

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komatsu M, Yoshimaru T, Matsuo T, Kiyotani, K, Miyoshi Y, Tanahashi T, Rokutan K, Yamaguchi R, Saito A, Miyano S, Nakamura Y, Sasa M, Shimada M, Katagiri T. Molecular features of triple negative breast cancers by genome-wide gene expression profiling analysis. *Int J Oncol*. 2013, 42:478-506.
- 2) Elgazzar S, Zembutsu H, Takahashi A, Kubo M, Aki F, Hirata K, Takatsuka Y, Okazaki M, Ohsumi S, Yamakawa T, Sasa M, Katagiri T, Miki Y, Nakamura Y. A genome-wide association study identifies a genetic variant in the SIAH2 locus associated with hormonal receptor-positive breast cancer in Japanese. *J Hum Genet*. 2012, 56:766-71.
- 3) Murase K, Yanai A, Saito M, Imamura M, Miyagawa Y, Takatsuka Y, Inoue N, Ito T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Fujimoto Y, Hatada T, Ichii S, Nishizaki T, Tomita N, Miyoshi Y. Biological characteristics of luminal subtypes in pre- and postmenopausal estrogen receptor - positive and HER2-negative breast cancers. *Breast Cancer*. 2013 in press.

2. 学会発表

- 1) Katagiri T, Yoshimaru T, Komatsu

M, Matsuo T, Nakamura Y, Miyoshi Y, Sasa M: Regulation of estrogen-signaling in ER-positive breast cancer by tumor suppressor REA via ERAP1. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 2012.11.12-15, Kanazawa, JAPAN

- 2) 片桐豊雅、吉丸哲郎、松尾泰佑、中村祐輔、三好康雄、笹三徳: New insight into developing treatment strategies for breast cancer 第71回日本癌学会総会(シンポジウム) 2012.9.19-21.札幌
- 3) 松尾泰佑、尾野雅哉、吉丸哲郎、三好康雄、笹三徳、中村祐輔、片桐豊雅、: Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a novel glycosyltransferase BCGT1 in breast cancer. 第71回日本癌学会総会(ポスター) 2012.9.19-21.札幌
- 4) 吉丸哲郎、小松正人、松尾泰佑、三好康雄、笹三徳、中村祐輔、片桐豊雅、: ERAP1 constitutively activates estrogen-signaling in ER-positive breast cancer by capturing intact tumor suppressor REA. 第71回日本癌学会総会(口演) 2012.9.19-21.札幌
- 5) 小松正人、吉丸哲郎、松尾泰佑、清谷一馬、三好康雄、島田光生、中村祐輔、笹三徳、片桐豊雅: Involvement of proteasome-associated gene 1(PAG1) in proliferation of triple negative breast cancer. 第71回日本癌学会総会(口演) 2012.9.19-21.札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

DNA 修復経路における合成致死解析

研究分担者 太田 智彦 聖マリアンナ医科大学 応用分子腫瘍学 教授

研究要旨

乳癌の DNA 修復機構の異常と化学療法感受性の関係を解析した。その結果、BRCA1 のユビキチンリガーゼ死活変異を有する家族性乳癌および PLK1 過剰発現をきたす散発性乳癌に CPT-11 と PARP 阻害剤が奏功すること、BRCA1 と RNF8 のプロモーターメチル化が化学療法感受性のバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では既存の治療に抵抗性の予後不良乳癌に対してDNA損傷修復経路における合成致死を応用した治療法の開発に取り組む。

Basal-like乳癌の原因としてBRCA1機能不全が重要だが、BRCA2変異による家族性乳癌の多くがLuminal A型を発症することから、Luminal 乳癌にもDNA相同組換え修復不全に起因する化学療法感受性癌が含まれると考えられる。PARP 阻害剤がBRCA1/2変異乳癌に著効を示すことからDNA修復経路の補完し合う2因子の機能不全による合成致死性が注目されている。DNA修復には理論的に合成致死を来す組み合わせが多数存在すると考えられ、本研究ではDNA損傷性薬剤に対してそれを補完する因子の機能不全を同定し、治療に応用する。

B. 研究方法

BARD1との結合および蛋白質の安定性を維持したままE3活性だけを死活させる変異体であるV26A変異を導入したBRCA1をノックインしたDT40細胞にCPT-11, PARP阻害剤およびマイトマイシンCを加え、細胞の感受性を解析した。またこの際のDNA相同組換え能をSister Chromatid Exchange (SCE)法、Chk1のリン酸化とClaspinのユビキチン化およびクロマチンへの誘導をウェスタンブロットにて解析した。

PLK1によるBRCA1のE3活性の阻害はin vivoにおけるBRCA1の自己ユビキチン化を指標としてPLK1の一過性過剰発現およびPLK1阻害剤の効果で解析した。20種類の細胞株のPLK1発現をウェスタンブロットにて解析し、PLK1高発現および低発現群に分け、CPT-11, PARP阻害剤、マイトマイシン

ンCおよびシスプラチンに対する感受性をIC50にて解析した。代表的な細胞を選び、ヌードマウスの皮下腫瘍を作成し、*in vivo*における感受性の解析を行った。PLK1高発現細胞においてはshRNAによる発現抑制、PLK1低発現細胞においてはトランスフェクションによるPLK1一過性過剰発現が化学療法剤の感受性に与える影響を解析した。

プロモーターメチル化解析では過去に術前化学療法を行った原発性乳癌症例の治療前針生検検体のパラフィン包埋ホルマリン固定切片よりマイクロダイセクション法にて乳癌部分を取り出し、DNAを抽出し、bisulfite処理した後、培養細胞株20種類を用いた予備実験にて有効性が確認されたプライマーを用いて上記16の相同組換え遺伝子のプロモーター領域のpyrosequencingを行った。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は、本学動物実験委員会の承認を得て行い、日本学術会議の「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して遂行する。臨床検体を用いた研究、臨床試験については本学生命倫理委員会にて、社会的コンセンサス、個人情報取り扱い、安全対策に対する取り組みなど施設の規準を遵守した研究実施に関して十分に審議を受け承認された上で行う。利益相反状態にある研究者がいた場合にはこれを開示する。

