

201438081A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

難治性乳癌のER非依存性病態の解明に基づく新規治療法の開発基盤研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 三木 義男

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、三木義男が実施した平成26年度「難治性乳癌のER非依存性病態の解明に基づく新規治療法の開発基盤研究」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告 (総括)	
難治性乳癌のER非依存性病態の解明に基づく新規治療法の開発基盤研究-----	1
三木 義男	
II. 委託業務成果報告 (業務項目)	
1. 分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定 -----	12
片桐 豊雅	
2. DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発 -----	15
太田 智彦	
3. DNA 損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発 (相同組換え抑制を利用した新規治療法開発のための研究) -----	18
中田 慎一郎	
4. ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用 -----	20
林 慎一	
5. プロジェクトの総合推進 -----	25
三木 義男	
III. 学会等発表実績 -----	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	33

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

難治性乳癌のER非依存性病態の解明に基づく新規治療法の開発基盤研究

業務主任者 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

「Triple Negative (TN) 乳がん」と「ホルモン療法耐性乳がん」は、エストロゲン非依存性の難治性乳がんである。これらを対象に、エストロゲン非依存性増殖の解明をさらに発展させ、それに基づく新規治療法開発を目指す。具体的には、(1) 分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定 (2) DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発、(3) ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用を柱に、難治病態の解明に基づく新規治療法の基盤開発に取り組む。分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定では、TN乳癌関連遺伝子群BCMG1、BCMG2、B3GALNT2とPAG1の機能解析を進めた。その結果、これらの遺伝子はTN乳がん化に加えて、luminal タイプの乳がんにおいても関与する可能性があることがわかった。癌特異的糖転移酵素B3GALNT2は、その糖鎖修飾によって分泌機能が制御されており、この糖鎖修飾の制御が治療薬の開発に繋がる可能性が示唆された。またプロテアソーム関連因子PAG1は、特に核に存在する場合には、より増殖促進に寄与することがわかり、この核PAG1を標的とすることで、効率のよい、副作用の少ない治療薬開発につながるものことが示唆された。また、DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発では、HDAC阻害剤はH3K9acとH4acを介してそれぞれBRCA1/BARD1と53BP1/RIF1の集積を阻害し、相同組換え修復と非相同末端再結合を阻害することを明らかにした。さらに、RINGE3-65がBRCA1陰性難治性乳がん治療における分子標的となるかを検証するために必要な細胞株の樹立に成功した。ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用では、これまでエストロゲン応答性GFPを安定導入したER陽性乳がん培養細胞株(MCF-7-E10,T47D-TE8)を親株としてエストロゲンシグナル応答性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）細胞株を樹立してきた。今回、その中でER発現が陰転化したものに着目し、TN乳がんとの関連性について検討し、TN乳がんのsubtypeと共通の性質を示すものを見出した。また、これらに対して既存の、あるいは今後臨床への導入が予定されている分子標的治療薬の効果を*in vitro*で検討し、それぞれの機序によるその効果の違いが明らかとなった。

担当責任者氏名	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

性乳がんである。これらを対象に、エストロゲン非依存性増殖の解明をさらに発展させ、それに基づく新規治療法開発を目指す。具体的には、(1) 分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定、(2) DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発、(3) ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用を柱に、難治病態の解明に基づく新規治療法の基盤開発に取り組む。

このため、国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人徳島大学、学校法人聖マリアンナ医科大学、国立大学法人大阪大学、国立大学法人東北大学は共同で業務を行う。このうち国立大学法人東京医科歯科大学では、プロジェクトの総合的推

A. 研究目的

「Triple Negative (TN) 乳がん」と「ホルモン療法耐性乳がん」は、エストロゲン非依存性の難治

進及び分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定、国立大学法人徳島大学では、分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定に関する研究、学校法人聖マリアンナ医科大学、国立大学法人大阪大学では、DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発に関する研究、国立大学法人東北大学では、ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用に関する研究を実施する。

## B. 研究方法（図1）

### ①分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定

ER 非依存性増殖による難治性乳癌である「Triple Negative (TN) 乳癌」を対象に、TN乳癌の生物学特性の解明と新規治療法開発研究を目的とする。具体的には、分子プロファイル情報を応用した新規治療分子標的の同定を通じて、ER 非依存性が引き起こす難治病態の解明とそれに基づく新規治療法の基盤開発に取り組む。本研究では、前助成（H24-H25）「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」にて同定したTN乳癌関連分子として、新規の体細胞変異陽性癌抑制遺伝子(BCMG1、BCMG2)、細胞周期関連遺伝子ASPM・糖転移酵素B3GALNT2及びプロテアソーム関連因子PAG1について体細胞変異の検証と機能解析を行う。

### ②DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発

ヒストン修復阻害剤によるDNA損傷応答阻害に関する基礎的解析を目的に、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤およびヒストン脱アセチル化阻害剤がヒストンH3のメチル化（H3K9me2）に与える影響、それによる、BRCA1/BARD1のDSB局所への誘導等に与える影響を解析する。また、前述の阻害剤とCPT-11、PARP阻害剤、プラチナ製剤などとの合成致死性を解析する。

③さらに、課題「DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発」のサブテーマとして「相同組換え抑制を利用した新規治療法開発のための研究」を行う。具体的には、相同組換え修復の制御に関わることを示してきたユビキチン関連分子RNF8やRNF168、OTUB2、OTUB1などが相同組換え修復を制御する分子機構を詳細に解析する。特にRNF8に注目し、BRCA1ノックアウト細胞（BRCA1

Δ11/Δ11）とBRCA1・RNF8ダブルノックアウト細胞における抗腫瘍薬に対する感受性の違いについて解析を行う。

### ④ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用

ホルモン療法耐性克服の新規治療標的の同定に関する研究開発を目的に、これまでに樹立したホルモン療法耐性細胞の細胞内シグナル伝達系の詳細を解析し、耐性と生存に決定的な因子を同定する。6種の耐性細胞について、マイクロアレイやエクソーム解析などの網羅的解析法を施行するとともに、PI3K-Akt経路や、MAPK系路、IGFR-JNK系路など主要な系路に絞った各種分子生物学的解析を行い、上記目的を達成する。さらにその候補因子を阻害する化学物質の分子標的薬としての可能性について検討する。

