

201313047B

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24年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 三木 義男

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	1
三木 義男		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	28
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	32

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）
総合研究報告書

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、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)本研究では、次世代シーケンサーによるゲノム解析および DNA マイクロアレイによる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た。さらに、それら新規遺伝子を標的とした治療薬を開発することを最終的な目標とした。

(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、BRCA1 のユビキチンリガーゼ死活化乳癌に PARP 阻害剤が奏功すること、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤が 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。さらに、BRCA1 陰性であっても、BRCA1 非依存性の相同組換え修復が機能することで薬剤耐性を示す乳癌も多数存在する。このような腫瘍において、相同組換え修復を人為的に抑制できれば、抗腫瘍薬への感受性を回復させることができると考えられる。本研究では、相同組換え修復の促進分子を2つ新たに見いだした。そのうちの1つは BRCA1 陰性細胞において特異的に相同組換え修復を制御している可能性がある。

(3)エストロゲン応答性 GFP を安定導入した Luminal 型乳癌培養細胞株を親株として GFP を指標に合計6種類(Type 1~Type 6)の機序の異なるホルモン療法耐性細胞株を樹立した。Type 1~Type 3はそれぞれ特徴的な細胞内リン酸化経路の変化に依存した増殖を示した。Type 4~Type 6に関しては、細胞内のステロイド代謝の変化やアンドロゲンシグナルに適応した機序などが示された。これらのことから、ホルモン療法耐性には複数の複雑な機序が存在する可能性が示された。また、本研究では、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。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。次に AhR の転写活性化に必要な ARNT とのヘテロダイマー形成は DIM により惹起されず、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、AhR 依存性 ER 蛋白分解の作用明確化のため、個体レベルで検討の結果、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。

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) 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に活用することを目的とする。

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。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。
- 2) 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、DNA2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 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。53BP1 は DNA2 本鎖損傷部位に集積する代表的な分子である。53BP1 は RIF1 という分子とともに相同組換え修復を抑制している。BRCA1 の発現が抑制された細胞では、相同組換え修復が抑制されるが、ここからさらに 53BP1 の発現が低下すると、BRCA1 非依存性の相同組換え修復が起こる。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る。また、ES 細胞をモデルとした場合、シスプラチンに耐性となる。また、多くの乳癌において 53BP1 の発現が低下しており、

53BP1 発現が低下した乳癌の治療成績が悪いことも示されている。このことから、このような難治性乳癌に対する新たな治療ストラテジーの開発が必要だと考えられる。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

- 1) 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った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ことを目指す。

2) 本研究では、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。そのために ER 蛋白分解を促進する因子を探索し、ER 蛋白分解機構を明らかにする。

B. 研究方法

1. エクソーム・遺伝子発現情報解析

1) NGS によるエクソーム解析(H24 年度)

① TN 乳癌臨床検体 12 症例をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し、組織中の腫瘍の占有率が 80%以上と高いものを選抜した (非腫瘍細胞の割合が多いと癌細胞特異的なゲノム異常の検出力が低下するため)。

② 12 症例ずつの乳癌細胞および正常細胞より、それぞれゲノム DNA を抽出した。
③ ゲノム DNA のクオリティーを詳細に確認後、NGS によりエクソーム解析を行い、乳癌細胞で特異的に起こっているゲノム異常、各症例にて共通して変異の認められる遺伝子を選別した。

2) 追加 TNBC の NGS によるエクソーム解析 (H25 年度)

H24 年度に行った 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。

3) DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析 (H24 年度)

① TN 乳癌 48 症例 と正常乳腺組織 13 例をレーザーマイクロダイセクション法により乳癌細胞・正常乳管細胞のみを採取した。

② DNA マイクロアレイ解析を行った。

③ 生命維持に重要な心臓・肺・肝臓・腎臓の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、乳癌の発現情報解析を合わせて、「癌特異的遺伝子」を選抜した。

④ RNA 干渉実験にて細胞増殖抑制効果について調べた。

4) 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(H25 年度)

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、乳癌症例にて高頻度に発現亢進を認め、心臓・肺・肝臓・腎臓にて発現が極めて低い新規の「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内局在、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) 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 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 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。BARD1 と HP1 γ および Lys9 ジメチル化ヒストン H3 (H3K9me2) との結合は Benzonase 添加 0.5%NP-40 バッファーにて細胞を処理、可溶化クロマチンを BARD1 抗体にて免疫沈降、