#### C. 研究結果

乳癌のDNA修復経路における合成致死性を生じる薬剤と遺伝子の組合せの解析を進めた。その結果、BRCA1のユビキチンリガーゼ (E3) 活性はDNA鎖間架橋形成の修復には必要ないが、トポイソメラーゼ阻害剤CPT-11とPARP阻害剤に起因するDNA損傷の修復には必要であることが明らかとなった。その分子生物学的な機序としてCPT-11やPARP阻害剤に起因するDNA損傷特異的にBRCA1がClaspinをポリユビキチン化してクロマチンへ誘導することがATRによるChk1のリン酸化と相同組換え修復に必須であることを解明した。さらに、PLK1がBRCA1のE3活性を抑制し、PLK1過剰発現がん細胞がCPT-11とPARP阻害剤に高感受性であるが、DNA鎖間架橋形成剤であるマイトマイシンCやシスプラチンに対しては感受性が低いことを明らかにした。

一方、原発性乳癌60例について相同組換え修復遺伝子BRCA1, BRCA2, BARD1, MDC1, RNF8, RNF168, UBC13, ABRA1, PALB2, RAD50, RAD51, RAD51C, MRE11, NBS1, CtIP およびATMのプロモーターメチル化をbisulfite-pyrosequence法にて定量的に解析した結果、BRCA1とRNF8のメチル化はトリプルネガティブ (TN) 乳癌に有意に高頻度に起こり、また、BRCA1のメチル化はアントラサイクリン系薬剤とドセタキセルを用いた術前化学療法にて病理学的完全寛解をきたすTN乳癌で高い傾向を示した。逆にRNF8のメチル化はTN乳癌で有意に

低頻度であった。

#### D. 考察

家族性乳癌あるいは卵巣癌をきたすBRCA1変異の中には蛋白質の安定性を保持したままE3活性を失う変異があり、また散発性乳癌の中にもBRCA1のE3活性が低下したものがあると考えられる。本研究結果からこのような癌にはCPT-11とPARP阻害剤が奏功する可能性があり、感受性のバイオマーカーとして有用である。さらに、PLK1は乳癌、卵巣癌に限らず、消化器癌を含む多くの癌で過剰発現しており、すでに臨床でも予後不良のマーカーとして応用されているが、本研究結果から、PLK1は予後不良だけではなく、CPT-11およびPARP阻害剤に対する感受性のバイオマーカーになり得ることが示唆され、薬剤選択の上で臨床的に重要な役割を果たす可能性をもつ。

一方、プロモーターメチル化解析の結果からBRCA1およびRNF8のメチル化がTN乳癌において化学療法感受性のバイオマーカーになり得ることが示唆された。

#### E. 結論

BRCA1のE3活性はCPT-11とPARP阻害剤を含む、特定の化学療法剤の感受性バイオマーカーとなる。臨床応用としてはE3活性死変異を持つ家族性乳癌および卵巣癌、PLK1過剰発現をきたす散発性乳癌および卵巣癌、消化器癌での上記化学療法剤適応の判断材料となり得る。また、BRCA1とRNF8の

プロモーターメチル化はアントラサイクリン系薬剤およびドセタキセルを含む化学療法を行う際のバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman AR. A DNA-Damage Selective Role for BRCA1 E3 Ligase in Claspin Ubiquitylation, CHK1 Activation, and DNA Repair. *Curr Biol*. 22:1659-66, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) 太田智彦. 第71回日本癌学会学術総会：シンポジウム「DNA replication and checkpoint regulated by HERC2 and BRCA1 E3 ubiquitin ligases」2012年9月
- 2) Ohta T. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer：シンポジウム「Agent-specific cellular chemosensitivity attributed to loss of BRCA1 E3 ligase activity」2012年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## DNA 損傷修復の新たな薬剤標的の研究

研究分担者 中田 慎一郎 大阪大学医学系研究科 独立准教授

### 研究要旨

PARP1 阻害剤による DNA 損傷は、相同組換え修復に異常を持つ BRCA1 あるいは BRCA2 変異乳癌細胞に合成致死を引き起こす。しかし、BRCA1 変異-53BP1 発現低下を示す細胞では、相同組換え修復が回復するため合成致死が起こらず、治療抵抗性となる。本研究では、このような細胞における相同組換え修復が E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 に依存していること、さらにその分子機構を明らかとした。本研究成果は、難治性乳癌治療において RNF8 が新たな分子標的として挙げられることを示した。

### A. 研究目的

癌細胞に多くのDNA損傷を発生させると、癌細胞を効率よく死滅させることができる。事実、現在利用されている抗腫瘍薬の多くにはDNA損傷が作用機序として含まれている。しかし、DNA障害性薬剤を用いた治療では正常細胞にもDNA損傷が生じるため副作用が問題になってきた。

DNA修復機構は相補的に働くため、1つのDNA修復系に異常が生じても致死とはならない。しかし、相補的に働くDNA修復経路にも異常が生じると、DNAの修復ができず、細胞死が誘導される。このような現象は合成致死性と呼ばれている。PARP1が必須となるDNA修復系を阻害剤により抑制すると、DNA損傷は相同組換え修復経路により修復される。しかし、相同組換え修復に異常を持つ癌細胞、たとえばBRCA1や