### ⑤プロジェクトの総合推進

プロジェクトを円滑に推進するため、半年に1回程度、参画機関が参加する推進会議を開催するなど、連携・調整を密に行う。

#### （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。

難治性乳がんのER非依存性病態の解明に基づく新規治療法の開発基盤研究  
計画

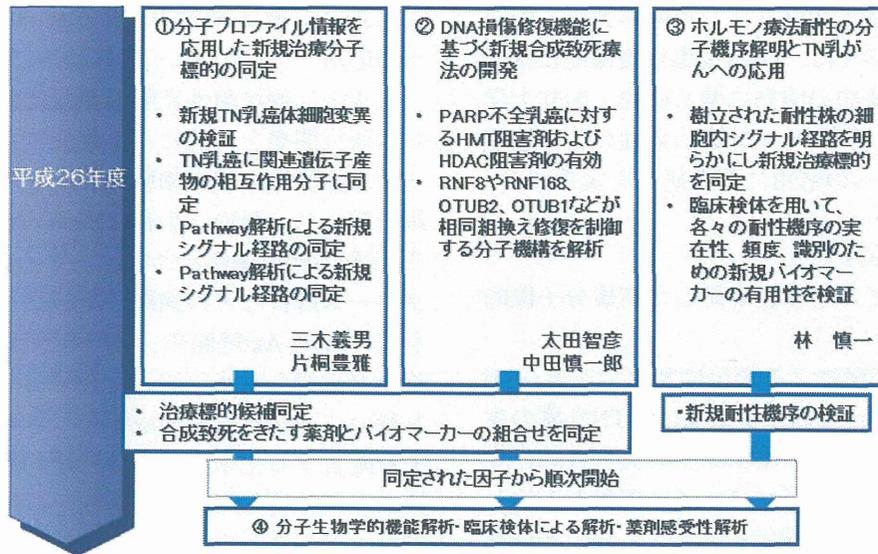


図 1

C. 研究結果

1. 分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定

(1) 本年度はluminal乳癌臨床69検体を用いてNGS解析によるターゲットシーケンスを行い、2症例において体細胞変異を同定した。

(2) 糖転移酵素B3GALNT2の機能解析

In silicoおよび生化学的解析を通じて同定した116番目と174番目のAsn残基におけるN型糖鎖修飾の分泌への関与を調べるために、これら残基のAlaに変異体をHEK293T細胞へ発現後、ウェスタンブロット法にて調べたところ、培養上清中におけるB3GALNT2の分泌量の減少を認めた。

(3) プロテアソーム関連因子PAG1の同定および機能解析

① 前助成にて同定したTNBCに共通して発現亢進を認めるプロテアソーム関連因子PAG1に対して、siRNA干渉実験にて、その発現を抑制した結果、経時的な細胞像証抑制効果が認められた。

② PAG1をNIH3T3細胞に過剰発現した際の細胞増殖を調べたところ、Mockベクターを導入した細胞に比して、有意な細胞増殖の促進を認めた。

③ PAG1特異的抗体を用いてTN乳がん細胞 (MDA-MB-231)におけるPAG1の局在を免疫細胞染色法に

て調べたところ、核と細胞質に強く染色される細胞が認められ、そのうち核染色を認める細胞は増殖マーカーであるKi67と共局在した。また、TN乳がん臨床組織を用いた免疫組織染色にて、PSMD2の高発現の認められる症例は、顕著な予後不良を認めた。特に、PSMD2核への染色が認められる場合 (核局在を認める細胞が10%以上ある)、 overall survivalとdisease free survivalともに顕著に低く、予後不良だった。

2. DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発

① 経時的な解析では、U2OS、MCF7細胞共にMS-275あるいはFK228の24時間の添加にてヒストンH3 Lys9の著明なアセチル化 (H3K9ac)が生じると同時にヒストンH3 Lys9のジメチル化(H3K9me2)をほぼ完全に抑制した。

② 濃度依存的な解析では、MS-275は2.5μM、FK228は2.5nMにて上述のH3K9acとH3K9me2の変化に加え、ヒストンH3 Lys56およびヒストンH4の著明なアセチル化(H3K56acおよびH4ac)を来すが、この際にDNA修復因子であるBRCA1, BARD1, RAD51, BRCA2, ATM, 53BP1, RIF1の発現には影響を与えないことを確認した。

③一方、HMT阻害剤であるUNC0638はH3K9me2を著明に抑制するものの、H3K9ac、H3K56acおよびH4acには影響を及ぼさないことが判明した。

④上述の条件下でDNA二本鎖切断を加え、1時間後のDNA修復因子の損傷局所への集積を解析したところ、UNC0638では相同組換え修復因子であるBRCA1、BARD1、RAD51の集積のみが阻害され、非相同末端再結合に必須な53BP1とRIF1の集積は阻害されないのに対して、MS-275およびFK228では両方の経路の修復因子の集積が著明に抑制された。

⑤DR-GFPによるgene conversion assayではMS-275、FK228およびUNC0638の全てで相同組換え能の低下を認めた。

⑥Clonogenic survival assayによる半数致死量は細胞株によって異なるが、MS-275は2~8 $\mu$ M、FK228は1.5~3nMであった。UNC0638がPARP阻害剤との相乗効果、すなわち合成致死性を示したのに対して、MS-275とFK228はいずれもU2OS、MCF7、HC T116およびHeLa細胞の全ての細胞において相乗効果を認めなかった。

### 3. 相同組換え抑制を利用した新規治療法開発のための研究

BRCA1 ノックアウト細胞では相同組換え修復が低下するため、相同組換えを利用した遺伝子ノックアウトを行うことができない。そこで、BRCA1 <sup>$\Delta$ 11/+</sup>・53BP1<sup>-/-</sup>から、RINGE3-65をノックアウトし、さらにBRCA1をノックアウトすることでBRCA1 <sup>$\Delta$ 11/ $\Delta$ 11</sup>・53BP1<sup>-/-</sup>・RINGE3-65<sup>-/-</sup>細胞の樹立に成功した。また、BRCA1 <sup>$\Delta$ 11/ $\Delta$ 11</sup>・53BP1<sup>-/-</sup>、BRCA1 <sup>$\Delta$ 11/ $\Delta$ 11</sup>、BRCA1 <sup>$\Delta$ 11/ $\Delta$ 11</sup>・RINGE3-65<sup>-/-</sup>、RINGE3-65<sup>-/-</sup>も作製した。

RINGE3-65を難治性乳がんの分子標的と考えた場合、RINGE3-65<sup>-/-</sup>（正常細胞がRINGE3-65阻害剤に処理された状態を示す）がRINGE3-65<sup>+/+</sup>よりも強く感受性を示す抗腫瘍薬は本研究において用いる抗腫瘍薬としては不向きであると考えられる。そこで、様々な抗腫瘍薬の中から、RINGE3-65<sup>+/+</sup>とRINGE3-65<sup>-/-</sup>が同等の薬剤感受性を示す薬剤を抽出した。また、薬剤感受性試験の本格的実施に備え、各細胞株のプレーティング効率を検証し、問題なく利用可能であることを確認した。

