

2013/3047A

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

難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三木 義男

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進研究 三木 義男	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 分子プロファイリングによるトリプルネガティブ乳癌関連分子の同定とその機能解析 片桐 豊雅	----- 16
2. DNA 修復経路における合成致死解析 太田 智彦	----- 20
3. DNA 損傷修復の新たな薬剤標的の研究 中田 慎一郎	----- 23
4. ホルモン療法耐性乳癌の機序解明とその克服の研究 林 慎一	----- 26
5. エストロゲン受容体の蛋白分解機構の解明 大竹 史明	----- 32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 36
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39

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）
総括研究報告書

難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進研究

研究代表者 三木 義男 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨

本研究では「難治性乳癌」であるTriple Negative乳癌とホルモン療法耐性Luminal乳癌を対象に、(1)エクソーム・遺伝子発現解析、(2)DNA修復経路における合成致死解析、(3)ホルモン療法耐性獲得機序の解明、の3プロジェクトを柱に、各グループが綿密な連携のもと有機的な研究体制を整備し、「難治性乳癌」の新規治療法の開発に向けた基礎研究と開発基盤の構築に取り組む。本年度は、(1) 難治性乳癌であるトリプルネガティブ(TN)乳癌の発症および進展メカニズムの解明、治療法の確立のため、次世代シーケンス解析および網羅的遺伝子発現解析を組み合わせ、TN乳癌の発症および進展に関与する新規遺伝子の同定を目指した。(2) 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、ヒストンメチルトランスフェラーゼがBRCA1/BARD1の損傷局所への誘導を阻害し、PARP阻害剤と相乗効果を示すことを明らかにした。また、脱ユビキチン化酵素に対するsiRNAライブラリーのスクリーニングにより、OTUB2が相同組み換え修復の開始に必要なことを発見した。(3) 本年度はさらに新たなホルモン療法耐性機序を持つType 6細胞を樹立、その機序について解析し、本細胞株はアンドロゲン受容体(AR)とその転写共役因子DDCを過剰に発現し、アンドロゲン依存性に増殖していることを示した。また、ER蛋白分解を特異的に促進するAhRリガンドを用いて、選択的なER分解の分子機構を解析し、蛋白分解機能に特異的なAhRリガンドは、AhRの転写活性化に必要なARNTとのヘテロダイマー形成を惹起しないことを見出した。

研究分担者氏名	所属研究機関名及び所属研究機関における職名
片桐 豊雅	徳島大学・教授
太田 智彦	聖マリアンナ医科大学・教授
中田 慎一郎	大阪大学・独立准教授
林 慎一	東北大学・教授
大竹 史明	国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

A. 研究目的

本研究では「難治性乳癌」である Triple Negative (TN)乳癌とホルモン療法耐性 Luminal 乳癌を対象として、

1. エクソーム・遺伝子発現情報解析(三木・片桐)
 2. DNA 修復経路における合成致死解析(太田・中田)
 3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明(林・大竹)
- の3プロジェクトを柱に新規治療法の開発に取り組む。

1. エクソーム・遺伝子発現情報解析

- 1) 次世代シーケンサー(NGS)による全エクソン解析と DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を通じて、TN 乳癌の発症および進展に関与する新規遺伝子を同定し、それらを標的とした新たな治療薬の開発を進めることで、厚生労働行政において「がん難民」といわれる難治性癌患者の救済に大きく貢献するとともに無駄な医療の回避、医療費の軽減に繋げ、国民の保健医療に関する行政施に活用することを目的とする。
- 2) 今年度は、前年度に行った TN 乳癌 12 症例のエクソーム解析によって検出された体細胞変異を追加症例にて検証することおよび、網羅的遺伝子発現解析を通じて新たながん特異的遺伝子を同定し、その機能解析を進め、新規治療薬開発のための基盤的データを得ることを目指した。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

- 1) 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。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。
- 2) 相同組換え修復が低下した細胞は、PARP1 阻害剤にのみ感受性を示すわけではない。例えば、カンプトテシンはトポイソメラーゼ I を DNA 損傷部位に固定することにより、トポイソメラーゼ I により作られた DNA ニックを安定化させる。ここに DNA 複製フォークがぶつかると DNA2 本鎖損傷となる。このような損傷には相同組換えによる修復が必須であ

る。また、シスプラチンのような DNA 架橋剤では、架橋部分に複製フォークがぶつかると、FANCONI 経路やヌクレオチド除去修復経路を経て、DNA 2 本鎖損傷が作られ、これも相同組換え修復によって修復される。実際に BRCA1 はこれらの薬剤による DNA 損傷の修復にも必要である。

このようなことから、人為的に癌細胞の相同組換え修復を抑制した場合、抗腫瘍薬の効果の増強が期待できる。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) 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ターゼ阻害剤耐性細胞の樹立を行い、これまで報告されていない新たな耐性機序や耐性と癌幹細胞性との関係、Luminal 型と Her2 型のサブタイプ間の可塑性を見出した。そこで、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。
- 2) 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。昨年度までに ER 蛋白分解を促進する因子群の探索の中で、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. エクソーム・遺伝子発現情報解析

追加 TNBC の NGS によるエクソーム解析
前年度行った TN 乳癌臨床検体 12 症例を対象としたエクソーム解析にて、体細胞変異の認められた遺伝子群について、追加 TN 乳癌 24 症例による replication シーケンス解析を行った。

前年度行った網羅的遺伝子発現解析による新規癌特異的遺伝子の同定と機能解析

- 1) 前年度行った TN 乳癌と正常乳腺組織および正常臓器における発現解析を通じて、心臓・肺・肝臓・腎臓にて発現が極めて低く、乳癌症例にて高頻度に発現亢進を認める新たな「癌特異的遺伝子」を選抜した。
- 2) 「癌特異的遺伝子」特異的 RNA 干渉にて細胞増殖抑制効果について調べた。
- 3) 過剰発現系にて細胞増殖に与える影響を調べた。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

- 1) ①BARD1 複合体と結合するヒストン修飾のスクリーニング
②BARD1 と H3K9me2 の結合の免疫沈降・ウェスタンブロットによる解析
③In vitro での BARD1 と HP1 γ の結合の確認
④BARD1 上の HP1 γ 結合部位の同定
⑤HP1 γ と結合しない BARD1 変異体の DNN 損傷局所への集積を蛍光免疫染色法にて解析
⑥BARD1 が DNA 損傷局所に集積しない際には BRCA1 が集積しないこと、RAD51 が集積しないこと、逆に S 期に RIF1 が集積することを解析
⑦H3K9me2 を阻害するヒストンメチルトランスフェラーゼ Chaetocin および UNC0638 の効果の解析等を行った。
- 2) DNA 損傷に応答して DNA 損傷部位に集積し、相同組み換え修復を抑制する分子である RAP80 に着目した。RAP80 の DNA 損傷部位への局在は E3 ユビキチンリガーゼの RNF8 と RNF168 により作られるユビキチン鎖からなる足場の構築に依存している。そこで、このユビキチン化が脱ユビキチン化酵素により抑制的に制御されている場合、その脱

