

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 $\alpha$  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

#### 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、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が判明した。

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

1. Benzonase 添加 0.5%NP-40 バッファーにて HeLA 細胞を処理し、抽出した可溶化クロマチン分画を BARD1 抗体にて免疫沈降 BARD1 複合体と結合するヒストン修飾をスクリーニングしたと。  
2. siRNA によって HP1 $\gamma$  の発現を抑制した際の BARD1 と H3K9me2 の結合を免疫沈降・ウェスタンブロットにて解析した。

3. In vitro での BARD1 と HP1 $\gamma$  の結合を GST pull-down アッセイ、および Biacore 解析にて確認した。

4. Fine mapping を行い、BARD1 上の HP1 $\gamma$  結合部位を同定した。この結合部位に site-directed mutagenesis にて変異を加え、in vivo の免疫沈降および in vitro では Biacore 解析にて結合を解析した。

5. HP1 $\gamma$  と結合しない BARD1 の変異体は DNA 損傷局所に集積しないことを 293T の過剰発現系にてレーザーマイクロ照射法あるいは放射線照射を行った後、蛍光免疫染色法にて解析した。

6. BARD1 に対する shRNA と BARD1 変異体を同時に Doxycyclin 誘導性に発現する add-back システムにて BARD1 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 が集積してしまうことを解析した。

7. H3K9me2 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 の効果を解析した

(倫理面への配慮)

本年度は動物実験、臨床検体を用いた研究は行っていない。利益相反状態にある研究は存在しない。

### C. 研究結果

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ため、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。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 $\gamma$  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 依存的であるが、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。すなわち、この複合体は ATM 依存的に相同組換え修復を行う BRCA1 複合体であり、従来報告されていた ATM-ユビキチン経路を介した BRCA1-Abraxas(BRCA1-A)複合体はこれに拮抗するものと考えられる。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。

### D. 考察

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<sup>2</sup>、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。

### E. 結論

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。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K.I, Ohta T. *Genes to Cells*. 18(12):1120-1130, 2013.

#### 2. 学会発表

- 1) 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

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

DNA2 本鎖切断は、主に相同組み換え修復と非同末端結合により修復されている。一部の DNA 損傷性薬剤は、相同組み換え修復機構を欠損する細胞に特異的に細胞死を誘導することから、相同組み換え修復機構の人工的抑制は、抗腫瘍薬に対する増感法として期待できる。本研究では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であることを発見した。OTUB2 のノックダウンにより相同組み換え修復が抑制されることから、OTUB2 は DNA 損傷応答を利用した新たな薬剤標的分子の候補として期待できる。

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。現在利用されている抗腫瘍薬の多くに DNA 損傷の誘導が作用機序として含まれている。しかし、DNA 傷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、高濃度の薬剤を使用すると強い副作用が発生する。

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 阻害剤により PARP1 依存性の DNA 修復機能を抑制すると、DNA 2 本鎖損傷が蓄積するが、正常細胞では、これらの損傷は相同組み換え修復経路により修復される。しかし、相同組み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 PARP1 阻害剤により

発生した DNA 損傷が修復されず、細胞は死滅する。正常細胞と BRCA1/BRCA2 変異細胞とでは、PARP1 阻害への感受性が大きく異なることから、PARP1 阻害剤は BRCA1 や BRCA2 が変異した難治性乳癌の新たな治療法として期待されている。

相同組み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。たとえば、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み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、これも相同組み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。

## B. 研究方法

本研究では、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。

### (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って行った。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

siRNA を用いて OTUB2 をノックダウンした細胞をネオカルチのスタチン (NCS : DNA2 本鎖損傷を誘導する薬剤) 処理後時間を追って固定し、conjugated ubiquitin 特異抗体や DNA2 本鎖損傷応答関連分子に特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。OTUB2 ノックダウン細胞では、NCS 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 (non-targeting siRNA をトランスフェクトした細胞) 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。一方、OTUB2 を過剰発現させた細胞では、DNA2 本鎖損傷部位でのユビキチン化および RAP80 の集積が OTUB2 の脱ユビキチン活性依存性に抑制された。