ウェスタンブロットにて HP1 γ および H3K9me2 を同定した。*In vitro* での BARD1 と HP1 γ の結合は GST pull-down アッセイ、および Biacore 解析にて行った。BRCA1/BARD1 の DNA 損傷局所への集積は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行った。

2) これまでの知見を整理すると、正常細胞における相同組換え修復制御と、BRCA1 変異・53BP1 発現低下細胞における相同組換え修復とでは制御機構が異なることが予想される。正常細胞においては相同組換え修復に必須ではないが、BRCA1 変異・53BP1 発現低下細胞においては相同組換え修復に必須となる分子が存在すると考えられる。この分子を仮に X とした場合、分子 X の機能を正常細胞および BRCA1 変異・53BP1 発現低下細胞において抑制した場合、正常細胞では相同組換え修復に影響がおよぼずに、BRCA1 変異・53BP1 発現低下細胞においてのみ相同組換え修復が抑制されることになると予想される。分子 X を標的とする薬剤を用いると、BRCA1 非依存性相同組換え修復機能が保たれた難治性乳癌の PRAP 阻害剤やシスプラチンへの感受性を増強することが期待される。本研究では分子 X を発見するとともに、分子 X が相同組換え修復や薬剤感受性に及ぼす影響について、細胞生物学的・分子生物学的な解析を行った。また、DNA 損傷にตอบสนองして DNA 損傷部位に集積し、相同組換え修復を抑制する分子である RAP80 に着目し、新たな相同組換え修復促進因子の探索も行った。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。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

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。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。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。

2) ER の機能抑制に有効な選択的 AhR 活性化剤の探索

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 μM), 3-methylcholanthrene (3MC) (0.1-1 μM), 17β-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 μM), 3MC (0.1-1 μM) 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-α 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, HC20)、抗 AhR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, H211)、抗 ARNT 抗体 (Abcam)、抗 β-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 細胞内蛋白質相互作用解析

細胞内ノックダウンのため、UBCH5a, UBCH5b, UBCH5c, ARNT 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- α 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- α 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。抗体クロスリンクは DSS (ThermoScientific)により行った。

⑤ 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。

⑥ マウス組織での遺伝子・蛋白質発現解析

17 β -estradiol (E2) (10 μ 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- α 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)

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. 遺伝子組換え実験およ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

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) 平成 24 年度は TN 乳癌臨床 12 検体を用いた NGS によるエクソーム解析を行い、これまでの TN 乳癌におけるゲノム解析の報告と同様に、複数の TN 乳癌症例に共通して TP53, BRCA1, BRCA2, PIK3CA, NF1 遺伝子にて体細胞変異を認めることを確認した。また TN 乳癌の発症に関与の可能性のある新規の癌抑制候補遺伝子として 2 遺伝子 (BCMG1: Breast cancer mutated gene 1・BCMG2: Breast cancer mutated gene 2) にて、ともに複数例にて新たな体細胞変異を同定した。
- 2) H25 年度は前年度に行った TN 乳癌 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 乳癌 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) にて、それぞれ 10% 以上頻度にて体細胞変異を検出した。
- 3) TNBC48 症例・正常乳腺組織 13 例を対象に、DNA マイアレイによる TNBC・正常乳管の網羅的遺伝子発現情報解析を行った結果、TN 乳癌で発現亢進する 301 遺伝子、発現低下する 302 遺伝子を同定した。そのうち、発現亢進遺伝子の多くは細胞周期を正に制御する機能を、発現低下する遺伝子は、細胞外基質・接着などの機能を有していた。さらに、生命維持に重要な心臓・肺・肝臓・腎臓の網羅的発現情報から、104 個の TNBC にて高頻度の発現亢進を認める一方、正常臓器では発現を認めない癌特異的分子を同定した。そのうち、癌での報告のない細胞周期制御関連遺伝子 ASPM と CENP 遺伝子について TN 乳癌臨

床検体を用いた定量的 RT-PCR 法にてこれら遺伝子の発現を調べた結果、正常乳腺に比して TN 乳癌に共通して有意に発現亢進を認めた。続いて、TNBC 培養細胞株を用いた ASPM、CENPK に対する RNA 干渉法実験を行った結果、細胞周期の停止・アポトーシスが誘導されることで顕著に細胞増殖が抑制された。

- 4) 前年度に行った網羅的遺伝子発現解析データを通じて、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 B3GALNT2 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。また、B3GALNT2 を HEK293T 細胞に過剰発現したところ、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。