ユビキチン化酵素の発現を抑制すれば、RAP80 は過剰に DNA 損傷部位に集積し、相同組み換え修復が抑制されるのではないかという仮説を立てた。当該の脱ユビキチン化酵素を発見し、この仮説を検討するため、脱ユビキチン化酵素に対する siRNA ライブラリーをスクリーニングした。リードアウトとしては DNA2 本鎖損傷発生直後における RAP80 の DNA2 本鎖損傷部位への局在の増強を用いた。その結果、5 つのヒットが得られ、その中から OTUB2 の機能について解析を進め、OTUB2 ノックダウンが相同組み換え修復効率あたえる影響とその影響が生じる分子機構について分子生物学的手法および細胞生物学的手法を用いて解析を行った。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) ①ホルモン療法治療（特にアロマトラーゼ阻害剤治療）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トラ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

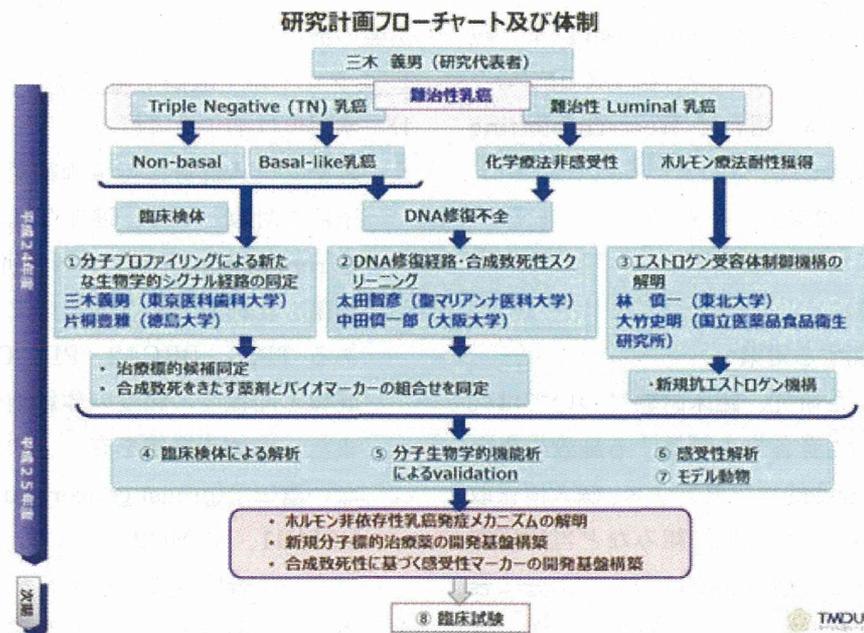


図 1

との関係に着目して関連遺伝子の発現を検討する。

- 2) AhR 依存的な ER 蛋白分解促進機構を解析するため、蛋白量測定および遺伝子発現定量解析を行った。ER 蛋白分解促進因子探索の中でも、特異的リガンドを探索することとし、検討を行った。

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 などを添加し、4-6 時間後に細胞を回収した。遺伝子発現の絶対定量測定に関しては、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。

② 蛋白質発現・相互作用解析

細胞抽出液は Western blotting 法により、抗 ER- α 抗体、抗 AhR 抗、抗 ARNT 抗体、抗 β -Actin 抗体を用いて検出した。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。

共免疫沈降においては、上記各種リガンドを添加し、免疫沈降は抗 ER- α 抗体、抗 AhR 抗体を用い、相互作用因子は抗 ARNT 抗体、抗 ER- α 抗体、抗 AhR 抗体を用いて Western blotting により解析した。

細胞内ノックダウンにおいては、UBCH5a, UBCH5b, UBCH5c に対する siRNA を、lipofectamine2000 を用いて MCF7 細胞に導入した。

③ クロマチン免疫沈降解析

MCF-7 細胞に、AhR リガンドを添加し、ホルマリン固定した。抗 AhR 抗体、抗 RNA polymerase II 抗体、抗 Acetyl-H4 抗体を用いて免疫沈降し、DNA を回収した。

④ マウス組織での遺伝子・蛋白質発現解析

17 β -estradiol (E2), Indigo, 3,3'-diindolylmethane (DIM)を投与されたマウス子宮及び肝臓組織を用いた。DNA 含量は Picogreen を用いて測定し、RNeasy

を用いて RNA を抽出、定量 PCR に供した。また凍結組織は sonication により破碎し、蛋白質を抽出した。抗 ER- α 抗体)、抗 AhR 抗体を用いて Western blotting により解析した。

(以上、図1参照)

(倫理面への配慮)

1. 倫理的問題に関する対策

臨床検体を用いた研究、臨床試験については代表者及び分担、協力者各自の所属する施設の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当該研究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った。被験者の検体、情報を病院外に出すことはない。院内でデータを取り扱う者は全て法的に守秘義務を課せられた者が行った。データを分担研究者間で共有する場合は各施設に個人情報管理者をおいた。結果が学会や科学誌などで公的に発表される場合には、名前や個人を識別できる情報は一切公表せず、プライバシーは保護される。利益相反状態にある研究者がいた場合にはこれを開示した。

2. 遺伝子組換え実験及び動物実験等に関する対策

遺伝子組み換え生物等の実験および動物実験は当該施設の管理下に研究課題の申請を行い、承認を受けて行った。

C. 研究結果

本研究では「難治性乳癌」である Triple Negative (TN) 乳癌とホルモン療法耐性 Luminal 乳癌を対象に、

1. エクソーム・遺伝子発現解析

2. DNA 修復経路における合成致死解析

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

の3種のサブテーマを柱に、各グループが綿密な連携のもと有機的な研究体制を整備し、「難治性乳

癌」の新規治療法の開発に向けた基礎研究と開発基盤の構築に取り組んだ。

1. エクソーム・遺伝子発現解析

1) 本年度は前年度に行った TN 乳癌臨床検体のエクソーム解析にて体細胞変異を認めた遺伝子群を対象として、追加 TN 乳がん症例による replication シーケンス解析を行った。その結果、これまでに TN 乳癌にて変異の報告のある TP53、BRCA2、PIK3CA、NF1 にて、既報と同程度の頻度の体細胞変異を同定した。また、癌抑制機能を有し、未だ変異の報告がない遺伝子(breast cancer mutated gene1, 2: BCMG1、BCMG2)について、それぞれ 10% 以上の体細胞変異を検出した。

2) さらに、前年度に行った TN 乳癌症例・正常乳腺組織例及び生命維持に重要な正常臓器である心臓・肺・肝臓・腎臓の網羅的遺伝子発現解析をデータ通じて、TN 乳癌にて高頻度に発現亢進し、正常臓器では発現を認めない新規の「癌特異的分子」として、糖転移酵素をコードする B3GALNT2 を同定した。B3GALNT2 高発現 TN 乳癌細胞株(BT-20)を用いた RNA 干渉法実験にて、その発現を抑制した結果、アポトーシスが誘導されることで顕著な細胞増殖抑制効果が認められた。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