BRCA2に変異を持つ乳癌細胞ではDNA損傷が修復されず、細胞は死滅する。BRCA1やBRCA2が変異、もしくは発現低下し乳癌は既存の方法では治療成績が悪く、PARP1阻害による治療は非常に期待されている。また、癌以外の細胞では相同組換え修復が保たれ、PARP1阻害剤抵抗性となることから、PARP1を用いた乳癌治療は副作用の少ない治療法としても期待されている。ところが、BRCA1が変異していたとしてもDNA損傷応答関連分子53BP1の発現が低下するとBRCA1非依存性の相同組換え修復が機能するため、このような細胞ではPARP1阻害剤による合成致死が起こらなくなってしまう。また、53BP1の発現が低下している乳癌細胞は治療成績が悪いことが示されている。

このことから、このような乳癌細胞に対

する新たな治療ストラテジーの開発が必要と考えられる。また、相同組換え修復に異常がない癌細胞であったとしても、相同組換え修復機能を抑制する方法が発見できれば、合成致死性を利用した癌治療が可能となると考えられる。

そこで、本研究では、BRCA1と53BP1の発現が低下した細胞において相同組換え修復を制御する分子を同定するとともに、BRCA1が発現した細胞において相同組換え修復を制御する新たな分子を発見し、これらの分子機構を解明するための実験を行った。

## B. 研究方法

本研究では、分子機構の解明が目的であるため、臨床サンプルを用いるのではなく、培養細胞を用いて研究を行った。また、対照コントロールを設定しやすくするため、BRCA1変異株ではなく、RNAi干渉法（siRNAを用いた）によりBRCA1発現が正常な細胞株におけるBRCA1の発現を低下させることで、BRCA1陰性乳癌細胞のモデルとした。これまでの研究において、siRNAを用いてBRCA1と53BP1を同時ノックダウンした場合、相同組換え修復に至るシグナリングおよび相同組換え修復が正常に起こることを確認していた。そこで、53BP1とBRCA1を同時ノックダウンした細胞を難治性乳癌のモデルとした。また、この難治性乳癌モデルにおいて、DNA損傷部位においてユビキチン化を行うE3ユビキチンリガーゼRNF8が相同組換えに至るシグナルに関わることを示すデータを得ていたため、BRCA1-53BP1-RNF8を同時ノックダウンすることで、相同組換え修復効率や相同組

換え修復に至るシグナリングに生じる影響について調べた。

相同組換え修復効率の解析にはdirect-repeat GFP assay法を採用し、フローサイトメトリーにより分析を行った。相同組換えに至るシグナリングについては、RPAおよびRAD51のDNA損傷部位への集積を蛍光免疫染色法により検出し、解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、セルラインを用いた研究であり、臨床検体、ヒトゲノム、動物を用いた研究は行っていない。そのため、本研究は、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究、生命倫理・安全対策に対する取組を必要とする研究など法令等に基づく手続きが必要な研究には該当しない。遺伝子組換え実験に関しては、大阪大学のガイドラインに従い行った。本研究では、すでに承認されている遺伝子組換え実験計画に合致する実験のみを行った。

## C. 研究結果

難治性乳癌モデルにおいて、RNF8をノックダウンするとRAD51のDNA損傷部位への集積は観察されなくなった。一方、RPAのDNA損傷部位への集積は観察された。相同組換え修復の過程では、まずDNA二本鎖切断端でend resectionがおり、形成された一本鎖DNAにRPAが結合し、次にRPAにRAD51が置き換わる。このことから、難治性乳癌モデルにおいてRNF8はDNA end resectionを制御せず、RPA-RAD51の置換の過程を制御していることが示された、一方、対照コントロール細胞からRNF8をノ



ックダウンした場合、RAD51のDNA損傷部位への集積は阻害されなかった。

上記の結果を基に、難治性乳癌モデルにおけるRNF8の機能解析を行った。難治性乳癌モデルからRNF8をノックダウンした細胞に、siRNA抵抗性のRNF8を外来性に発現させると、RAD51のDNA損傷部位への集積は回復した。RNF8のE3ユビキチンリガーゼ活性を失った変異体を発現させた場合にはRAD51のDNA損傷部位への局在は回復しなかった。このことから、RNF8のユビキチン活性が難治性乳癌モデルにおける相同組換え修復シグナルの伝達に必要であることが示された。

難治性乳癌モデルでは、相同組換え修復はコントロール細胞と同等の効率で起こっていたが、RNF8をノックダウンした場合、相同組換え修復は抑制された。

BRCA1が存在する細胞において、DNA損傷依存性クロマチンユビキチン化に関連する新規分子をノックダウンしたところ、相同組換えに至るシグナルおよび相同組換え修復が抑制された。

#### D. 考察

正常細胞モデルでは、RNF8ノックダウンによる相同組換え修復シグナルに影響は生じないにもかかわらず、難治性乳癌モデルではRNF8ノックダウンにより相同組換え修復が抑制された。また、難治性乳癌モデルにおいて相同組換え修復の制御にRNF8の酵素活性が関わっていることが示されたことから、RNF8は難治性乳癌において合成致死を誘導するための魅力的な分子標的であると考えられる。

新たに見いだしたDNA損傷分子は

BRCA1が存在する細胞においてノックダウンすると、相同組換え修復を抑制できることから、様々な細胞において合成致死性を誘導するための分子標的となる可能性が示された。

#### E. 結論

本研究により、合成致死性を根拠とした新たな乳癌治療ストラテジーの開発に向けた分子生物学的根拠の一部が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakada S, Yonamine RM, Matsuo K. RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Res.* 2012 ;72:4974-83.