### 4. ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳が

んへの応用

1. これまでに樹立したホルモン療法耐性細胞6種は、大きく3つのジャンルに分類できた。すなわち、①エストロゲン枯渇下にあってもエストロゲン様活性を有するアンドロゲンの合成能を獲得、あるいは硫酸抱合型エストロゲンを積極的に利用するもの。②リン酸化などによるリガンドに依存しないERの活性化能を獲得したもの。③もはやERシグナル系に依存しない増殖を行うもの。これらの中で③はERの発現が低下、あるいは陰転化したもので、TN乳がんに関連がある可能性が考えられた。特に、Type 6と名付けられたT-47D細胞由来のものは、ERの陰転化とともにアンドロゲン受容体（AR）の発現と活性が強まっており、LAR-typeと呼ばれるTN乳癌のsubtypeと共通の性質が観察された。さらにAI剤治療後再発乳癌臨床検体を用いた検討においても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このような症例が実在することが示された。

2. ER発現が陰性化したホルモン療法耐性に対する次治療の可能性について検討するため、Type 2耐性細胞やfulvestrant耐性細胞を用いて、mTOR阻害剤や他の分子標的治療薬の効果について、in vitroで検討した。mTOR阻害剤everolimusは、ERが陰転化した細胞の増殖も抑制し、Akt-mTOR経路がER陰性細胞においてもdriver pathwayのひとつであることが示された。一方、このtype 2耐性細胞はJNK経路の関与が示唆され、JNK阻害剤が増殖抑制作用を示し、新たな治療標的となる可能性が示された。

前述のER陰性耐性細胞Type 6は、前立腺癌治療に用いられるARアンタゴニストが有用であることを示した。また、これらER陰性ホルモン療法耐性乳がん細胞に対しては分子標的治療薬単独よりもfulvestrantなどのホルモン療法薬の併用が効果的であることも示された。

3. さらに現在マウスのxenograftの系を用いてこれらの各種耐性細胞の機序の解析と治療法の検討を行っている。

### D. 考察

1. 分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定

これまでの結果から、癌抑制遺伝子BCMG1、B

CMG2はTN乳がんにて10%程度の体細胞変異を認めていたが、luminal乳がん69症例では2例ずつの体細胞変異を新たに同定した。今回同定した結果は、BCMG1、BCMG2はともにluminal乳がんにも認められることから、TN乳がんのみにある変異でなかった。また、未だこれらの遺伝子の変異が欧米ではないことから、日本人の乳がんに特徴的な活化機構であるかもしれない。

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同定した癌特異的糖転移酵素B3GALNT2遺伝子産物は、分泌機能を有し、その機構には自身の116番目と174番目Asn残基におけるN型糖鎖修飾が重要であることがわかった。

TN乳癌の発現情報解析を通じて発現亢進するpathwayにて共通に認められる分子PAG1を同定し、PAG1の発現亢進が細胞増殖を促進する機能を有し、その発現が核にて認められる場合に、予後が顕著に不良となることから、PAG1はTN乳がんの特徴を表わし、予後マーカーおよび治療標的としての可能性が示唆された。

## 2. DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発

DNA二本鎖切断の修復はBRCA1/BARD1がエラーのない相同組換え修復を誘導するのに対して、53BP1/RIF1がエラーを来しやすい非相同末端再結合を誘導し、この2つのメカニズムが拮抗して存在することが知られている。BRCA1/BARD1複合体にはいくつかの異なった複合体が存在するが、申請者らはこのうち、RIF1を阻害して相同組換え修復を誘導するBRCA1/BARD1複合体を損傷局所に集積させるためにHP1を介したBARD1とH3K9me2の結合が必須であることを明らかにした。一方、53BP1の損傷局所への集積にはメチル化H4K20と53BP1の結合が必須で、H4のアセチル化によってこの結合が阻害されることがこれまでに示されていた。本研究結果からHDAC阻害剤がH3K9acとH4acを介してそれぞれBRCA1と53BP1の集積を阻害し、相同組換え修復と非相同末端再結合を阻害する機序が明らかとなった。PARP阻害剤は相同組換え修復不全と合成致死性を来すが、本研究結果からもわかるように相同組換え修復と非相同末端再結合の両経路を阻害する場合には合成致死性を生じさせないものと考えられる。したがって、放射線療法

など、直接二本鎖切断を生じさせる治療法との併用に効果が期待される。

## 3. 相同組換え抑制を利用した新規治療法開発のための研究

相同組換え修復の回復により難治性となるBRCA1 陰性難治性乳がん細胞において、RINGE3-65を抑制することにより、相同組換え修復を抑制することができると考えられる。また、RINGE3-65の機能抑制により、BRCA1 陰性難治性乳がんを抗腫瘍薬に感受性に変換できる可能性があると考えられる。本研究において樹立した細胞株を用いて薬剤感受性試験を行うことで、その可能性を詳細に検証できると考えられ、来年度以降実施していく。

## 4. ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がんへの応用

壮年期女性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ER陽性乳がん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。一方、ER陰性のTN乳がんは有効な治療法の少ない予後の悪い難治性がんとして知られている。前述のホルモン療法耐性乳癌にはER発現が低下、消失するものも見られ、TN乳がんとの共通性が疑われる。我々の樹立したAI耐性細胞にも同様のものが見られ、AR依存性というTN乳がんの一部にみられるsubtypeと同様の性質を示したことは興味深い。

ER陰性ホルモン療法耐性乳癌に対する各種分子標的治療薬の効果を検討した結果、耐性機序の違いによって各々の効果は異なり、また、たとえER発現が低下してもホルモン療法との併用が有用であることが示された。これらの情報はTN乳がんの新規治療開発に有用な情報となり得る。

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がんの新規治療法開発が可能になることが期待され、さらに TN 乳がんの新規治療法開発に繋がる知見が得られることが期待される。また、これらの subtype 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、TN 乳がんも含めた乳癌患者のさらなる個別化を可能にし、治療の最適化、医療費の軽減にも繋がると思われる。

## E. 結論

### 1. 分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定

本年度は、これまでに同定していたTN乳癌関連遺伝子群BCMG1、BCMG2を新たな臨床検体を用いたターゲットシーケンス解析および網羅的発現解析にて同定したTN乳癌関連分子B3GALNT2とPAG1の機能解析を進めた。その結果、これらの遺伝子はTN乳がん化に加えて、luminal タイプの乳がんにおいても関与する可能性あることがわかった。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遺伝子として同定した、癌特異的糖転移酵素B3GALNT2は、その糖鎖修飾によって分泌機能が制御されており、この糖鎖修飾の制御が治療薬の開発に繋がる可能性が示唆された。またプロテアソーム関連因子PAG1は、TN乳癌の癌化、進展に関与し、特に核に存在する場合には、より増殖促進に寄与することがわかり、この核PAG1を標的とすることで、効率のよい、副作用の少ない治療薬開発につながるものことが示唆された。