1) DNA 修復経路における合成致死解析 BRCA1 は BARD1 と RING ヘテロダイマーを形成するが、我々は BRCA1 の DNA 二本鎖損傷局所への安定維持に必要な、BARD1 と Lys9 ジメチル化ヒストン H3 (H3K9me2) の結合を介した新規メカニズムを発見した。この結合は HP1 γ を介しており、内因性 BARD1 を HP1 との結合を阻害するミスセンス変異体に置換した細胞では BRCA1/BARD1 の DSB への集積が阻害される。重要なことに、この結合は ATM 依存性であるが、RNF168 非依存的で、相同組換え修復のエフェクターである

RAD51 の集積と非相同末端連結のエフェクターである RIF1 の排除に必要である。H3K9me2 ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤である Chaetocin および UNC0638 によって IR 照射後の BRCA1 および BARD1 の損傷局所への集積は阻害され、殺細胞効果において Chaetocin および UNC0638 と PARP 阻害剤の相乗効果が認められた。

- 2) OTUB2 ノックダウン細胞では、NCS (DNA2 本鎖損傷を誘導する薬剤) 処理後 5~20 分における DNA2 本鎖損傷部位でのユビキチン化はコントロール細胞と比較して増強しており、1 時間経過した時点では、同等になっていた。一方、ユビキチン化の上流で起こるヒストン H2AX のリン酸化や MDC1 の DNA2 本鎖損傷部位への局在は OTUB2 ノックダウンの影響を受けなかった。これらのデータから、OTUB2 ノックダウン細胞ではユビキチン化反応が通常より加速していると考えられた。また、NCS 処理後 5~20 分における RAP80 および DNA2 本鎖損傷部位への集積も増強していた。次に、リン酸化 H2AX (γ H2AX) や conjugated ubiquitin の foci 形成の経時変化を測定したところ、OTUB2 ノックダウン細胞ではコントロール細胞よりも早く foci が消失することが示された。細胞一個あたりの DNA2 本鎖損傷量を測定したところ、NCS 処理後 DNA2 本鎖損傷修復はコントロール細胞よりも OTUB2 ノックダウン細胞で進んでいることが示され、これらのデータから、OTUB2 ノックダウン細胞では全般的な DNA2 本鎖損傷修復が促進されていることが示された。一方、DR-GFP アッセイにより相同組換え修復効率を測定したところ、OTUB2 ノックダウン細胞では相同組換え修復効率は低下し、DNA end resection により作り出された一本鎖 DNA に結合する RPA や、RAD51 の foci 形成も低下していた。OTUB2 と同時

に RAP80 をノックダウンすることで RPA や RAD51 の foci 形成は回復した。

3) 3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) 本年度は、これまでに樹立したホルモン療法耐性モデル細胞 5 種 (Type 1~Type 5) の characterization を一層進めるとともに、それらに加えて、T-74D 細胞を親株にして、エストロゲン枯渇、アンドロゲン添加の培養を行い、新たな機序の耐性モデル細胞 (Type 6) を樹立した。この Type 6 細胞は、ER の発現を消失しており、エストロゲンに対して全く反応しない。一方、アンドロゲン依存性に増殖し、抗アンドロゲン剤で増殖が抑制された。また、AR や AR の転写共役因子である DDC や標的遺伝子である PSA を高発現していた。これらのことは本耐性細胞がアンドロゲンシグナル依存性を獲得して生存を維持していることが推察された。A I 剤治療後再発乳癌の臨床検体を、免疫染色法を用いて検索したところ、このような AR や PSA を高発現している症例が観察され、臨床乳癌においても一部にこのような耐性機序を獲得したもののあるのではないかと推察された。

また、ホルモン療法耐性に対する 2 次治療の可能性について検討するため、これまでに樹立した各種耐性モデル細胞を用いて、SERD である fulvestrant の効果や、mTOR 阻害剤の効果について、in vitro, in vivo の両面からの検討を開始した。Fulvestrant は、ER を発現し、ER シグナルに依存した耐性機序を持つタイプ (Type 1, Type4, Type 5) の細胞増殖を有意に抑制したが、一方で、Type 2 や Type 3, Type6 などの ER の発現が低下し、ER シグナル系に依存しないタイプの機序を持つ細胞には効果が見られなかった。また、mTOR 阻害剤は多くに細胞に効果が見られたが、特に Type 4 の耐性細胞に、親株と比べて顕著な増殖抑制効果が観察された。これらの

結果はさらにマウスを用いた xenograft の系にて確認中である。また、さらなる機序の解明のため、fulvesrant 耐性株や mTOR 阻害剤耐性株などを作成してその characterization を進めている。

2) ①相互作用因子同定による、選択的なER蛋白分解の分子機構の解析

これまでの解析により、3,3'-diindolylmethane (DIM)はAhR部分アンタゴニストとして報告されているが、定量的な比較検討の結果、ER蛋白分解活性においては選択的なアゴニストとして機能し、ER蛋白分解を促進することを見出した。そこで、まず、相互作用因子を同定することにより分子機構解析を進めた。乳癌由来MCF7細胞においてDIMあるいは典型的リガンド (IDB) を投与し、AhR相互作用因子を免疫沈降-Western blottingにより解析した。その結果、転写活性化に必要なパートナー蛋白であるARNTとの相互作用が、典型的リガンドでは惹起されるが、DIMによっては微弱にしか惹起されないことが判明した。AhR-ERの相互作用は保持されていた。ユビキチン連結酵素であるUBCH5をノックダウンしたところ、共免疫沈降による相互作用は増強したが、DIMの効果に関しては同様の傾向であった。そこで、標的遺伝子CYP1A1プロモーターにおけるAhRのリクルート及びヒストンAセチル化をクロマチン免疫沈降法によって解析した。AhRおよびRNA polymerase IIのプロモーターリクルート及び、ヒストンH4アセチル化は、IDB依存的に誘導されたが、一方でDIMによってはほとんど惹起されなかった。以上から、DIMは典型的アゴニストに比較して、転写活性化に必要なARNTとのヘテロダイマー化誘導能が微弱であることが示唆された。すなわち、DIMの転写部分アゴニスト・アンタゴニスト活性はヘテロダイマー形成の部分阻害であることが示唆された。

②選択的なER蛋白分解における鍵因子としてのARNT必要性の検討

上記解析から、AhRによる転写制御にはパートナー分子ARNTとのヘテロダイマー化が必須なのに対し、AhR依存的なER蛋白分解には必要ない可能性が考えられた。そこで、典型的アゴニストIDBとDIMとの機能的差異の発揮においてARNTが鍵分子である可能性を検討した。その結果、IDB用量依存的なCYP1A1誘導はARNTのノックダウン条件下で低下するのに対し、ER蛋白分解は大きな変化を及ぼさなかった。さらに、ARNTノックダウン条件下では、IDBによる転写促進能・ER分解促進能の間に乖離が生じ、DIM投与におけるそれをphenocopyする結果が得られた。以上より、ARNTは、AhR部分アンタゴニストDIMによって転写活性を伴わずにER分解促進活性が制御される選択性の鍵分子であると考えられた。