##### 2. 学会発表

- 1) Shinichiro Nakada RNF8 regulates BRCA1-independent RAD51 assembly at sites of DNA double-strand breaks. 第35回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
- 2) 中田慎一郎 RNF8によるBRCA1非依存性相同組換え制御日本放射線影響学会 第55回大会 (招待講演)
- 3) Shinichiro Nakada. Complex regulation of homologous recombination by E3 ligases. AACR/JCA Joint Conference (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

ホルモン療法耐性乳癌の機序解明とその克服の研究

研究分担者 林 慎一 東北大学大学院医学系研究科 分子機能解析学分野 教授

研究要旨

エストロゲン応答性 GFP を安定導入した Luminal 型乳癌培養細胞株(MCF-7-E10,T47D-TE8)を親株として GFP を指標に合計 5 種類(Type 1~Type 5)の機序の異なるホルモン療法耐性（アロマトーゼ阻害剤耐性）細胞株を樹立した。さらにこれらの耐性株を用いて順次その耐性機序について解析を進めた。特に Type 4 についてはこれまでに報告されていないステロイド代謝経路変化(3 $\beta$ HSD1 の発現上昇)とステロイド感受性の変化(アンドロゲン受容体の低下)とを原因とする新規の機序であることを見出した。さらにこのような機序の乳癌症例が実際に存在することも再発乳癌臨床検体を用いて確認した。また、ER 陽性乳癌が化学療法に耐性であることについて、ER 活性がタキサン効果の減弱させることを *in vivo*, *in vitro* の両面から明らかにした。また、ホルモン療法剤の代表であるタモキシフェンに対する耐性株において癌幹細胞性(spheroid 形成能、癌幹細胞関連遺伝子発現)が高まっていることを見出した。

A. 研究目的

Luminal 型 (ER 陽性) 乳癌や Her2 乳癌は、それぞれアロマトーゼ阻害薬を中心としたホルモン療法やトラスツズマブ治療が比較的良く奏効することが知られているが、不応症例も多く、また進行・再発症例においてはやがて耐性が生じ、その予後は極めて悪く難治性である。ホルモン療法耐性、トラスツズマブ治療耐性の機序は詳細には明らかとなっておらず、そのため 2 次治療の戦略も定まっていない。我々は個々の乳癌臨床検体のエストロゲンシグナル経

路の解析や耐性機序の異なった複数のアロマトーゼ阻害剤耐性細胞の樹立を行った。これらの手法や試料を用いて、癌微小環境も含めた複雑なエストロゲンシグナル経路の存在を明らかにし、これまで報告されていない新たな耐性機序が存在することを見出しつつある。また耐性と癌幹細胞性との関係や Luminal 型と Her2 型のサブタイプ間の可塑性も見出した。そこで、耐性克服の新たな治療法開発のみならず、Luminal 型、Her2 型の乳癌に共通の根本的治療の可能性も存在すると考えている。

そこで、乳癌再発症例の臨床検体を用いたエストロゲンシグナル経路の解析のデータを蓄積するとともに、考えられるすべての仮説を模倣する複数のアロマターゼ阻害剤耐性株を樹立して、それらの細胞内シグナル経路の解析等により耐性機序を詳細に明らかにする。また、乳癌臨床検体からの癌幹細胞の単離・培養とエストロゲンシグナル経路の解析を試みる。そして各々のメカニズムに対応した耐性機序克服の戦略を構築するとともに耐性機序識別の診断法を確立する。乳癌幹細胞性とLuminal型、Her2型サブタイプとの分子レベルでの関係を解明し、背景にある耐性獲得時の可塑性の機序の解明とその操作を試みる。

## B. 研究方法

1. ホルモン療法治療（特にアロマターゼ阻害剤治療）後の乳癌進行・再発症例の臨床検体から調製した乳癌初代培養細胞にERE-GFP 導入アデノウイルスを感染させ、その蛍光を定量して ER の活性を解析し、また各種薬剤に対する感受性を同様の手法で評価し、実際に臨床で存在するホルモン療法耐性乳癌のエストロゲンシグナル経路を解析し、その機序を推察する。
2. このデータを参考にしながら、理論的に考えられる耐性機序のすべての仮説について、それら各々を模倣する複数のアロマターゼ阻害剤耐性モデル乳癌細胞株を樹立し、それらの細胞内のエストロゲンシグナル経路、リン酸化シグナル経路について詳細に解析し、耐性増殖の原因となっている理由を明らかにする。
3. 乳癌臨床検体からの癌幹細胞の単離・培養を試み、それらのエストロゲンシグナ

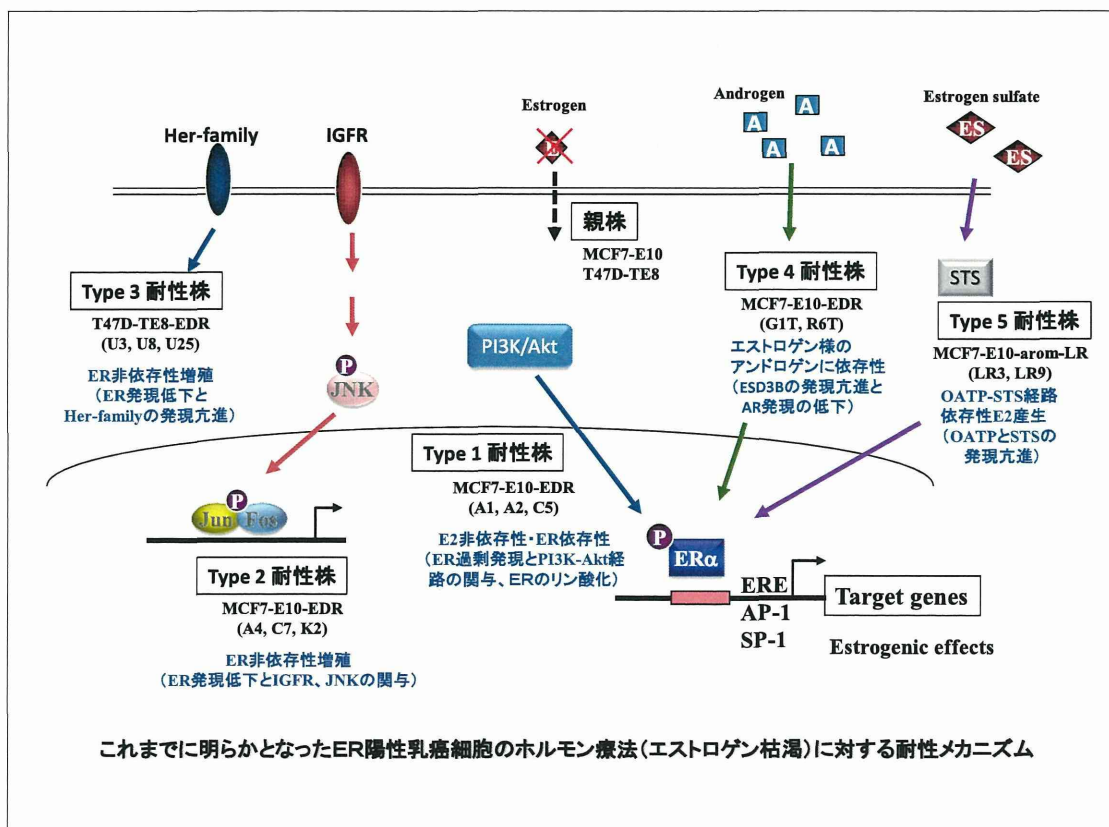
ル経路について解析する。特にサブタイプ分類との関係に着目して関連遺伝子の発現を検討する。