### 2. DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発

HDAC阻害剤はH3K9acとH4acを介してそれぞれBRCA1/BARD1と53BP1/RIF1の集積を阻害し、相同組換え修復と非同末端再結合を阻害する。

### 3. 相同組換え抑制を利用した新規治療法開発のための研究

RINGE3-65 が BRCA1 陰性難治性乳がん治療における分子標的となるかを検証するために必要な細胞株の樹立に成功した。

### 4. ホルモン療法耐性の分子機序解明とTN乳がん

への応用

これまでエストロゲン応答性GFPを安定導入したER陽性乳がん培養細胞株(MCF-7-E10,T47D-TE8)を親株としてエストロゲンシグナル応答性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(アロタマーゼ阻害剤耐性)細胞株を樹立してきた。今回、その中でER発現が陰転化したものに着目し、TN乳がんとの関連性について検討し、TN乳がんのsubtypeと共通の性質を示すものを見出した。また、これらに対して既存の、あるいは今後臨床への導入が予定されている分子標的治療薬の効果を*in vitro*で検討し、それぞれの機序によるその効果の違いが明らかとなった。これらの知見はTN乳がんの新規治療を考える上での有用な情報となろう。また、その各々のsubtypeを識別するバイオマーカーの開発も今後の重要な課題となる。

## 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) Yoshimaru T, Komatsu M, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T\*. Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the cross talk between estrogen and growth factors in breast cancer. *Cancer Sci.* 2015 in press.
- 2) Yanai A, Inoue N, Yagi T, Nishimukai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Enomoto Y, Takatsuka Y, Watanabe T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y. Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER+, and HER2- Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2015 in press.
- 3) Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of novel epigenetically inactivated gene, PAMR1 in breast carcinoma. *Oncol Rep.* 2015 Jan;33(1):267-73.
- 4) Yoshimaru T, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T\*. Xanthohumol suppresses oestrogen-signalling in breast cancer through the specific inhibition of BIG3-PHB2 interactions. *Sci Rep.* 2014 Dec 8;4:7355.
- 5) Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T,

- Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T\*. Early growth response 4 is involved in cell proliferation of small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes. *PLoS One*. 2014 Nov 20;9(11):e113606.
- 6) Chen YA, Murakami Y, Ahmad S, Yoshimaru T, Katagiri T, Mizuguchi K. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) is predicted to interact with its partner through an ARM-type  $\alpha$  helical structure. *BMC Res Notes*. 2014 Jul 6;7:435.
  - 7) NF- $\kappa$ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, Hattori H, Roche-Molina M, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Sato K. *Oncotarget*. 2015 Jan 12. [Epub ahead of print]
  - 8) Interaction of BARD1 and HPI is required for BRCA1 retention at sites of DNA damage. Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Klevit RE, Ohta T. *Cancer Res*. 2015 Jan 29. [Epub ahead of print]
  - 9) LSD1 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Basal-Like Breast Cancer, and Sensitivity to PARP Inhibition. Nagasawa S, Sedukhina AS, Nakagawa Y, Maeda I, Kubota M, Ohnuma S, Tsugawa K, Ohta T, Roche-Molina M, Bernal JA, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Sato K. *PLoS One*. 10(2), 2015 Feb
  - 10) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. *EMBO Rep*. 16(2):192-201, 2015 Feb
  - 11) Kobayashi S, Kasaishi Y, Nakada S, Takagi T, Era S, Motegi A, Chiu RK, Takeda S, Hirota K. Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining. *Oncogene*. In press
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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*, 7: 23-21, 2014.
  - 15) Fujii R, Hanamura T, Suzuki T, Gohno T, Shibahara Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Ohnuki K, Kakugawa Y, Hirakawa H, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N, Hayashi S. Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 144: 513-522, 2014.
  - 16) 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*, 14: 249-245, 2014.
  - 17) Machioka K, Mizokami A, Yamaguchi Y, Izumi K, Hayashi S, Namiki M. Active estrogen synthesis and its function in prostate cancer-derived stromal cells. *Anticancer Res*. 35: 221-228, 2015.
  - 18) Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, Tazawa C, Moriya T, Hirakawa H, Hayashi S. Differences in stemness properties associated with the heterogeneity of luminal-type breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, in press, 2015.
  - 19) Ishiba T, Nagahara M, Nakagawa T, Sato T, Ishikawa T, Uetake H, Sugihara K, Miki Y, Nakanishi A. Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast cancer cell motility and invasion. *Sci Rep*. 2014 Nov 17;4:7069.
  - 20) Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med*. 2014 Sep 11;6(10):1279-93.
  - 21) Kimura H, Miki Y, Nakanishi A. Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins. *Cell Cycle*. 2014;13(12):1928-37.
  - 22) Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Noda T, Miki Y.

- Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array. *J Clin Bioinforma.* 2014 Feb 18;4(1):3.
- 23) 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.* 2014 Mar 1;74(5):1518-28.
2. 学会発表
- 1) Toyomasa Katagiri: A novel AKAP protein, BIG3 coordinates estrogen signaling pathways in breast cancer cells. 11th International Conference on Protein Phosphatase. (口演) 2014.11.12-14、仙台市
- 2) 新規エストロゲンシグナル制御分子BIG3による新たながん抑制因子prohibitin2の機能喪失機構の解明. 第87回日本生化学会大会 (口演) 2014.10.15-18 京都市
- 3) 片桐 豊雅: がん特異的糖転移酵素による小胞体ストレス応答の恒常的活性化を標的とした新規創薬開発. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
- 4) 宮川 義仁, 小松 正人, 清谷 一馬, 吉丸 哲郎, 笹 三徳, 三好 康雄, 片桐 豊雅: トリプルネガティブ乳癌における癌抑制遺伝子BCL1の発現低下について. 第73回日本癌学会学術総会 (ポスター) 2014.9.25-27 横浜市
- 5) 小松 正人, 吉丸 哲郎, 尾野 雅哉, 松尾 泰佑, 清谷 一馬, 三好 康雄, 笹 三徳, 片桐 豊雅: 悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌における核内19S-proteasome関連遺伝子(nPAG1)の役割. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
- 6) 吉丸 哲郎, 小松 正人, 三好 康雄, 笹 三徳, 片桐 豊雅: エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がん治療法の開発. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
- 7) 大豆本 圭, 小松 正人, 吉丸 哲郎, 上原 久典, 布川 朋也, 金山 博臣, 片桐 豊雅: がん特異的糖転移酵素による小胞体ストレス応答の恒常的活性化を標的とした新規創薬開発. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
- 8) 金 南希, 吉丸 哲郎, 小松 正人, 松尾 泰佑, 笹 三徳, 片桐 豊雅: 乳癌細胞における癌抑制分子PHB2のエストロゲン依存性核内移行機構の解明. 第73回日本癌学会学術総会 (ポスター) 2014.9.25-27 横浜市
- 9) 片桐豊雅: 包括的ゲノム解析を通じたトリプルネガティブ乳がんの分子特性. 第22回日本乳癌学会学術総会 (口演) 2014.7.10-12.大阪市
- 10) 小松 正人, 吉丸 哲郎, 松尾 泰佑, 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構成因子のプロテアソーム活性非依存的な役割. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会 (口演) 2014.6.25-27 仙台市
- 11) 吉丸 哲郎, 小松 正人, 松尾 泰佑, 片桐 豊雅: エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がんの治療法の創製. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会 (口演) 2014.6.25-27仙台市
- 12) Toyomasa Katagiri, Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu and Taisuke Matsuo: BIG3-PHB2 Interaction is a key therapeutic target in luminal-type of breast cancer. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (Poster) 2014.4.5-9 San Diego USA
- 13) 第15回ホルモンと癌研究会: シンポジウム「BRCA1の新規クロマチン結合機構を標的としたがん治療戦略」太田智彦. 2014年7月
- 14) 第22回日本乳癌学会学術総会: シンポジウム「BRCA1の新規DNA損傷応答メカニズムを標的とした治療戦略」太田智彦. 2014年7月
- 15) 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会: シンポジウム「BRCA1のDNA損傷応答とヒストン修飾」太田智彦. 2014年8月
- 16) Benzon Symposium No 60 - Nuclear Regulation by Ubiquitin: ポスター「ATM-dependent but RNF168-independent BRCA1/BARD1 retention at sites of DNA damage.」太田智彦. 2014年8月
- 17) 第73回日本癌学会学術総会: シンポジウム「Therapeutic strategy targeting the mechanism of BRCA1 retention at DNA damage sites via a histone modification.」太田智彦. 2014年9月
- 18) Fusion Conference DNA Replication as a Source of DNA Damage: ポスター「HP1 alpha mediates BARD1 retention on Lys9-dimethyla