③蛋白分解に伴うER機能抑制のin vivoでの評価

これまでの解析により、DIMはAhR依存的なER蛋白分解の促進因子であることが明らかとなった。そこで個体レベルにおいて作用が発揮されるか否かを検討した。IDB類似物質でありマウスAhRの活性化に適した化合物であるIndigo(IDG)を陽性対照として、DIMの効果を検討した。マウス子宮において、IDG, DIMは用量依存的にER分解を促進した。一方、AhR標的遺伝子CYP1A1の誘導においては、DIMは非常に微弱な活性であった。さらに、子宮におけるエストロゲン標的遺伝子Lactoferrinの発現誘導を検討した。17 β -estradiol (E2) (10 μ g/kg)依存的なlactoferrinの誘導はDIMおよびIDGによって抑制された。従って、個体レベルでのER機能抑制の一端が示唆された。

D. 考察

1. エクソーム・遺伝子発現解析

- 1) 前年度に行った TN 乳癌 12 症例におけるエクソーム解析を通じて同定された TP53、BRCA1、BRCA2、PIK3CA、NF1 遺伝子の体細胞変異の頻度は欧米の TN 乳癌の NGS 解析と同程度であった (Nature 2012;486:395-9)。この結果は、日本人の TN 乳癌も類似の分子特性を有するものと考えられる。しかしながら、これまでに癌抑制機能を有することが報告されているが、本研究ではじめて体細胞変異を認めた BCMG1、BCGT2 遺伝子は、新たな TN 乳癌の分子特性を示すものであり、また欧米と日本の TN 乳癌の異なる特性を示すものであるかもしれない。
- 2) DNA マイクロアレイによる TN 乳癌の発現情報解析を通じて、今回新たに同定した癌特異的糖転移酵素 B3GALNT2 遺伝子 K は、RNA 干渉実験による発現抑制により、アポトーシス誘導による顕著な細胞増殖抑制を認め、TN 乳癌細胞増殖に重要な役割を担うことが示唆され、B3GALNT2 を分子標的とすることで副作用の少ない治療薬開発につながることを示唆された。さらに、B3GALN2 は分泌タンパク質をコードすることから、B3GALNT2 を特異的に検出するシステムを開発することで、B3GALNT2 阻害剤開発された後の、その効果判定のための診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

- 1) DNA 二本鎖切断における相同組換え修復ではユビキチンを介した BRCA1 の損傷局所への維持が重要である。この経路は非常によく研究されており、ATM によるヒストン H2AX のリン酸化/MDC1 のリン酸化/ユビキチンリガーゼ RNF8 と RNF168 の誘導/H2A および H2AX の K13-15 ユビキチン K63 鎖形成/ユ

ビキチン結合蛋白質 RAP80 を介した BRCA1-Abraxas(BRCA1-A)複合体の集積、がこれまでに明らかにされた。しかし、BRCA1-A 複合体の機能としてこれまでにわかっていることは過剰な相同組換えの抑制であり、肝心な相同組換えを行う BRCA1 複合体がどのように ATM 依存的に誘導されるかはわかっていない。これに対して BARD1 と H3K9me2 の結合を介して集積する BRCA1 複合体は相同組換えを司る複合体であり、治療の標的として重要である。PARP 阻害剤による DNA 一本鎖損傷修復不全および Chaetocin あるいは UNC0638 による BRCA1 安定維持の障害が合成致死をきたす可能性が考えられ、PARP 不全乳癌や LSD1 過剰により H3K9me2 が低下した癌などの治療への応用が期待される。

- 2) OTUB2 ノックダウン細胞では、ユビキチン化とそれに引き続く RAP80 の DNA2 本鎖損傷部位への集積が促進される結果、DNA end resection が通常よりも強く抑制され、相同組換え修復が起こりにくくなると考えられる。OTUB2 の分子生物学・細胞生物学的機能としては、OTUB2 は RNF8 によるユビキチン化を緩やかに脱ユビキチン化することで、DNA2 本鎖損傷部位におけるユビキチン化を適度なレベルに調節し、RAP80 が過剰に DNA2 本鎖損傷部位に集積することを抑制していると考えられた。OTUB2 の脱ユビキチン活性を特異的に抑制する化合物が見いだされた場合、その薬剤により癌細胞での相同組換え修復を抑制することが期待される。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) 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。

昨年度に引き続き、今回の検討により、さらに新たな耐性機序として、アンドロゲン、およびその受容体 AR 依存性の耐性株を樹立した。AR の発現は従来 Luminal 型乳癌には良く観察されることが知られているが、その意義はよくわかっていない。今回見出された AR シグナル系の乳癌のホルモン療法耐性への関与は、乳癌における AR の機能について新たな知見を与えるものであろう。ER と AR がお互いに拮抗的な関係にあることは従来から報告されているところであるが、一方で、再発時にはその関係が逆転し、耐性細胞が、むしろ AR 依存性示すことは大変興味深い。また、一部の症例ではあろうが、抗アンドロゲン剤が従来のホルモン療法耐性の再発乳癌の治療に効果を示す可能性を示唆している。

今後、これらの6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。

- 2) 相互作用因子同定による、選択的な ER 蛋白分解の分子機構の解析に取り組んだ。その結果、DIM は典型的リガンド IDB に比べ、ARNT とのヘテロダイマー化誘導能が微弱であることを見出した。即ち、AhR の蛋白分解促進能の選択的活性化による ER 機能阻害戦略における鍵分子として ARNT を同定することに成功した。特異的化合物による AhR-ARNT ヘテロダイマー化の人工的な調節は、ER 蛋白分解促進において鍵となる分子機構

であると考えられた。本知見は、ER 機能抑制に選択的な AhR リガンドをスクリーニングする上での分子基盤を提供すると考えられる。

一方で本研究ではマウス個体レベルにおいても詳細な検討を行った。その結果、マウス子宮においても DIM の部分アンタゴニスト活性が確認された。網羅的な遺伝子発現解析についても解析を進めており、ER 蛋白分解の寄与の標的遺伝子間の差異についても明らかになることが期待される。

本知見を踏まえると、AhR-ER 間相互作用を惹起し、かつ AhR-ARNT ヘテロダイマー化を惹起しないことを指標とすることで、特異的化合物のスクリーニングが可能であると考えられる。今後は DIM を陽性化合物として利用することで、さらなる ER 蛋白分解機構の解析並びに特異的化合物の探索が必要であると考えられる。

これらの成果は、画期的な治療法開発に繋がることを期待され、厚生労働行政において喫緊の課題である「がん難民」の救済に大きく貢献するとともに無駄な医療の回避、医療費の軽減にも繋がり、国民の保健医療に関する行政施策にも活用され得るものである。