## （倫理面への配慮）

本研究に供する研究材料の一部は手術及び生検によって得られる腫瘍組織であるが、本研究計画を本学倫理委員会に報告し、許可を得た上で遂行する。本研究には個人の同意が得られたもののみを供し、研究で得られた個人データについては守秘義務を厳守する。

## C. 研究結果

1. 十数例のホルモン療法治療後再発症例の検体について ERE-GFP ウイルスアッセイを行い、その ER 活性が高いものからほとんど見られないものまで多様であること、抗エストロゲン剤に対する感受性も様々であることを確認した。
2. そこで考えられる機序を想定して、エストロゲン応答性 GFP を安定導入した Luminal 型乳癌培養細胞株 (MCF-7-E10,T47D-TE8) を親株として GFP を指標に合計 5 種類 (Type 1~Type 5) の機序の異なるホルモン療法耐性 (アロマターゼ阻害剤耐性) 細胞株を樹立した。さらにこれらの耐性株を用いて順次その耐性機序について解析を進めた。Type 1 細胞は ER を過剰発現し、ER タンパクのリン酸化により恒常的に活性化していること、Type 2 細胞は ER 発現が低下して、活性も失っており、何らかの他の手段によって生存を維持していることが示唆された。特徴的なものとして特異的 JNK の活性化が観察された (論文投稿中)。Type 4 細胞について



はこれまでに報告されていないステロイド代謝経路変化(3βHSD1 の発現上昇)とステロイド感受性の変化(アンドロゲン受容体の低下)とを原因とする新規の機序であることを見出した。さらにこのような機序の乳癌症例が実際に存在することも再発乳癌臨床検体を用いて確認した。(論文投稿中)

3. また、ER 陽性乳癌が化学療法に耐性であることについて、ER 活性がタキサン効果を減弱させることを *in vivo*, *in vitro* の両面から明らかにした(論文発表1)。

4. また、ホルモン療法剤の代表であるタモキシフェンに対する耐性株において癌幹細胞性(spheroid 形成能、癌幹細胞関連遺伝子発現)が高まっていることを見出した。

#### D. 考察

壮年期に罹患が多い乳癌は若年性腫瘍と

も言え、社会的、経済的インパクトは多大である。特に Luminal 型と Her2 型は我が国の乳癌症例の大部分を占め、その進行再発症例の治療は残された大きな課題であり、対象となる患者も多い。多くの乳癌はホルモン療法を施行されるため、進行再発症例はほとんどがホルモン療法耐性である。しかし、タモキシフェンなどの古典的ホルモン療法に対する耐性機序の研究は古くから行われてきたが、それも実際の耐性克服には繋がっていない。さらに最近の新たなホルモン療法や分子標的治療に対する耐性獲得機序についてはほとんど明らかとなっていない。本研究はこれらの問題について取り組むと同時に、癌幹細胞研究の視点から乳癌分化の可塑性を解明することで Luminal 型と Her2 型の common progenitor を標的にした根本的治療法開発

も目標の一つとしている。

今回の検討により、従来報告されている ER のリン酸化による恒常的活性化のほかに、アンドロゲン代謝産物による ER 活性化や JNK 経路などの ER 非依存性経路の関与などの、複数の新たな耐性機序の発見は、臨床において経験する個々の乳癌患者の各種治療に対する反応性の多様性と良く対応し、進行・再発乳癌の克服、特に、有効な 2 次治療の薬剤選択の指標を提供しうる。また、今後、これらの 5 種の耐性モデル細胞を用いた、*in vitro* や *xenograft* の実験系によって進行再発乳癌の新規治療法開発が可能になることが期待される。さらにこれらの耐性機序を識別するバイオマーカーを明らかにすることによって、乳癌患者のさらなる個別化を可能にし、無駄な医療の回避、医療費の軽減にも繋がると思われる。

#### E. 結論

エストロゲン応答性 GFP を安定導入した Luminal 型乳癌培養細胞株 (MCF-7-E10, T47D-TE8) を親株として GFP を指標に合計 5 種類 (Type 1~Type 5) の機序の異なるホルモン療法耐性 (アロマターゼ阻害剤耐性) 細胞株を樹立した。さらにこれらの耐性株を用いて順次その耐性機序について解析を進めた。Type 1 細胞は従来の ER のリガンド非依存的活性化、Type 2 細胞は、ER 発現消失と JNK の特異的活性化、また、Type 4 細胞はステロイド代謝経路の変化とステロイド感受性の変化とを原因とする ER の変則的リガンド依存性活性化が機序であることを見出した。さらにこのような機序の乳癌症例が実際に存在することも再発乳癌臨床検体を用いて確