次に、OTUB2 が相同組み換え修復に与える影響について解析を行った。DNA2 本鎖損傷のマーカーとして汎用されているリン酸化 H2AX ( $\gamma$  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 (DNA2 本鎖損傷の減少を反映していると考えられる) ことが示された。Neutral comet assay により細胞一個あたりの DNA2 本鎖損傷量を測定したところ、NCS 処理後 2 時間での 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た。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 (相同組換え修復で DNA2 本鎖損傷が修復されると GFP

が発現するレポーターアッセイ) 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ていた。さらに、OTUB2 ノックダウン細胞では、DNA end resection により作り出された一本鎖 DNA に結合する RPA や、RPA と交換される形で一本鎖 DNA に結合して姉妹染色分体との recombination を担う分子である 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。

#### D. 考察

これらの結果から、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。

#### E. 結論

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1) 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

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

##### 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

#### 2) 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、前年度までに合計 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。本年度はさらに新たな機序を持つものとして Type 6 細胞を樹立し、その機序について解析した。その結果、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が示された。さらに乳癌臨床検体においてもこのような機序の乳癌症例が実在することも示唆された。また、これら耐性株を親株として、2 次治療として想定される fulvestrant や mTOR 阻害剤に対する耐性細胞も樹立した。

A. 研究目的

Luminal 型 (ER 陽性) 乳癌や Her2 乳癌は、それぞれアロマタ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る複数のアロマタ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. 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があるのではないかと推察された。

2. 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, Type 4, Type 5) の細胞増殖を有意に抑制したが、一方で、Type 2 や Type 3, Type 6 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、fulvestrant 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。

## 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。

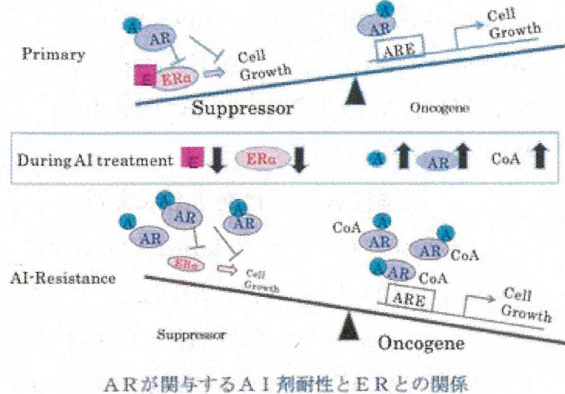


図 1

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。図 1 に示すように、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。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

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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.
  - 3) 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).
  - 4) 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).
  - 5) 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.
  - 6) 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.
2. 学会・研究会発表
    - 1) 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
    - 2) 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
    - 3) 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
    - 4) 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
    - 5) 林慎一：アロマト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
    - 6) 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トターゼ阻害剤 (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
    - 7) 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
    - 8) 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
- 9) 林慎一：Luminal 型乳癌のトランスレ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 日
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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 $\alpha$ ) 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
- 13) 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
- 14) Toru Hanamura, Toshifumi Niwa, Tatsuyuki Gohno, Masafumi Kurosuni, Hiroyuki Takei, Yuri Yamaguchi, Ken-ichi Ito, Shin-ichi Hayashi : Aromatase independent steroid metabolic pathways activate ER $\alpha$  in hormone receptor positive primary breast cancers. The 11th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology (Sendai) August 29-31, 2013
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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回北九州乳癌カンファレンス(福岡) 2013年11月1日
- 28) 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
- 29) 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  $\alpha$ (ER $\alpha$ )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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 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

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に着目した。ER 分解促進因子の探索の結果、ある種の AhR 部分アンタゴニストが、AhR の転写活性化能をほとんど惹起しない用量において ER 分解を促進することが判明し、両者機能の間には明確な乖離が見られた。そこで本年度は上記の 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た。その結果、蛋白分解機能に特異的な AhR リガンドは、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。従って、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、転写活性化能を伴わずに ER 蛋白分解を促進する上で鍵となる分子機構であると考えられた。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た。その結果、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。