E. 結論

1) 1. エクソーム・遺伝子発現解析

本年度は、前年度に同定していた TN 乳癌関連遺伝子群を新たな臨床検体を用いたエクソーム解析および網羅的発現解析による新規 TN 乳癌関連分子の同定とその機能解析を進めた。その結果、既報の体細胞変異を認める遺伝子群および新規の TN 乳癌の癌化に関与する可能性ある遺伝子(BCGT1、BCGT2)を同定した。さらに網羅的遺伝子発現解析により、TN 乳癌に共通して発現亢進を認め、正常臓器では発現の極めて低い、癌特異的糖転移酵素

を同定した。これらの結果は、TN 乳癌の癌化、進展の分子機構の解明およびこれら癌特異的分子を標的とすることで副作用の少ない治療薬開発につながるものである。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

- 1) ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 Chaetocin および UNC0638 が H3K9me 依存的な BRCA1/BARD1 の損傷局所への誘導を阻害、DNA 相同組換え修復を阻害し、PARP 阻害剤と相乗効果を示すことが判明した。
- 2) 本研究により、脱ユビキチン化酵素 OTUB2 が DNA 損傷応答を利用した薬剤の標的分子の候補となり得ることが示唆された。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) これまで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)細胞株を樹立してきたが、さらに本年度、第 6 の新たな耐性機序を持った細胞株を樹立し、その耐性メカニズムを解析し、アンドロゲンシグナル系に依存した細胞増殖機構を明らかにした。さらにこのような機序の乳癌症例が実存する可能性も再発乳癌臨床検体を用いて確認した。今後、これまでの耐性機序も含め、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、それらの耐性の克服のための検討として、現在の臨床での 2 次治療として想定される fulvestrant や mTOR 阻害剤の各耐性株に対する効果を検討し、さらにこれら薬剤に対する耐性株の樹立も試みている。
- 2) 本分担研究ではエストロゲン受容体の蛋白分解機構を解析した。ER 蛋白分解を選択的に促進する因子 3,3'-diindolylmethane (DIM) を用いた解析の結果、AhR 依存的な ER 蛋白分解促進が転写活性とは独立した分子機構であ

ることが示唆された。さらにこの選択性を生じる相互作用因子として ARNT を同定した。DIM は AhR の転写活性化能に必要な ARNT とのヘテロダイマー形成を惹起しないことを見出した。一方、AhR と ER との相互作用に関しては典型的アゴニストと同様の促進効果が見られた。さらに、特異的な ER 機能阻害の意義を個体レベルで検討を進め、マウスにおいてエストロゲン標的遺伝子誘導が顕著に阻害されることを見出した。以上より本成果は ER 蛋白分解機構の一端を示した。特異的化合物による AhR-ARNT ヘテロダイマー化の人工的な調節を見出したことから、本知見は、ER 機能抑制に選択的な AhR リガンドをスクリーニングする上での分子基盤を提供すると考えられる。

F. 健康危険情報

該当する情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS One* Jan 8;9(1):e85267, 2014
- 2) Matsuo T, Komatsu M, Yoshimaru T, Kiyotani K, Miyoshi Y, Sasa M, Katagiri T. Involvement of B3GALNT2 overexpression in cell growth of breast cancer. *Int J Oncol.* Feb;44(2):427-34, 2014
- 3) Low SK, Takahashi A, Ashikawa K, Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide association study

- of breast cancer in the Japanese population. *PLoS One*. Oct 15;8(10):e76463, 2013
- 4) Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Chen YA, Murakami Y, Mizuguchi K, Mizohata E, Inoue T, Akiyama M, Miyoshi Y, Sasa M, Nakamura Y, Katagiri T. Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nat Commun.*;4:2443, 2013
 - 5) Yanai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Yagi T, Ichii S, Takatsuka Y, Ito T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y. Influence of body mass index on clinicopathological factors including estrogen receptor, progesterone receptor, and Ki67 expression levels in breast cancers. *Int J Clin Oncol*. In press.
 - 6) Kajita Y, Kato T Jr, Tamaki S, Furu M, Takahashi R, Nagayama S, Aoyama T, Nishiyama H, Nakamura E, Katagiri T, Nakamura Y, Ogawa O, Toguchida J. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One.*;8(1): e49709, 2013
 - 7) Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K.I, Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to Cells*. 18(12):1120-1130, 2013.
 - 8) Kato, K., Nakajima, K., Ui, A., Muto-Terao, Y., Ogiwara, H. and Nakada, S. Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice. *Mol Cell*. 53, 617-630, 2014
 - 9) 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, 2013
 - 10) Hanamura T, Niwa T, Nishikawa S, Konno H, Gohno T, Tazawa C, Kobayashi Y, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. *Breast Cancer Res. Treat.* 139(3): 731-740, 2013.
 - 11) Fujiki N, Konno H, Kaneko Y, Gohno T, Hanamura T, Imami K, Ishihama Y, Nakanishi K, Niwa T, Seino Y, Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen response element-GFP (ERE-GFP) introduced MCF-7 cells demonstrated the coexistence of multiple estrogen-deprivation resistant mechanisms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 139: 61-72, 2014(Jan).
 - 12) Hanamura T, Niwa T, Gohno T, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism pathways in hormone responsive primary breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 143(1): 69-80, 2014(Jan).
 - 13) Yamaguchi Y, Seino Y, Takei H, Kurosumi M, and Hayashi S. Detection of estrogen-independent growth-stimulating activity in breast cancer tissues: implication for tumor aggressiveness. *Cancer Microenvironment*, in press, 2014.
 - 14) Higuchi T, Gohno T, Nagatomo T, Tokiniwa