認した。今後、各耐性機序に相当する臨床症例のさらなる検討が必要であり、またそれらを識別するバイオマーカーの開発が重要な課題となる。また、ER 陽性乳癌が化学療法に耐性であることについて、ER 活性がタキサン効果を減弱させることを *in vivo*, *in vitro* の両面から明らかにした。また、ホルモン療法剤の代表であるタモキシフェンに対する耐性株において癌幹細胞性 (spheroid 形成能、癌幹細胞関連遺伝子発現) が高まっていることを見出した。今後、ホルモン感受性やその耐性と乳癌幹細胞性との関係を明らかにしていくことも重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tokuda, E., Seino, Y., Arakawa, A., Saito, M., Kasumi, F., Hayashi, S., and Yamaguchi, Y. Estrogen receptor- $\alpha$  directly regulates sensitivity to paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 133(2):427-36, 2012.
- 2) Kataoka, M., Yamaguchi, Y., Moriya, Y., Sawada, N., Yasuno, H., Kondoh, K., Evans, DB., Mori, K., and Hayashi, S. Antitumor activity of chemo-endocrine therapy in premenopausal and postmenopausal models with human breast cancer xenografts. *Oncology Reports*,

- 27:303-310, 2012.
- 3) Takagi, K., Moriya, T., Kurosumi, M., Oka, K., Miki, Y., Ebata, A., Toshima, T., Tsunekawa, S., Takei, H., Hirakawa, H., Ishida, T., Hayashi, S., Kurebayashi, J., Sasano, H., Suzuki, T. Intratumoral estrogen concentration and expression of estrogen-induced genes in male breast carcinoma: comparison with female breast carcinoma. *Hormones and Cancer*,4(1):1-11,2012.
  - 4) Gohno, T., Seino, Y., Hanamura, T., Niwa, T., Matsumoto, M., Yaegashi, N., Oba, H., Kurosumi, M., Takei, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Individual transcription activity of estrogen receptors in primary breast cancer and its clinical significance. *Cancer Medicine*, 1(3):328-337, 2012.
  - 5) Suda, T., Oba, H., Takei, H., Kurosumi, M., Hayashi, S., Yamaguchi, Y. ER-activating ability of breast cancer stromal fibroblasts is regulated independently of alteration of TP53 and PTEN tumor suppressor genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*,428:259-263, 2012.
2. 学会・研究会発表
- 1) 林慎一: Luminal 型乳癌の可塑性と薬物療法感受性. 有明乳癌セミナー (東京)、2012.
  - 2) 林慎一: Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. The 6<sup>th</sup> Seoul St. Mary's Breast Cancer Symposium for endocrine and targeted therapy (Seoul,Korea),2012.
  - 3) 林慎一: エストロゲン応答遺伝子の新たな展開. 第 85 回日本内分泌学会総会 (名古屋)、2012
  - 4) 林慎一: アロマターゼ阻害剤耐性機序の多様性と治療戦略の基礎. 第 20 回日本乳癌学会学術総会 (熊本)、2012.
  - 5) 林慎一: AI 剤耐性機序と耐性克服の基礎. 第 7 回中国 Breast Cancer Workshop (岡山)、2012.
  - 6) 林慎一: アロマターゼ阻害剤耐性機序の多様性と乳癌幹細胞. Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Osaka (大阪)、2012.
  - 7) Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi: Individualization of Luminal-subtype Breast Cancer and Hormonal Therapy Resistance.15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer(Kanazawa,Japan),2012.
  - 8) 林慎一: アロマターゼ阻害剤治療後の再発メカニズムと治療の選択肢.順天堂大学乳がん病診連携シンポジウム 2012 (東京)、2012.
  - 9) 林慎一: アロマターゼ阻害剤耐性機序の多様性と乳癌幹細胞 .Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Fukushima (福島)、2013.
  - 10) 伊藤貴子、佐藤望、田澤智香、山口ゆり、森谷卓也、平川久、林慎一: 癌幹細胞性による Luminal 型乳癌の新たな個別化.第 20 回日本乳癌学会学術総

- 会 (熊本)、2012.
- 11) 花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一 : **Androgen** シグナル抑制による AI 剤耐性機構. 第 20 回日本乳癌学会学術総会 (熊本)、2012.
  - 12) 佐藤望、伊藤貴子、田中美穂、田澤智香、森谷卓也、平川久、山口ゆり、林慎一 : ホルモン療法耐性細胞と癌幹細胞性の検討. 第 20 回日本乳癌学会学術総会 (熊本)、2012.
  - 13) 樋口徹、郷野辰幸、長友隆将、堀口淳、竹吉泉、林慎一 : **ER** 遺伝子の **Promoter Usage** ・エピゲノム制御と **ER** 陽性乳癌個別化. 第 20 回日本乳癌学会学術総会 (熊本)、2012.
  - 14) 花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一 : 乳癌腫瘍局所における **Aromatase** 非依存的 **Estrogen** 産生経路と **ER** 活性の検討. 第 21 回乳癌基礎研究会 (埼玉)、2012.
  - 15) 須田哲司、清野祐子、黒住献、武井寛幸、黒住昌史、林慎一、山口ゆり : **ER** 活性化能の異なる乳癌間質線維芽細胞が構築する癌微小環境の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 16) 高信純子、丹羽俊文、品川優理、郷野辰幸、山口ゆり、鈴木貴、林慎一 : 乳癌細胞膜型エストロゲン受容体に対するエストロゲンの配向性と **ERK** の活性化. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 17) 稲葉綾香、林慎一 : **ER** 陽性乳癌におけるエストロゲン依存性の **FOXC1** の発現. 第 71 回日本 癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 18) 伊藤貴子、佐藤望、田澤智香、山口ゆり、森谷卓也、平川久、林慎一 : 乳癌組織分離細胞の癌幹細胞性の検討. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 19) 郷野辰幸、鈴木史彦、花村徹、清野祐子、山口ゆり、田澤智香、柳澤純、丹羽俊文、林慎一 : 乳癌における **CHIP** 遺伝子発現に関わるエピジェネティック制御機構の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 20) 山口ゆり、須田哲司、黒住献、武井寛幸、黒住昌史、林慎一 : 乳癌幹細胞に対する癌微小環境の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 21) 樋口徹、郷野辰幸、長友隆将、丹羽俊文、堀口淳、竹吉泉、林慎一 : 乳癌におけるエストロゲンレセプター(**ER**) $\alpha$  遺伝子の **promoter usage** の意義. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 22) 長友隆将、郷野辰幸、樋口徹、丹羽俊文、林慎一 : ホルモン療法耐性乳癌細胞におけるエストロゲンレセプターの発現低下とそのエピゲノム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 23) 佐藤望、伊藤貴子、田中美穂、田澤智香、山口ゆり、林慎一 : 各種乳癌細胞株の癌幹細胞性の検討とサブタイプの可塑性. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012.
  - 24) Takako, Ito., Nozomi, Sato., Chika, Tazawa., Yuri, Yamaguchi., Takuya, Moriya., Hisashi, Hirakawa.,