- ted histone H3 at sites of DNA damage」太田智彦. 2014年10月
- 19) International Symposium on Homeostasis through development, life, and diseases : シンポジウム「BRCA1 retention at DNA double-strand breaks in homology-directed repair pathways」太田智彦. 2014年11月
  - 20) Kato K, Nakajima K, Nakada S. Fine-Tuning of DNA damage-induced ubiquitination supports adequate DNA repair pathway. Gordon Reserch Conference, 香港 2014年7月
  - 21) 中田慎一郎. DNA 損傷依存性ユビキチン化の精密制御による適切な DNA 修復経路選択日本癌学会学術集会 横浜 2014年9月
  - 22) Nakada S, DNA Damage-Induced Ubiquitination Affects DNA Repair Pathway Choice. 3R symposium 三島 2014年10月
  - 23) Nakajima K, Nakada S. Multiple Ubiquitination pathways suppress RAD51 recruitment through facilitating RPA S4/S8 phosphorylation. Keystone Symposium (Canada) March 2015
  - 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： Estrogen Receptor(ER) 陽性乳癌における Steroid Sulfatase(STS) と Organic Anion Transporter Peptide(OATP)4A1 の新規バイオマーカーとしての可能性. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 (京都) 2014年4月3日～5日
  - 25) Mariko Kimura, Toru Hanamura, Yosuke Kaneko, Toshifumu Niwa, Yuri Yamaguchi, Itaru Endo, Shin-ichi Hayashi : Molecular characterization of everolimus-resistant cell lines established from estrogen depletion-resistant MCF-7. AACR Annual Meeting 2014 (San Diego,USA) April 5-9, 2014
  - 26) Rika Fujii, Toru Hanamura, Tatsuyuki Gohno, Toshifumi Niwa, Yuri Yamaguchi, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Noriaki Ohuchi, Shin-ichi Hayashi : Androgen receptor acquires an oncogenic role in the AI resistance mechanism in breast cancer. AACR Annual Meeting 2014 (San Diego,USA) April 5-9, 2014
  - 27) 坪井洸樹、長友隆将、郷野辰幸、樋口徹、丹羽俊文、林慎一： ER $\alpha$  遺伝子の CpG island shore に存在する特定のメチル化部位がホルモン療法耐性乳癌細胞における ER $\alpha$  発現を規定している. 第 15 回ホルモンと癌研究会 (宮城) 2014年7月4日～5日
  - 28) 内海加奈美、佐藤望、山口ゆり、林慎一： 乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 29) 木村万里子、金子陽介、藤木夏、丹羽俊文、山口ゆり、遠藤格、林慎一： ER 陽性乳癌細胞株 MCF-7 におけるエストロゲン枯渇耐性かつ mTOR 阻害剤耐性の分子生物学的特徴. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 30) 金子陽介、花村徹、藤井里圭、坪井洸樹、長友隆将、丹羽俊文、林慎一： フルベストラント耐性乳癌細胞株の分子生物学的特徴. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 31) 徳田恵美、齊藤光江、清野祐子、山口ゆり、林慎一： 乳癌の化学療法効果におけるエストロゲンレセプター蛋白発現と活性による評価の検討. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 32) 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、林慎一、竹吉泉： ER 陽性乳癌における ER, PR, HER2 の mRNA 発現と臨床病理学的因子との関連. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 33) 藤井里圭、鈴木貴、柴原裕紀子、丹羽俊文、石田孝宣、笹野公伸、大内憲明、林慎一： アロマターゼ阻害剤耐性再発乳癌症例におけるアンドロゲン受容体関連蛋白発現の検討. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 34) 花村徹、丹羽俊文、遠藤恵、郷野辰幸、山口ゆり、黒住昌史、武井寛幸、伊藤研一、林慎一： ホルモン感受性乳癌における Aromatase 非依存的 Steroid 代謝経路の役割. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014年7月10日～12日
  - 35) 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 非依存的 ER 活性化機構と