- H, Niwa T, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Hayashi S. Variation in use of estrogen receptor a gene promoters in breast cancer compared by quantification of promoter-specific mRNA. *Clin. Breast Cancer*, in press, 2014.
- 15) Wali N, Hosokawa K, Malik S, Saito H, Miyaguchi K, Imajoh-Ohmi S, *et al.* Centrosomal BRCA2 is a target protein of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biochem Biophys Res Commun*,443:1148-1154, 2014
- 16) Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, *et al.* Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array. *J Clin Bioinforma*,4:3, 2014
- 17) Takaoka M, Saito H, Takenaka K, Miki Y, Nakanishi A. BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC. *Cancer Res*,74:1518-1528, 2014
2. 学会発表
- 1) 片桐豊雅 :New insight into therapeutic strategies for acquired endocrine resistant breast cancer. 第72回日本癌学会総会(シンポジウム) 2013.10.3-5, 横浜市
- 2) 松尾泰佑、尾野雅哉, 吉丸哲郎、小松正人、三好康雄、笹三徳、片桐豊雅: がん特異的糖転移酵素 BCGT1 による小胞体ストレス制御を介した新規乳癌細胞増殖機構の解明. 第72回日本癌学会総会(ポスター) 2013.10.3-5, 横浜市
- 3) Masato Komatsu, Tetsuro Yoshimaru, Taisuke Matsuo, Kazuma Kiyotani, Miyoshi Yasuo, Sasa Mitsunori and Toyomasa Katagiri: Nuclear-19S proteasome associated gene 1 contributes to the aggressiveness of triple negative breast cancer cells. 第72回日本癌学会総会(口演) 2013.10.3-5, 横浜市
- 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: エストロゲン受容体活性化制御分子 ERAP1 と腫瘍抑制因子 REA の相互作用を標的とした内分泌療法耐性乳癌の治療法の開発. 第72回日本癌学会総会(口演) 2013.10.3-5, 横浜市
- 5) 片桐豊雅: トリプルネガティブ乳癌におけるプロテアソーム関連因子 PAG1 による新規増殖機構の解明. 第21回日本乳癌学会学術総会(口演) 2013.6.27-29, 浜松市
- 6) 松尾 泰佑、吉丸 哲郎、片桐 豊雅:新規糖転移酵素 BCGT1 による小胞体ストレス応答制御を介した乳癌細胞増殖機構の解明. 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会(口演) 2013.6.12-14, 京都市
- 7) 小松 正人、吉丸 哲郎、松尾 泰佑、中村 祐輔、片桐 豊雅:ゲノムワイドな網羅的遺伝子発現情報解析を用いたトリプルネガティブ乳癌(TNBC)の分子特性および新たな治療標的の探索 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会(口演) 2013.6.12-14, 京都市
- 8) 吉丸 哲郎、小松 正人、松尾 泰佑、片桐 豊雅:ER α 活性化制御分子 ERAP1 を標的とした内分泌療法耐性乳癌の治療戦略. 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会(口演) 2013.6.12-14, 京都市
- 9) 太田智彦 : DNA 損傷応答における BRCA1、Claspin および HERC2 の相互作用. 第65回日本細胞生物学会大会シンポジウム、2013年6月
- 10) 太田智彦 : Homology-directed DNA repair competence as a possible biomarker for breast cancer chemosensitivity. 第11回日本臨床腫瘍学学会集会ワークショップ、2013年

8月

- 11) 太田智彦: DNA 損傷応答と BRCA1 ユビキチンリガーゼ. 第 86 回日本生化学学会大会シンポジウム、2013 年 9 月
- 12) 太田智彦: BRCA1-E3 inactivation leads to a failure of homologous recombination DNA repair in response to CPT-11 and PARPi. 第 72 回日本癌学会学術総会インターナショナルセッション、2013 年 10 月
- 13) Kiyoko Kato, Kazuhiro Nakajima and Shinichiro Nakada. Fine tuning of chromatin ubiquitination by the deubiquitinating enzyme OTUB2 controls DNA repair. Ataxia-Telangiectasia Workshop, 2013 年 7 月 28-30 日 バーミンガム、UK
- 14) Kiyoko Kato, Kazuhiro Nakajima and Shinichiro Nakada. The deubiquitinating enzyme OTUB2 tunes chromatin ubiquitination to control DNA repair. 2013 年 10 月 7-11 日、EMBO conference, Cape Sounio, Greece
- 15) Shinichiro Nakada. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by the deubiquitinating enzyme OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. Replication, repair and transcription: Coupling mechanism and chromatin dynamics for genome integrity. 2014 年 2 月 4-5 日、京都
- 16) 中田慎一郎 脱ユビキチン化皇孫による DNA2 本鎖損傷応答制御機構 細胞生物学会 2013 年 6 月 19 日-21 日 名古屋
- 17) 林慎一: 再発乳癌に対する新たな治療の可能性. Breast Cancer Round Meeting 2013 (仙台) 2013 年 4 月 5 日
- 18) Toru Hanamura, Toshifumi Niwa, Sayo Nishikawa, Hiromi Konno, Tatsuyuki Gohno, Chika Tazawa, Yasuhito Kobayashi, Masafumi Kurosumi, Hiroyuki Takei, Yuri Yamaguchi, Ken-ichi Ito, Shin-ichi Hayashi: The androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. American Association for Cancer Research ANNUAL MEETING 2013 (Washington) April 6-10, 2013
- 19) 林慎一: 閉経後進行・再発乳癌に対する薬物療法. Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Sendai (仙台) 2013 年 5 月 14 日
- 20) 林慎一: ホルモン療法耐性機序の多様性と新たな治療戦略. 第 25 回日本内分泌外科学会総会シンポジウム (山形) 2013 年 5 月 24 日
- 21) 林慎一: アロマターゼ阻害剤耐性機序と新規治療の可能性. 第 17 回がん分子標的治療学会ランチョンセミナー (京都) 2013 年 6 月 14 日
- 22) 藤井里圭、花村徹、丹羽俊文、石田孝宣、大内憲明、林慎一: アンドロゲン受容体 (AR) 依存性増殖を示すアロマターゼ阻害剤 (AI) 耐性モデル乳癌細胞株. 第 21 回日本乳癌学会学術総会 (浜松) 2013 年 6 月 27~29 日
- 23) 花村徹、丹羽俊文、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一: 閉経後ホルモン感受性乳癌における Androgen 代謝による Aromatase 非依存性 ER 活性化機構と新規治療の可能性. 第 21 回日本乳癌学会学術総会 (浜松) 2013 年 6 月 27~29 日
- 24) 樋口徹、遠藤恵、花村徹、郷野辰幸、丹羽俊文、山口ゆり、堀口淳、竹吉泉、林慎一: Estrone Sulfate 依存性 Aromatase Inhibitor 耐性ヒト乳癌細胞株の増殖機構. 第 21 回日本乳癌学会学術総会 (浜松) 2013 年 6 月 27~29 日
- 25) 林慎一: Luminal 型乳癌のトランスレーショナルリサーチについて. 第 21 回日本乳癌学会学術総会シンポジウム (浜松) 2013 年 6 月 28