- Shin-ichi, Hayashi : Heterogeneity of Luminal-type Breast Cancer and Cancer Stemness. 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012.
- 25) Yuri, Yamaguchi., Hanako, Oba., Kenichi, Inoue., Tetsuji, Suda., Yuko, Seino., Hiroyuki, Takei., Masafumi, Kurosumi., Atsushi, Mizokami., Shin-ichi, Hayashi :Estrogen Signal-Related Heterogeneity of Carcinoma-Associated Fibroblasts in Breast Cancer. 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012
- 26) Tatsuyuki, Gohno., Fumihiko, Suzuki., Toru, Hanamura., Yuko Seino.,Yuri, Yamaguchi., Chika, Tazawa., Toshifumi, Niwa., Junn, Yanagisawa., Shin-ichi, Hayashi :Multiple Epigenetic Regulation Mechanism of CHIP Gene and Clinical Significance of Its Functional Re-expression Analysis in Breast Cancer. 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa, Japan),2012.
- 27) Toshifumi, Niwa., Junko, Takanobu., Yuri, Shinagawa., Haruna Mori., Tatsuyuki, Gohno., Yuri, Yamaguchi., Takashi, Suzuki. and Shin-ichi, Hayashi :Membrane-type Estrogen Receptor in Breast Cancer Cells Activated by Specific Ligands. 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Kanazawa,Japan),2012.
- 28) Toru Hanamura, Toshifumi Niwa., Sayo, Nishikawa., Hiromi, Konno., Tatsuyuki, Ghono., Yasuhito, Kobayashi., Masafumi, Kurosumi., Hiroyuki, Takei., Yuri, Yamaguchi., Ken-ichi, Ito., Shin-ichi, Hayash : The androgen metabolite-dependent growth in hormone receptor positive breast cancer as a novel aromatase inhibitor-resistance mechanism. Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio,USA),2012.
- 29) 稲葉綾香、花村徹、山口ゆり、林慎一 : 乳癌においてエストロゲンの制御を受ける FOX 遺伝子.第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)、2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  - 3.その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

エストロゲン受容体の蛋白分解機構の解明

研究分担者 大竹 史明 国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

研究要旨

エストロゲン受容体（ER）機能は乳癌克服に向けて重要な分子標的と考えられる。本分担研究では、Arylhydrocarbon receptor (AhR)依存的なER蛋白分解促進の分子機構の解析を行った。AhRによるER蛋白分解を選択的に促進する因子の探索の中でも、本年度は特異的リガンドの探索を行った。そのため定量的な遺伝子発現解析、蛋白質発現解析および遺伝子発現絶対定量測定を遂行した。その結果、ある種のAhR部分アンタゴニストが、ER蛋白分解活性においてはアゴニストとして機能し、ER蛋白分解を選択的に促進することを見出した。AhR標的遺伝子であるCYP1A1を指標とした検討の結果、3,3'-diindolylmethane (DIM)はAhRの転写活性をほとんど活性化しない用量においてER蛋白分解を促進することを見出し、両者分子機能に明確な乖離が見られた。本成果は、AhR依存的なER蛋白分解促進機構の一端を示し、さらなる分子機構解明のモデル系を提供するものと考えられる。また、乳癌標的としてのER機能抑制において、AhRの蛋白分解促進能のみを選択的に活性化させることによるER機能阻害戦略の有効性を示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

本分担研究では、全体構想内での「ホルモン療法耐性獲得機序の解明」のために、エストロゲン受容体の蛋白分解機構解明を分担する。すなわち、女性ホルモン・エストロゲンは乳癌の増悪因子であり、そのため、エストロゲン受容体（ER）機能は乳癌克服に向けて重要な分子標的と考えられる。本分担研究では、低分子リガンドによって

直接活性化される受容体であるArylhydrocarbon受容体（AhR）に着目し、AhRの活性化によるエストロゲン受容体（ER）の分解促進と機能抑制という新規作用機序に基づくER機能阻害戦略に取り組む。

AhRは多様な内在性・外来性の低分子化合物をリガンドとして活性化する転写因子である。これまでに、ERと直接相互作用することによりERの蛋白分解を促進してER

機能を阻害することがわかっている。他方、標的遺伝子として薬物代謝酵素CYP1A1、CYP1B1等が知られ、酸化ストレスなどの有害作用をもたらすと考えられている。従って、転写機能を伴わずにAhRを活性化させることにより、副作用の少ないER機能阻害戦略が可能になると考えられる。

そこで本研究では、ERの機能抑制に有効な選択的AhR活性化剤の探索に向けて、その指標となる分子基盤解明を目的とする。今年度はER蛋白分解を促進する因子群の探索の中でも、特異的リガンドの探索を中心として、定量的解析によりER蛋白分解機能を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 遺伝子発現解析