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。

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。その結果蛋白質分解特異的な化合物を見出した。そこで本年度は、この化合物を用いて ER 蛋白分解の分子機構解析を進め、さらに個体レベルでの応答を解析する。

## 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。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- $\alpha$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology, HC20)、抗 AhR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, H211)、抗 ARNT 抗体 (Abcam)、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。

共免疫沈降においては、上記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、相互作用因子は抗 ARNT 抗体 (Abcam)、抗 ER- $\alpha$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology, HC20)、抗 AhR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, H211) を用いて Western blotting により解析した。抗体クロソリンクは DSS (ThermoScientific) により行った。

細胞内ノックダウンにおいては、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。

### 3. クロマチン免疫沈降解析

MCF-7 細胞に、AhR リガンドを 40-80 分添加し、ホルマリン固定した。抗 AhR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, N-19)、抗 RNA polymerase II 抗体 (Millipore, 8WG16)、抗 Acetyl-H4 抗体 (Millipore) を用いて免疫沈降し、DNA を回収した。定量 PCR は ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) を用いた。

### 4. マウス組織での遺伝子・蛋白質発現解析

17 $\beta$ -estradiol (E2) (10  $\mu$ g/kg), Indigo (10-30 mg/kg), 3,3'-diindolylmethane (DIM) (30-100 mg/kg) 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 (QIAGEN) を用いて RNA を抽出、ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) にて定量 PCR に供した。また凍結組織は sonication (Tomy Seiko) により破碎し、蛋白質を抽出した。抗 ER- $\alpha$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology, MC20)、抗 AhR 抗体 (RPT1) を用いて Western blotting により解析した。

### (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. 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、

このような選択性の生じる分子機構を解析した。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ア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、転写活性化に必須な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。

方法としては、用量依存的なCYP1A1転写誘導とER分解促進とをプロットすることで、両者機能を乖離の有無を検討した。昨年度に同様の方法によってDIMとIDBとの機能的差異を示している。そこで今回は、ARNTノックダウン条件およびコ

ントロール条件下で、IDBを用量依存的に投与し、CYP1A1転写誘導とER分解促進を測定した。

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。その結果、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、3,3'-diindolylmethane (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 (10, 30 mg/kg), DIM (30, 100 mg/kg)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 $\beta$ -estradiol (E2) (10  $\mu$ 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

エストロゲン受容体 (ER) は乳癌克服に向けて重要な分子標的であり、本研究では新たなER機能阻害戦略の分子基盤構築のため、ER蛋白分解機構の解析に取り組んだ。これまでの結果から、AhRによる転写機能と蛋白分解促進能は独立した分子機能であると考えられた。

そこで本年度は、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。すなわち、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。

培養細胞における上記活性は、細胞培養条件などによる細胞周期やシグナル伝達経路等の実験的要因によっても変動する可能性がある。実際 DIM は高濃度でアゴニスト様に振る舞うと報告されている(Wihlen, Mol Can Res, 2009)が、本研究結果ではアゴニスト様活性を生じない用量で顕著な ER 分解活性を示している。この結果は、アゴニスト活性と ER 活性抑制効果が乖離するとした報告(Okino, Can Prev Res, 2009)とも合致している。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。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	9	e85267.	2014
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.	44	427-434.	2014
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.	8	e76463	2013
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
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	In press	2014

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	e49709	2013
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	1120-1130	2013
Kiyoko Kato, Kazuhiro Nakajima, Ayako Ui, Yuri Muto-Terao, Hideaki Ogiwara, Shinichiro Nakada	Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice.	Molecular Cell	53	617-630	2014
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	1-11	2013
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
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
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	69-80	2014
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

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
Wali N, Hosokawa K, Malik S, Saito H, Miyaguchi K, Imajoh-Ohmi S, <i>et al.</i>	Centrosomal BRCA2 is a target protein of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP).	Biochem Biophys Res Commun	443	1148-1154	2014
Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, <i>et al.</i>	Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array.	J Clin Bioinforma	4	3	2014
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