- 目
- 26) 林慎一：ER 陽性閉経後乳癌治療と Clinical Question. Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Sendai (仙台) 2013 年 7 月 2 日
- 27) 藤井里圭、花村徹、丹羽俊文、笹野公伸、石田孝宣、大内憲明、林慎一：アンドロゲン受容体依存性増殖を示すアロマターゼ阻害剤耐性モデル乳癌細胞. 第 14 回ホルモンとがん研究会 (東京) 2013 年 7 月 12~13 日
- 28) 樋口徹、長友隆将、郷野辰幸、時庭英彰、丹羽俊文、堀口淳、小山徹也、竹吉泉、林慎一：Estrogen Receptor alpha (ER α) 遺伝子の promoter usage の乳癌再発評価因子としての可能性. 第 22 回乳癌基礎研究会 (三重) 2013 年 7 月 20 日
- 29) 林慎一：ホルモン療法耐性の分子機序とその克服の戦略. Breast Cancer Scientific Exchange Meeting in Tokyo (東京) 2013 年 7 月 27 日
- 30) Toru Hanamura, Toshifumi Niwa, Tatsuyuki Gohno, Masafumi Kurosumi, Hiroyuki Takei, Yuri Yamaguchi, Ken-ichi Ito, Shin-ichi Hayashi : Aromatase independent steroid metabolic pathways activate ER α in hormone receptor positive primary breast cancers. The 11th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology (Sendai) August 29-31, 2013
- 31) 林慎一：AI 耐性メカニズムの多様性とその克服に向けて. 第 10 回日本乳癌学会中国四国地方会 ランチョンセミナー (山口) 2013 年 9 月 21 日
- 32) 木村万里子、花村徹、樋口徹、藤井里圭、郷野辰幸、丹羽俊文、遠藤格、林慎一：ホルモン療法耐性乳癌における P13K/Akt/mTOR シグナル系とアンドロゲン代謝産物に関連したエベロリムスの有効性. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 33) 林慎一、山口ゆり：シンポジウム. ホルモン療法耐性乳癌の機序解明とその克服に向けて. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 34) 高信純子、丹羽俊文、品川優理、郷野辰幸、山口ゆり、林慎一：エストロゲン受容体陽性乳癌細胞における膜型エストロゲン受容体の役割. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 35) 藤井里圭、花村徹、丹羽俊文、笹野公伸、石田孝宣、大内憲明、林慎一：アンドロゲン受容体シグナルを主要増殖因子とするアロマターゼ阻害剤耐性モデル乳癌細胞. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 36) 内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、田中美穂、山口ゆり、林慎一：乳癌細胞における癌幹細胞性とホルモン療法耐性の関係. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 37) 山口ゆり、須田哲司、武井寛幸、黒住献、黒住昌史、林慎一：乳癌の微小環境におけるエストロゲン非依存性の増殖促進因子. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 38) 浅利陽佑、高信純子、品川優理、丹羽俊文、山口ゆり、林慎一：乳癌細胞の ER を活性化させるタバコ煙成分の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 39) 唯野良介、稲葉綾香、山口ゆり、林慎一：ER 陽性乳癌におけるエストロゲン依存性の FOXF1 の発現. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 40) 金子陽介、花村徹、藤井里圭、丹羽俊文、林慎一：フルベストラント耐性を獲得した ER 陽性乳癌細胞株の特性. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3~5 日
- 41) 林慎一：ホルモン療法耐性の分子機序とその克服の戦略. Scientific Exchange Meeting (東

- 京) 2013年10月5日
- 42) 林慎一：AI 剤耐性機序と治療選択. Osaka Breast Cancer Workshop 2013 (大阪) 2013年10月19日
- 43) 林慎一：乳癌ホルモン療法の基礎～耐性獲得のメカニズムとその克服に向けて～. 第49回北九州乳腺カンファレンス(福岡) 2013年11月1日
- 44) 林慎一：ホルモン療法耐性と細胞内シグナル経路—メカニズムから考える進行再発乳癌の治療選択. 第33回鹿児島乳癌研究会(鹿児島) 2013年11月29日
- 45) 長友隆将、郷野辰幸、樋口通、丹羽俊文、林慎一：1つのCpG部位におけるメチル化が乳癌のエストロゲン受容体 α (ER α)の転写に影響を与える. 第36回日本分子生物学会(神戸) 2013年12月3日～6日
- 46) 高信純子、丹羽俊文、守春菜、郷野辰幸、山口ゆり、林慎一：乳癌細胞膜型エストロゲン受容体のエストロゲンに対する構造認識性と細胞内信号系の解析. 第36回日本分子生物学会(神戸) 2013年12月3日～6日
- 47) Toru Higuchi, Megumi Endo, Toru Hanamura, Tatsuyuki Gohno, Toshifumi Niwa, Yuri Yamaguchi, Jun Horiguchi, Izumi Takeyoshi, Shin-ichi Hayashi : Contribution of Estrone Sulfate to Aromatase-resistant Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium(SABCS)(San Antonio, USA) December 10-14,2013
- 48) Kurozumi S, Yamaguchi Y, Matsumoto H, Takei H , Hayashi S, Yanagisawa J, Horiguchi J, Takeyoshi I, and Kurosumi M : Immunohistochemical expression of ubiquitin ligase CHIP(carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) as a significant prognostic marker in post-menopausal invasive breast cancer. SanAntonio Breast Cancer Symposium 2013 (SanAntonio, USA) December 10-14,2013
- 49) Rika Fujii, Toru Hanamura, Toshifumi Niwa, Yuri Yamaguchi, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Noriaki Ohuchi, Shin-ichi Hayashi : Androgen receptor signal acquired oncogenic role in aromatase inhibitor resistant model of breast cancer cell. CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium(SABCS)(SanAntonio,USA) December 10-14,2013
- 50) 三木義男；新規BRCA機能とそれに基づく合成致死療法の開発. 第51回日本癌治療学会学術集会シンポジウム、京都市、2013年10月24日 - 26日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
名称：アンドロゲンレセプター依存性乳癌細胞株の作成方法、該当細胞株を用いたスクリーニング方法、ならびに乳癌患者におけるアンドロゲンレセプター依存性獲得の判定方法、キット及びマーカー
発明者：林 慎一、藤井里圭
権利者：東北大学
種類：特許
番号：2013-108774
出願年月日：2013年5月23日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分子プロファイリングによるトリプルネガティブ乳癌関連分子の同定とその機能解析

研究分担者 片桐 豊雅 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター

ゲノム制御分野 教授

研究要旨

今や乳癌は日本女性が最も罹りやすい癌であり、一部の乳癌や進行・再発症例においては治療耐性が生じ難治性でその予後は極めて悪い。このような癌に対する対策が極めて重要で、特に、厚生労働行政において「がん難民」といわれる難治性癌患者の救済は喫緊の課題である。本研究では、難治性乳癌であるトリプルネガティブ(TN)乳癌の発症および進展メカニズムの解明、治療法の確立のため、次世代シーケンス解析および網羅的遺伝子発現解析を組み合わせることで、TN乳癌の発症および進展に関与する新規遺伝子を同定することを目的としている。さらに、それら新規遺伝子産物を標的とした治療薬を開発することを最終的な目標とする。

A. 研究目的

難治性乳癌のうち、エストロゲン受容体(ER)・プロゲステロン受容体(PgR)・Her2の陰性であるトリプルネガティブ(TN)乳癌は生物学的悪性度が高く、上記受容体を標的とする内分泌療法では制御不能で、確立した治療法がないことから、現在その治療としてはタキサン系、アルキル化剤やプラチナ製剤などの細胞毒性化学療法が主に行われているが、これらには高い反応性を示す反面、比較的早期に転移・再発をきたす症例も多く、革新的な新規治療法の開発が切望されている。本研究は、次世代シーケンサー(NGS)による全エクソン解析とDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を通じて、TN乳癌の発症および進展に関与する新規遺伝子を同定し、それらを標的とした新たな治療薬の開発を進めることで、厚生労働行政において「がん難民」といわれる難治性癌

患者の救済に大きく貢献するとともに無駄な医療の回避、医療費の軽減に繋げ、国民の保健医療に関する行政施策に活用することを目的とする。

今年度は、前年度に行ったTN乳癌12症例のエクソーム解析によって検出された体細胞変異を追加症例にて検証することおよび、網羅的遺伝子発現解析を通じて新たながん特異的遺伝子を同定し、その機能解析を進め、新規治療薬開発のための基盤的データを得ることを目指した。