- 新規治療の可能性. 第 23 回乳癌基礎研究会 (つくば) 2014 年 7 月 26 日～27 日
- 36) 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 23 回乳癌基礎研究会 (つくば) 2014 年 7 月 26 日～27 日
- 37) 内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、山口ゆり、林慎一: 乳癌細胞におけるホルモン療法耐性と癌幹細胞性. 第 15 回乳癌最新情報カンファランス (松本) 2014 年 8 月 8 日～10 日
- 38) 内海加奈美、佐藤望、伊藤貴子、平川久、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 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 39) 高信純子、丹羽俊文、鈴木奏絵、郷野辰幸、山口ゆり、林慎一: 特異的ナノビーズを用いた細胞膜局在型エストロゲン受容体の解析と乳癌ホルモン療法耐性への関与. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 40) 浅利陽佑、高信純子、品川優理、丹羽俊文、平川久、山口ゆり、林慎一: ER を活性化するタバコ煙成分の探索とホルモン療法耐性株への影響の検討. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 41) 山口ゆり、木村万里子、内海加奈美、林慎一: 卵巣摘出マウスにおけるホルモン療法耐性乳癌の Xenograft モデル. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 42) 坪井洸樹、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株における ER $\alpha$  のエピジェネティクスによる制御と細胞内シグナル伝達の可塑性の関係. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 43) 唯野良介、丹羽俊文、林慎一: ER $\alpha$  転写解析によるエストロゲンシグナル経路の識別の試み. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 44) 福井布美代、内海加奈美、山口ゆり、林慎一: Heregulin- $\beta$ 1 による MCF-7 乳癌細胞における ER/HER ファミリーの発現規制と癌幹細胞様の特性の誘導. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日～27 日
- 45) Mariko Kimura, Toru hanamura, Kohki Tsuboi, Yuri Yamaguchi, Toshihumi Niwa, Itaru Endo, Shin-ichi Hayashi: Efficacy of everolimus on multiple mechanism of AI-resistance in virto and xenograft, and characterization of everolimus-resistance. 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio, USA) December 9-13, 2014
- 46) 林慎一: 乳癌におけるホルモン療法耐性のメカニズム—基礎研究を中心に—. 第 14 回関東ホルモンと癌研究会 (東京) 2014 年 2 月 1 日
- 47) 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 11 回日本乳癌学会九州地方会 (福岡) 2014 年 3 月 2 日
- 48) 林慎一: ホルモン療法耐性機序 UP-TO-DATE from 14<sup>th</sup> BC Meeting. 17<sup>th</sup> BREAST CANCER UP-TO-DATE Meeting (東京) 2014 年 3 月 29 日
- 49) 林慎一: 閉経後進行再発乳癌の治療戦略 ～基礎研究より～. 第 10 回東北 Breast Cancer Workshop (宮城) 2014 年 6 月 21 日
- 50) 林慎一: ホルモン療法耐性乳癌の分子機構. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日～12 日
- 51) 林慎一: 閉経後進行・再発乳癌における SERD の可能性 ～基礎研究より～. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 (大阪) 2014 年 7 月 10 日～12 日
- 52) 林慎一: ホルモン療法耐性機序 -エベロリムスによる乳癌治療の可能性-. EAST Japan 乳癌 Live Seminar (大宮) 2014 年 7 月 30 日
- 53) 林慎一: 内分泌療法耐性のメカニズム. 第 52 回日本乳癌治療学会学術集会 (横浜) 2014 年 8 月 28 日～30 日
- 54) 林慎一: ホルモン療法耐性の分子生物学と mTOR シグナル. Breast Cancer Experts Meeting in 郡山 (郡山) 2014 年 9 月 5 日
- 55) 林慎一: ホルモン療法耐性の分子機序の理解と新規分子標的. Scientific Exchange Meeting (東京) 2014 年 9 月 6 日
- 56) 林慎一: 乳癌のホルモン療法耐性のメカニズムとその克服に向けて. 第 73 回日本癌学会

- 学術総会(横浜) 2014年9月25日~27日
- 57) 林慎一：乳癌ホルモン療法の基本～耐性獲得のメカニズムとその克服に向けて. 新潟県乳癌学術講演会(新潟) 2014年10月10日
- 58) 林慎一：ホルモン療法耐性の分子機序の理解と新規分子標的. National SEM in Sapporo(札幌) 2014年10月24日
- 59) 石場 俊之, 中西 啓, 永原 誠, 中川 剛士, 佐藤 隆宣, 円城寺 恩, 大野 玲, 飯田 聡, 植竹 宏之, 杉原 健一, 三木 義男; 葉状腫瘍のプロテオーム解析から導いた periostin 欠乏による decorin の細胞外放出. 第114回日本外科学会定期学術集会、京都市、2014年4月3日 - 5日
- 60) 小松 哲, 長崎 光一, 伊藤 研一, 天野 純, 三木 義男; 乳癌における Maspin の過剰発現と臨床的検討. 第114回日本外科学会定期学術集会、京都市、2014年4月3日 - 5日
- 61) 三木 義男; 遺伝性乳がん卵巣がん症候群(HBOC)と遺伝カウンセリング 遺伝性乳がん原因遺伝子の発見から新しい治療開発への展望. 第38回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、東大阪市、2014年6月26日 - 29日
- 62) 三木 義男; 乳がんを読み解くために必要なゲノム情報の基礎 全ゲノムシーケンス、RNAシーケンス、エピジェネティクス等. 第22回日本乳癌学会学術総会、大阪市、2014年7月10日 - 12日
- 63) 大石 陽子, 黒田 一, 川村 雄大, 斎藤 賢将, 野谷 啓之, 川村 徹, 佐藤 康, 密田 亜希, 中嶋 昭, 三木 義男; 機能ネットワークからみた乳癌予測因子の探索. 第22回日本乳癌学会学術総会、大阪市、2014年7月10日 - 12日
- 64) 吉本 賢隆, 前田 奈緒子, 神森 眞, 三木 義男; ルミナル A 乳がんに対する化学療法の可能性. 第22回日本乳癌学会学術総会、大阪市、2014年7月10日 - 12日
- 65) 中西 啓, 三木 義男; BRCA2 の新規機能解明に基づく診断・治療法の開発. 第73回日本癌学会学術総会、横浜市、2014年9月25日 - 27日
- 66) Wang Junhui, 茂木 章, 藤森 浩彰, 三木 義男, 益谷 美都子; PARP-1 と PARG は放射線応答において 53BP1 の制御に関与する. 第73回日本癌学会学術総会、横浜市、2014年9月25日 - 27日
- 67) 高岡 美帆, ナディラ ワリ, 斎藤 広子, 中西 啓, 三木 義男; M 期中心体における MT1-MMP の BRCA2 タンパク分解. 第73回日本癌学会学術総会、横浜市、2014年9月25日 - 27日
- 68) 清水 優香, 湯浅 磨里, 中西 啓, 三木 義男; BRCA2 欠失乳細胞に合成致死を誘導する有効な低分子化合物の同定. 第73回日本癌学会学術総会、横浜市、2014年9月25日 - 27日
- 69) 佐藤 玄, 倉科 太一, 紺野 真衣, 三木 義男, 竹中 克也; 画像認識技術による中心体解析とその複製制御に関与する BRCA2 分子内領域の同定. 第73回日本癌学会学術総会、横浜市、2014年9月25日 - 27日
- 70) 宮口 健, 井元 清哉, 牛嶋 大, 松浦 正明, 玉田 嘉紀, 山口 類, 宮野 悟, 三木 義男; 乳がん患者のパクリタキセル応答性に関わる遺伝子ネットワーク解析. 第73回日本癌学会学術総会、横浜市、2014年9月25日 - 27日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
国際出願中1件 (PCT出願)  
国際出願番号: PCT/JP2014/58262  
発明の名称: アンドロゲンレセプター依存性乳癌細胞の作成方法、当該細胞株を用いたスクリーニング方法、並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  
番号: 2013-108774  
出願年月日: 2013年5月23日