2. DNA 修復経路における合成致死解析

- 1) 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、①ヒト細胞において、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 に加え、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。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ことを明らかにした。②原発性乳癌 60 例の解析にて、化学療法で病理学的完全奏功をきたした乳癌に BRCA1 をはじめ DNA 相同組換え修復遺伝子のメチル化が高頻度に生じていた。③DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復において、DNA 損傷部位への BRCA1 の安定維持に必要な BARD1 を介した新規メカニズムを発見した。放射線照射し

た HeLa 細胞のスクリーニングにて Lys9 ジメチル化ヒストン H3 (H3K9me2) が BARD1 と有意に結合していることを見出した。この結合は HP1 γ を介しており、siRNA による HP1 γ の抑制で結合がはずれ、また ATM 依存的で ATM 阻害剤によって抑制される。さらに HP1 γ との結合を阻害する BARD1 のミスセンス変異体はレーザーマイクロ照射による DNA 二本鎖切断部位に集積できない。重要なことに抗癌作用が注目されている 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、また、殺細胞活性において Chaetocin および UNC0638 と PARP 阻害剤の相乗効果が認められた。

- 2) 難治性乳癌モデル (BRCA1 発現低下・53BP1 発現低下細胞) 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 が起こり、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。

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 (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 (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、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である 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。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

1) ER 陽性乳癌細胞のホルモン療法耐性機構

- 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 6 種類 (Type 1~Type 6) の機序の異なるホルモン療法耐性 (アロマトラーゼ阻害剤耐性) 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 (図 1)。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 16)。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 (3β 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 (論文 15)。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 17)。さらに 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、Type 6 耐性モデル細胞を樹立した。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あ

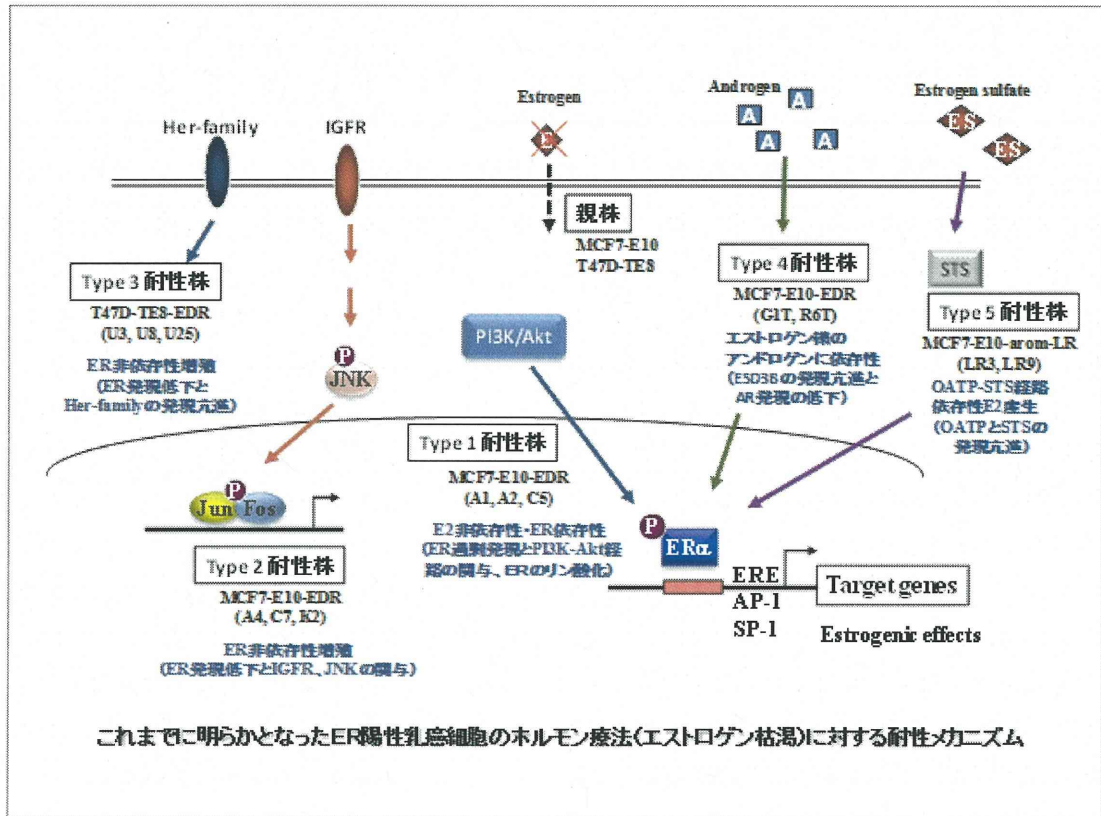


図 1

るのではないかと推察された。

- ③ ER 陽性乳癌が化学療法に耐性であることについて、ER 活性がタキサンチンの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 20)。
- ④ 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。さらに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、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。