B. 研究方法

1. 追加TNBCのNGSによるエクソーム解析

前年度行ったTN乳癌臨床検体12症例を対象としたエクソーム解析にて、体細胞変異の認められた遺伝子群について、追加TN乳癌24症例によるreplicationシーケンス解析を行った。

2. 前年度行った網羅的遺伝子発現解析による新

規癌特異的遺伝子の同定と機能解析

- 1) 前年度行った TN 乳癌と正常乳腺組織および正常臓器における発現解析を通じて、心臓・肺・肝臓・腎臓にて発現が極めて低く、乳癌症例にて高頻度に発現亢進を認める新たな「癌特異的遺伝子」を選抜した。
- 2) 「癌特異的遺伝子」特異的 RNA 干渉にて細胞増殖抑制効果について調べた。
- 3) 過剰発現系にて細胞増殖に与える影響を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト遺伝子解析研究を含んでいる。解析対象となる乳癌患者由来の臨床検体やヒトゲノム試料等については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び同日通知の「同指針の施行等について」に基づいて、「遺伝子解析等に関する標本採取に関する同意書」を倫理委員会に提出し、すでに承諾を受けている（「ゲノム解析による腫瘍関連遺伝子の探索」にて、徳島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に係る倫理審査会にて承認済み）。現在まで、その同意書に基づく説明を試料提供者に行い、同意を得られた症例から試料を採取し保管している。われわれは、「指針」に則り、匿名化された検体のみを用い、患者のプライバシー保護を配慮した実験計画のもとで行っている。

C. 研究結果

1. 本年度は前年度に行った TN 乳癌臨床 12 検体を用いたエクソーム解析にて体細胞変異を認めた遺伝子群を対象として、追加 TN 乳がん 24 症例による replication シーケンス解析を行った。その結果、これまでに TN 乳癌にて変異の報告のある TP53、BRCA2、PIK3CA、NF1 遺伝子にて、既報と同程度の頻度の体細胞変異を同定した。特に、癌抑制機能を有し、未だ変異の認められていない遺伝子 (BCMG1、BCMG2) について、それぞれ 10%以上の頻度にて体細胞変異を検出した。

2. 前年度に行った TN 乳癌 48 症例・正常乳腺組織 13 例および生命維持に重要な正常臓器である心臓・肺・肝臓・腎臓の網羅的遺伝子発現解析をデータ通じて、TN 乳癌にて高頻度に発現亢進し、正常臓器では発現を認めない新規の「癌特異的分子」として、糖転移酵素をコードする B3GALNT2 を同定した。B3GALNT2 高発現 TN 乳癌細胞株 (BT-20) を用いた RNA 干渉法実験にて、その発現を抑制した結果、アポトーシスが誘導されることで顕著な細胞増殖抑制効果が認められた (図 1 下段)。また、B3GALNT2 を HEK293T 細胞に過剰発現した結果、他の多くの糖転移酵素と同様にゴルジ体に局在し、さらにその培養上清に分泌されることがわかった。

D. 考察

1. 前年度に行った TN 乳癌 12 症例におけるエクソーム解析を通じて同定された TP53、BRCA1、BRCA2、PIK3CA、NF1 遺伝子の体細胞変異の頻度は欧米の TN 乳癌の NGS 解析と同程度であった (Nature 2012;486:395-9)。この結果は、日本人の TN 乳癌も類似の分子特性を有するものと考えられる。しかしながら、これまでに癌抑制機能を有することが報告されているが、本研究ではじめて体細胞変異を認めた BCMG1、BCGT2 遺伝子は、新たな TN 乳癌の分子特性を示すものであり、また欧米と日本の TN 乳癌の異なる特性を示すものであるかもしれない。

2. DNA マイクロアレイによる TN 乳癌の発現情報解析を通じて、今回新たに同定した癌特異的糖転移酵素 B3GALNT2 遺伝子 K は、RNA 干渉実験による発現抑制により、アポトーシス誘導による顕著な細胞増殖抑制を認め、TN 乳癌細胞増殖に重要な役割を担うことが示唆され、B3GALNT2 を分子標的とすることで副作用の少ない治療薬開発につながることを示唆された。さらに、B3GALNT2 は分泌タンパク質をコードすることから、B3GALNT2 を特異的に検出するシステムを開

発することで、B3GALNT2 阻害剤開発された後の、その効果判定のための診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。

E. 結論

本年度は、前年度に同定していたTN乳癌関連遺伝子群を新たな臨床検体を用いたエクソーム解析および網羅的発現解析による新規TN乳癌関連分子の同定とその機能解析を進めた。その結果、既報の体細胞変異を認める遺伝子群および新規のTN乳癌の癌化に関与する可能性ある遺伝子(BCGT1、BCGT2)を同定した。さらに網羅的遺伝子発現解析により、TN乳癌に共通して発現亢進を認め、正常臓器では発現の極めて低い、癌特異的糖転移酵素を同定した。これらの結果は、TN乳癌の癌化、進展の分子機構の解明およびこれら癌特異的分子を標的とすることで副作用の少ない治療薬開発につながるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS One* Jan 8;9(1):e85267, 2014
- 2) Matsuo T, Komatsu M, Yoshimaru T, Kiyotani K, Miyoshi Y, Sasa M, Katagiri T. Involvement of B3GALNT2 overexpression in cell growth of breast cancer. *Int J Oncol.* Feb;44(2):427-34, 2014
- 3) Low SK, Takahashi A, Ashikawa K,

Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide association study of breast cancer in the Japanese population. *PLoS One.* Oct 15;8(10):e76463, 2013

- 4) Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Chen YA, Murakami Y, Mizuguchi K, Mizohata E, Inoue T, Akiyama M, Miyoshi Y, Sasa M, Nakamura Y, Katagiri T. Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nat Commun.*4:2443, 2013
 - 5) Yanai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Yagi T, Ichii S, Takatsuka Y, Ito T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y. Influence of body mass index on clinicopathological factors including estrogen receptor, progesterone receptor, and Ki67 expression levels in breast cancers. *Int J Clin Oncol.* In press.
 - 6) Kajita Y, Kato T Jr, Tamaki S, Furu M, Takahashi R, Nagayama S, Aoyama T, Nishiyama H, Nakamura E, Katagiri T, Nakamura Y, Ogawa O, Toguchida J. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One.*8(1): e49709, 2013
- ##### 2. 学会発表
- 1) 片桐豊雅:New insight into therapeutic strategies for acquired endocrine resistant breast cancer. 第72回日本癌学会総会(シンポジウム) 2013.10.3-5.横浜市
 - 2) 松尾泰佑、尾野雅哉、吉丸哲郎、小松正人、三好康雄、笹三徳、片桐豊雅: がん特異的糖転移酵素 BCGT1 による小胞体ストレス制御を介した新規乳癌細胞増殖機構の解明. 第72回日本癌学会総会(ポスター) 2013.10.3-5, 横浜