ヒト乳癌由来MCF-7細胞に、AhRリガンドとして知られている薬剤であるIndirubin (1-100 nM), Indigo (1-100 nM), 3,3'-diindolylmethane (DIM) (0.5-100  $\mu$ M), 3-methylcholanthrene (3MC) (0.1-1  $\mu$ M), 17 $\beta$ -estradiol (E2) (10 nM)を添加し、4-6時間後に細胞を回収した。RNA抽出はRNeasy (QIAGEN)を用い、逆転写反応はPrimeScript (TAKARA)、定量PCRはABI Prism 7900HT (Applied Biosystems)を用いた。3回の独立した結果から定量化を行った。有意差の検定はStudentのt検定により行い、P値が0.05未満の場合を有意と判定した。

### (2) 遺伝子発現の絶対定量測定

細胞個数当たりのmRNAコピー数の絶対定量化のため、先行研究(Kanno J, et al., BMC Genomics, 2006)の方法に従って行った。DNA含量はPicogreenを用いて測定し、

DNA含量に応じて設定された量の外来性Spike RNA(Bacillus由来RNA5種を混合した液)を添加し、RNeasy(QIAGEN)を用いてRNAを抽出、定量PCRに供した。Spike RNAのCt値を元にmRNAコピー数を算出した。

### (3) 蛋白質発現解析

MCF-7細胞に、Indirubin (1-100 nM), Indigo (1-100 nM), DIM (0.5-100  $\mu$ M), 3MC (0.1-1  $\mu$ M)を添加し、3-6時間後に細胞を回収した。細胞抽出液はWestern blotting法により、抗ER- $\alpha$ 抗体(Santa Cruz Biotechnology, HC20)、抗AhR抗体(Santa Cruz Biotechnology, H211)、抗 $\beta$ -Actin抗体(Abcam)を用いて検出した。シグナルはイメージングソフトによって定量化し、3回の独立した結果により有意差検定を行った。

### (4) 蛋白質相互作用の解析

細胞内ノックダウンのため、UBCH5a, UBCH5b, UBCH5cに対するsiRNA (Hokkaido System Sciences) を、lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いてMCF7細胞に導入した。36-48時間後、上記の各種リガンドを添加し、45-90分後に細胞を回収した。免疫沈降は抗ER- $\alpha$ 抗体(Millipore, MAB463)、抗AhR抗体(RPT1, またはSanta Cruz Biotechnology, N-19)を用い、相互作用因子はWestern blottingにより解析した。抗体クロスリンクはDSS (ThermoScientific)により行った。

### (倫理面への配慮)

動物実験の計画および実施に際しては、科学的小および動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する

規定「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守した。

### C. 研究結果

#### (1) ER蛋白分解を促進する因子群探索による、特異的リガンド3,3'-diindolylmethaneの同定

AhRによるER蛋白分解を選択的に促進する因子の同定は、蛋白分解の詳細な分子機構解析のモデル系となる点や、リガンドの創薬応用の道筋を立てる上で重要である。促進因子探索の中で、本年度は特異的リガンドの探索を行った。すなわち、AhRのアンタゴニストあるいは部分アンタゴニストとして知られる化合物の中に、ER分解促進作用のアゴニストとして機能する化合物が存在する可能性を考えた。解析の結果、MCF7細胞において、3,3'-diindolylmethane (DIM)はER- $\alpha$ 蛋白分解を促進することが明らかとなった。この活性は5  $\mu$ M以上の濃度において見られ、既知のアゴニストであるIndirubin (100 nM) や3-methylcholanthrene (3MC) (1  $\mu$ M)と最高用量においてほぼ同等の強度でER- $\alpha$ 蛋白分解を促進した。ER- $\alpha$ 蛋白分解においては、3MCと同時添加によるアンタゴニスト活性は見られなかった。また、AhRの蛋白分解においても同様の効果が見られた。定量の結果、DIMによるER- $\alpha$ およびAhRの蛋白量減少は有意( $P < 0.05$ )であった。

#### (2) DIMのER蛋白分解促進機能と転写機能との独立性の検討

次にDIMの蛋白分解促進機能と転写促進機能との関連を検討するため、遺伝子発現の定量解析を行った。これまでに、DIM等

幾つかのAhR部分アンタゴニストがERの発現レベル低下や抗エストロゲン効果を示すことが報告されている(Okino et al, *Cancer Prev Res*, 2009)。しかしながら、この効果が蛋白分解を介しているか否かは必ずしも明確でなかった。また既知アゴニスト類の転写活性との定量的比較が必要である。既存の報告では、DIMのAhRリガンドとしての効果は主に部分アンタゴニストと考えられているが、測定条件により、転写活性をほとんど示さない報告(Crowell, *Toxicol Appl Pharm*, 2006)、一方では高濃度でアゴニスト様に振る舞う報告(Wihlen, *Mol Cell Res*, 2009)がなされている。なおER- $\alpha$ に対する直接的リガンドでないことは既に示されている(Omar, *Endocrinol*, 2010)。そこでMCF7細胞において詳細に検討した結果、DIMによるAhR標的遺伝子CYP1A1, CYP1B1の発現誘導はindirubinや3MCに比べ極めて微弱であることがわかった。また用量依存性において、100  $\mu$ Mでは10  $\mu$ Mに比べて転写活性の減弱が起こることからも、アゴニスト活性は有さないと考えられた。一方、ER蛋白分解効果に対する用量依存性の検討の結果、DIMによるER蛋白分解促進機能は転写活性化機能と乖離して発揮される可能性が示唆された。

#### (3) ER蛋白分解促進能・転写機能の乖離に関する絶対定量解析

上記をうけて、ER蛋白分解促進機能を有することが明らかになったDIMの遺伝子発現誘導能を絶対定量的に解析した。MCF7細胞にDIM (0.5, 5, 50  $\mu$ M)、indirubin (1, 10, 100 nM)、indigo (1, 10, 100 nM)処理を行った。枯草菌由来Spike RNA (Th