- 2) Arylhydrocarbon receptor (AhR) 依存的な ER 蛋白分解の促進とその分子機構の解析

- 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 依存的な 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分子基盤を提供する上で重要である。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- α 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 μ 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 μ M)と最高用量においてほぼ同等の強度で ER- α 蛋白分解を促進した。ER- α 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- α 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, Can Prev Res, 2009)。しかしながら、この効果が蛋白質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 Can Res, 2009) がなされている。なお ER- α 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 μ M では 10 μ 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 蛋白分解促進機能・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 μ M)、indirubin (1, 10, 100 nM)、indigo (1, 10, 100 nM) 処理を行った。枯草菌由来 Spike RNA (Thr, Phe, Lys, Trpn, Dap) を標準に用いる測定方法により (Kanno J, et al., BMC Genomics, 2006)、細胞当たり mRNA コピー数を測定した。その結果、1) Indigo, indirubin が CYP1A1 mRNA コピー数を 60 倍以上増加させるのに対し、DIM の効果は 3 倍程度であること、2) 細胞内 ER- α と AhR mRNA のコピー数の比は約 2:1 とほぼ同水準であり、相互作用による蛋白分解制御が起こる上で妥当な量比であること、が明らかとなっ

た。各用量における ER 蛋白分解活性と遺伝子発現誘導活性をプロットしたところ、DIM において両者機能の明確な乖離が観察された。

④ DIM の ER 蛋白分解促進能に関する AhR 依存性の検討

DIM による ER 蛋白分解促進機能が AhR を介していることを確認するため、MCF7 細胞において AhR をノックダウンした。その結果、DIM による ER 蛋白分解の促進は AhR 依存性であることが示された。また、ユビキチン鎖イニシエーションに関わる E2 酵素である UBCH5 ファミリーをノックダウンした結果、DIM 依存性な AhR の蛋白分解が抑制されていた。この結果から、DIM の効果はユビキチン・プロテアソーム系を介した蛋白分解制御であることが示唆された。

⑤ 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、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と比較して、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。

⑥ 選択的な ER 蛋白分解を制御する相互作用因子としての 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 依存性な 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、用量依存性な 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。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 用量依存性な 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。

⑦ 蛋白分解に伴う ER 機能抑制の in vivo での評価

AhR 依存的 ER 蛋白分解促進作用の明確化を行った。上記解析により、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 (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 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 機能抑制の一端が明確化された。

D. 考察

1. エクソーム・遺伝子発現解析

1) 本研究にて行ったエクソーム解析を通じて同定した 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

癌も欧米と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。特に、BCMG1 遺伝子はキナーゼをコードしており、今回同定した体細胞変異が BCMG1 キナーゼ活性に影響することで、その癌抑制機能を失うことで癌化に寄与する可能性が示唆された。

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、H24 年度に同定した癌特異的細胞周期関連遺伝子 ASPM,CENPK は、RNA 干渉実験による発現抑制により、細胞周期の停止・アポトーシス誘導による細胞増殖抑制を認めた。さらに、H25 年度に新たに同定した癌特異的糖転移酵素 B3GALNT2 遺伝子も 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、ASPM,CENPK と同様に TN 乳癌細胞増殖に重要な役割を担うことが示唆された。このような癌特異的遺伝子 ASPM、CENPK、B3GALNT2 を分子標的とした治療薬は、既存の抗癌剤とは異なり、より副作用の少ない治療薬に開発につながると期待される。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 阻害剤開発された場合には、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) 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①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高いと思われる。乳癌の臨床検体を用いた実験としては上記②のメチル化解析に加え、新たに購入した次世代シーケンサーにて乳癌の化学療法奏功例と非奏功例における DNA 相同組換え修復遺伝子の体細胞変異を解析する。BRCA1 欠損と PARP 阻害剤による合成致死のメカニズムとして PARP 阻害剤による DNA 一本鎖損傷修復不全と BRCA1 欠損による DSB 修復不全が提唱されたが、PARP は DSB の修復にも関わっており、このモデルでは説明がつかない。最近、BRCA1 の損傷局所への早期のリクルートには BRCA1 と二量体を形成する BARD1 と、PARP によって形成される poly(ADP ribose)との結合が必要であることが示された (Cancer Cell, 23:693, 2013)。一方、我々は上記③のごとく、BRCA1 の安定維持に必要な H3K9me2/ HP1 γ /BARD1 を介したメカニズムを発見した。PARP 阻害剤による DNA 一本鎖損傷修復不全および BRCA1 早期リクルート不全と Chaetocin および 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) 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。