分子プロファイル情報を応用した新規分子標的の同定

担当責任者 片桐 豊雅 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 教授

研究要旨

これまでに次世代シーケンス解析にて体細胞変異を有する遺伝子として同定していたTN乳癌関連遺伝子群BCMG1、BCMG2を新たな臨床検体を用いたターゲットシーケンス解析および網羅的発現解析にて同定したTN乳癌関連分子B3GALNT2とPAG1の機能解析を進めた。その結果、これらの遺伝子はTN乳がん化に加えて、luminal タイプの乳がんにおいても関与する可能性あることがわかった。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遺伝子として同定した、癌特異的糖転移酵素B3GALNT2は、その糖鎖修飾によって分泌機能が制御されており、この糖鎖修飾の制御が治療薬の開発に繋がる可能性が示唆された。またプロテアソーム関連因子PAG1は、TN乳癌の癌化、進展に関与し、特に核に存在する場合には、より増殖促進に寄与することがわかり、この核PAG1を標的とすることで、効率のよい、副作用の少ない治療薬開発につながるものことが示唆された。

A. 研究目的

ER 非依存性増殖による難治性乳癌である「Triple Negative (TN) 乳癌」を対象に、TN乳癌の生物学特性の解明と新規治療法開発研究を目的とする。具体的には、分子プロファイル情報を応用した新規治療分子標的の同定を通じて、ER 非依存性が引き起こす難治病態の解明とそれに基づく新規治療法の基盤開発に取り組む。本研究では、前助成 (H24-H25) 「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」にて同定したTN 乳癌関連分子として、新規の体細胞変異陽性癌抑制遺伝子 (BCMG1、BCMG2)、細胞周期関連遺伝子ASPM・糖転移酵素B3GALNT2及びプロテアソーム関連因子PAG1について体細胞変異の検証と機能解析を行う。

B. 研究方法

(1) 追加乳がん症例を用いたターゲットシーケンスによる体細胞変異の検証

新規乳がん体細胞変異陽性癌抑制遺伝子BCMG1、BCMG2のluminal乳がん69症例における体細胞変異を検索した。

(2) 糖転移酵素B3GALNT2の機能解析

B3GALNT2の翻訳後修飾部位の同定とその修飾の分泌作用における意義について、修飾部位変異体を用いて解析した。

(3) プロテアソーム関連因子PAG1の同定および機能解析

- ①前助成にて同定したTNBCに共通して発現亢進を認めるプロテアソーム関連因子PAG1に対して、RNA干渉にて細胞増殖抑制効果について検討した。
- ②過剰発現系にて細胞増殖に与える影響を検討した。
- ③PAG1特異的抗体を用いて乳がん細胞内局在およびTNBC臨床検体を用いた免疫組織染色による発現を検討した。

(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luminal乳癌臨床69検体を用いてNGS解析によるターゲットシーケンスを行い、2症例において体細胞変異を同定した。

#### (2) 糖転移酵素B3GALNT2の機能解析

In silicoおよび生化学的解析を通じて同定した116番目と174番目のAsn残基におけるN型糖鎖修飾の分泌への関与を調べるために、これら残基のAlaに変異体をHEK293T細胞へ発現後、ウェスタンブロット法にて調べたところ、培養上清中におけるB3GALNT2の分泌量の減少を認めた。

#### (3) プロテアソーム関連因子PAG1の同定および機能解析

① 前助成にて同定したTNBCに共通して発現亢進を認めるプロテアソーム関連因子PAG1に対して、siRNA干渉実験にて、その発現を抑制した結果、経時的な細胞像証抑制効果が認められた。

② PAG1をNIH3T3細胞に過剰発現した際の細胞増殖を調べたところ、Mockベクターを導入した細胞に比して、有意な細胞増殖の促進を認めた。

③PAG1特異的抗体を用いてTN乳がん細胞 (MDA-MB-231)におけるPAG1の局在を免疫細胞染色法にて調べたところ、核と細胞質に強く染色される細胞が認められ、そのうち核染色を認める細胞は増殖マーカーであるKi67と共局在した。また、TN乳がん臨床組織を用いた免疫組織染色にて、PSMD2の高発現の認められる症例は、顕著な予後不良を認めた。特に、PSMD2核への染色が認められる場合 (核局在を認める細胞が10%以上ある)、 overall survivalとdisease free survivalともに顕著に低く、予後不良だった。

### D. 考察

これまでの結果から、癌抑制遺伝子BCMG1、BCMG2はTN乳がんにて10%程度の体細胞変異を認めていたが、luminal乳がん69症例では2例ずつの体細胞変異を新たに同定した。今回同定した結果は、BCMG1、BCMG2はともにluminal乳がんにも認められることから、TN乳がんのみにある変異でなかった。また、未だこれらの遺伝子の変異が欧米ではないことから、日本人の乳がんに特徴的な活化機構であるかもしれない。

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同定した癌特異的糖転移酵素B3GALNT2遺伝子産物は、分泌機能を有し、その機構には自身の116番目と174番目Asn残基におけるN型糖鎖修飾が重要であることがわかった。

TN乳癌の発現情報解析を通じて発現亢進するpathwayにて共通に認められる分子PAG1を同定し、PAG1の発現亢進が細胞増殖を促進する機能を有し、その発現が核にて認められる場合に、予後が顕著に不良となることから、PAG1はTN乳がんの特徴を表わし、予後マーカーおよび治療標的としての可能性が示唆された。

### E. 結論

本年度は、これまでに同定していたTN乳癌関連遺伝子群BCMG1、BCMG2を新たな臨床検体を用いたターゲットシーケンス解析および網羅的発現解析にて同定したTN乳癌関連分子B3GALNT2とPAG1の機能解析を進めた。その結果、これらの遺伝子はTN乳がん化に加えて、luminalタイプの乳がんにおいても関与する可能性あることがわかった。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遺伝子として同定した、癌特異的糖転移酵素B3GALNT2は、その糖鎖修飾によって分泌機能が制御されており、この糖鎖修飾の制御が治療薬の開発に繋がる可能性が示唆された。またプロテアソーム関連因子PAG1は、TN乳癌の癌化、進展に関与し、特に核に存在する場合には、より増殖促進に寄与することがわかり、この核PAG1を標的とすることで、効率のよい、副作用の少ない治療薬開発につながるものことが示唆された。

### 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) Yoshimaru T, Komatsu M, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T\*. Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the crosstalk between estrogen and growth factors in breast cancer. Cancer Sci. 2015 in press.
- 2) Yanai A, Inoue N, Yagi T, Nishimukai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Enomot

