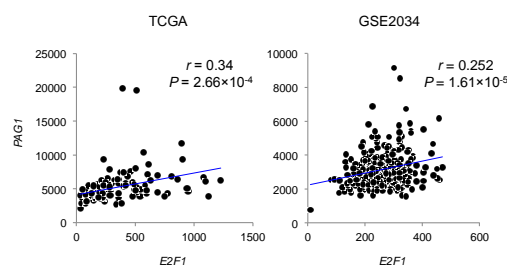


図6. E2F1とPAG1の発現量の相関

以上より、TNBC で細胞周期依存的に転写因子 E2F1 によって発現誘導される PAG1 は、核内で TNBC の高悪性度・予後不良形質の獲得に寄与する可能性があり、核内 PAG1 の機能としては、PARP1 との結合によりもたらされる可能性がある。PAG1-PARP1 の結合の意義としては、既知の DNA 修復制御機構というよりは、エピジェネティック修飾の制御などによる可能性も考えられた。

TNBC の治療への応用に関しては、PAG1-PARP1 の結合を小分子化合物などで阻害することが可能になれば、予後改善に繋がる可能性があると思われた。

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 5 件)

金南希、吉丸哲郎、Chen YA、松尾泰佑、小松正人、三好康雄、田中栄二、笹三徳、水口賢司、片桐豊雅

乳癌細胞において BIG3 は多様なカリオフェリンを介した PHB2 の核内移行を阻害する。PLoS ONE.2015;10(6):e0127707 (査読あり)

吉丸哲郎、小松正人、三好康雄、本田純子、笹三徳、片桐豊雅

乳癌におけるエストロゲンや増殖因子シグナルのクロストークをターゲットとした BIG3-PHB2 阻害による治療の有用性

Cancer Science, 2015;106(5):550-8 (査読あり)

吉丸哲郎、小松正人、田代悦、井本正哉、長田裕之、三好康雄、本田純子、笹三徳、片桐豊雅

キサントフォームは乳癌細胞において BIG3-PHB2 の結合阻害によりエストロゲンシグナルを抑制する

Scientific Report, 2014;4:7355 (査読あり)

松尾泰佑、Dat Le T, 小松正人、吉丸哲郎、大豆本圭、曽根三郎、西岡安彦、片桐豊雅

EGR4(early-growth response 4) は下流遺伝子の転写活性により肺小細胞肺癌の増殖に關与する。

PLoS ONE, 2014;9(11):e113606(査読あり)

齋藤裕、森大樹、高須千絵、小松正人、花岡潤、山田眞一郎、浅野間理仁、池本哲也、居村曉、森根裕二、宇都宮徹、島田光生
ラット大量肝切除時における緑茶カテキンの有用性
Journal of Gastroenterology, 2014;49(4):692-701(査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

小松正人、トリプルネガティブ乳癌における新規腫瘍抑制因子 zing finger protein-X (ZNF-X) の不活化機構の解明、2015.6.11、第19回がん分子標的治療学会、松山全日空ホテル(愛媛県松山市)

小松正人、Role of nuclear-19S proteasome associated gene 1 (PAG1) in aggressiveness of triple negative breast cancers、2014.9.27、第73回癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小松正人、トリプルネガティブ乳癌におけるプロテアソーム構成因子のプロテアソーム活性非依存的な役割、2014.6.26、第18回がん分子標的治療学会、TKP ガーデンシティ仙台(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 正人 (KOMATSU, Masato)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・助教

研究者番号：50531753