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の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) 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存在が示された。また、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 2 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。

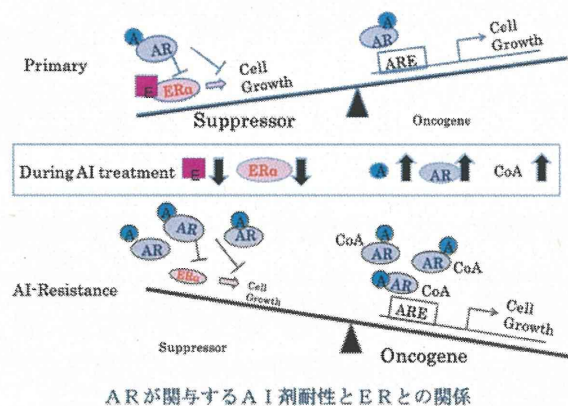


図 2

今回の多数の耐性株で示された耐性メカニズムの多様性と複雑さは、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。

- 2) 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。AhR 活性化による ER 蛋白分解の促進の分子機構を解析する上で、まず特異的リガンドの探索と解析を行った。その結果、AhR の転写促進機能を微弱にしか活性化しない部分アンタゴニストの一つが、ER 蛋白分解活性の強力なアゴニストとして機能することを見出した。この結果から、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。すなわち、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である。

さらに、AhR 依存的 ER 分解を制御する相互作用因子同定により、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、ロックダウンによりその関与を立証した。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。この知見は、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。

本研究では、AhR 依存性転写活性・蛋白分解活性が少なくとも一つの条件下で乖離することを見出した。様々な条件下での影響評価については今後検討が必要と考えられる。培養細胞における AhR 依存性転写活性・蛋白分解活性は、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、転写制御活性と乖離した ER 機能阻害を有する低分子リガンドの探索系の構築に期待される。

また、蛋白分解に選択性を有する低分子リガンドは、ER 蛋白分解機構を解析する上での有効なモデル系になるものと期待される。そこで今後はこの系をモデル系として、さらなる分解促進因子や関連因子の同定や、分子機構解析を進める。

E. 結論

1. エクソーム・遺伝子発現解析

1) 本研究では、TN 乳癌臨床検体を用いた NGS によるエクソーム解析および網羅的発現解析による TN 乳癌関連分子の同定と創薬のための機能解析を進めた。その結果、エクソーム解析では既報の TN 乳癌において体細胞変異を認める遺伝子および新規の TN 乳癌の癌化

に關与する可能性ある遺伝子 (BCGT1、BCGT2) を同定した。

2) さらに網羅的遺伝子発現解析により、TN 乳癌に高頻度に発現亢進を認め、正常臓器では発現の極めて低い、癌特異的細胞周期関連遺伝子 (CENPK, ASPM) および糖転移酵素 (B3GALNT2) 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) BRCA1 のユビキチンリガーゼ死活化乳癌に CPT-11 と PARP 阻害剤が奏功すること、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤が H3K9me 依存的な BRCA1/BARD1 の損傷局所への誘導を阻害、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、BRCA1 発現低下・53BP1 発現低下を示す難治性乳癌モデルにおいて RNF8 が相同組換え修復を制御していることが明らかとなった。また、脱ユビキチン化酵素 OTUB2 が新たな相同組換え修復促進因子として同定された。これら 2 つの分子は、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可能性が示された。

3. ホルモン療法耐性獲得機序の解明

1) 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 6 種類 (Type 1~Type 6) 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

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、第 6 の新たな耐性機序を持った細胞株(Type 6)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。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 活性がタキサンチンの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。また、こ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序に基づく ER 機能阻害戦略の基盤を構築するため、ER 蛋白分解機構を解析した。ER 蛋白分解促進を制御する因子 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 AhR 依存的 ER 蛋白分解を制御する相互作用因子として ARNT を同定し、ノックダウンにより立証した。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 蛋白分解作用を明確化するため、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,