- o Y, Takatsuka Y, Watanabe T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y. Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER+, and HER2- Breast Cancer. Clin Breast Cancer. 2015 in press.
- 3) Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of novel epigenetically inactivated gene, PAMR1 in breast carcinoma. Oncol Rep. 2015 Jan;33(1):267-73.
  - 4) Yoshimaru T, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T\*. Xanthohumol suppresses oestrogen-signalling in breast cancer through the specific inhibition of BIG3-PHB2 interactions. Sci Rep. 2014 Dec 8;4:7355.
  - 5) Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T\*. Early growth response 4 is involved in cell proliferation of small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes. PLoS One. 2014 Nov 20;9(11):e113606.
  - 6) Chen YA, Murakami Y, Ahmad S, Yoshimaru T, Katagiri T, Mizuguchi K. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) is predicted to interact with its partner through an ARM-type  $\alpha$  helical structure. BMC Res Notes. 2014 Jul 6;7:435.
2. 学会発表
- 1) Toyomasa Katagiri: A novel AKAP protein, BIG3 coordinates estrogen signaling pathways in breast cancer cells. 11th International Conference on Protein Phosphatase. (口演) 2014.11.12-14、仙台市
  - 2) 新規エストロゲンシグナル制御分子BIG3による新たながん抑制因子prohibitin2の機能喪失機構の解明. 第87回日本生化学学会大会 (口演) 2014.10.15-18 京都市
  - 3) 片桐 豊雅: がん特異的糖転移酵素による小胞体ストレス応答の恒常的活性化を標的とした新規創薬開発. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
  - 4) 宮川 義仁, 小松 正人, 清谷 一馬, 吉丸 哲郎, 笹 三徳, 三好 康雄, 片桐 豊雅: トリプルネガティブ乳癌における癌抑制遺伝子BCL2L1の発現低下について. 第73回日本癌学会学術総会 (ポスター) 2014.9.25-27 横浜市
  - 5) 小松 正人, 吉丸 哲郎, 尾野 雅哉, 松尾 泰佑, 清谷 一馬, 三好 康雄, 笹 三徳, 片桐 豊雅 悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌における核内19S-proteasome関連遺伝子(nPAG1)の役割. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
  - 6) 吉丸 哲郎, 小松 正人, 三好 康雄, 笹 三徳, 片桐 豊雅 エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がん治療法の開発. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
  - 7) 大豆本 圭, 小松 正人, 吉丸 哲郎, 上原 久典, 布川 朋也, 金山 博臣, 片桐 豊雅: がん特異的糖転移酵素による小胞体ストレス応答の恒常的活性化を標的とした新規創薬開発. 第73回日本癌学会学術総会 (口演) 2014.9.25-27 横浜市
  - 8) 金 南希, 吉丸 哲郎, 小松 正人, 松尾 泰佑, 笹 三徳, 片桐 豊雅: 乳癌細胞における癌抑制分子PHB2のエストロゲン依存性核内移行機構の解明. 第73回日本癌学会学術総会 (ポスター) 2014.9.25-27 横浜市
  - 9) 片桐豊雅: 包括的ゲノム解析を通じたトリプルネガティブ乳がんの分子特性. 第22回日本乳癌学会学術総会 (口演) 2014.7.10-12.大阪市
  - 10) 小松 正人, 吉丸 哲郎, 松尾 泰佑, 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構成因子のプロテアソーム活性非依存的な役割. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会 (口演) 2014.6.25-27 仙台市
  - 11) 吉丸 哲郎, 小松 正人, 松尾 泰佑, 片桐 豊雅: エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がんの治療法の創製. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会 (口演) 2014.6.25-27仙台市
  - 12) Toyomasa Katagiri, Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu and Taisuke Matsuo BIG3-PHB2 Interaction is a key therapeutic target in luminal-type of breast cancer. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (Poster) 2014.4.5-9 San Diego USA
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

DNA損傷修復機能に基づく新規合成致死療法の開発

担当責任者 太田 智彦 聖マリアンナ医科大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

乳癌の化学療法感受性に影響を与えるヒストン修飾を解析した。その結果、ヒストン脱メチル化酵素阻害剤であるMS-275とFK228によって、相同組換え修復に必須なBRCA1と非同末端再結合に必須な53BP1のDNA損傷局所への集積が、いずれも阻害されることが判明した。

A. 研究目的

前助成では、DNA損傷薬剤と合成致死を来しうるDNA修復機構の異常を解析した結果、ジメチル化ヒストンとの結合を介したBRCA1のDNA二本鎖切断部位への集積機能に関する新規機構の発見およびヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)阻害剤とPoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)阻害剤の相乗効果を明らかにした。そこで、本研究では同様にヒストン修飾を制御するが、HMT阻害剤とはヒストン上の作用部位が異なることが予想されるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害剤がDNA損傷応答に与える影響とPARP阻害剤との相乗効果について解析した。

B. 研究方法

- ①実験は癌細胞株U2OS、MCF7、HCT116およびHeLa細胞を用いて行い、クラス I HDAC阻害剤であるMS-275とFK228を添加した後のDNA損傷応答を解析した。
- ②経時的、濃度依存的なヒストン修飾の変化をウェスタンブロットにて解析した。DNA修復因子の発現はウェスタンブロットとRT-PCRにて解析した。
- ③DNA損傷部位への修復因子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、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光免疫染色法にて解析した。
- ④相同組換え修復能はDR-GFPレポーター安定発現細胞を用い、遺伝子導入による一過性Cre制限酵素発現によるDNA切断によって生じた相同組換えの結果として発現するGFPをフローサイトメーターにて検出した。

⑤化学療法への感受性はClonogenic survival assayにて24時間化学療法を添加した細胞の10日目のコロニー数にて解析した。

（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

- ①経時的な解析では、U2OS、MCF7細胞共にMS-275あるいはFK228の24時間の添加にてヒストンH3 Lys9の著明なアセチル化 (H3K9ac)が生じると同時にヒストンH3 Lys9のジメチル化(H3K9me2)をほぼ完全に抑制した。
- ②濃度依存的な解析では、MS-275は2.5 $\mu$ M、FK228は2.5nMにて上述のH3K9acとH3K9me2の変化に加え、ヒストンH3 Lys56およびヒストンH4の著明なアセチル化(H3K56acおよびH4ac) を来すが、この際にDNA修復因子であるBRCA1、BARD1、RAD51、BRCA2、ATM、53BP1、RIF1の発現には影響を与えないことを確認した。
- ③一方、HMT阻害剤であるUNC0638はH3K9me2を著明に抑制するものの、H3K9ac、H3K56acおよびH4acには影響を及ぼさないことが判明した。
- ④上述の条件下でDNA二本鎖切断を加え、1時間後のDNA修復因子の損傷局所への集積を解析したところ、UNC0638では相同組換え修復因子であるBRCA1、BARD1、RAD51の集積のみが阻害され、非同末端再結合に必須な53BP1とRIF1の集積は阻害されないのに対して、MS-275およびFK228では両方の経路の修復因子の集積が著明に抑制された。
- ⑤DR-GFPによるgene conversion assayではMS-275、

FK228およびUNC0638の全てで相同組換え能の低下を認めた。

⑥Clonogenic survival assayによる半数致死量は細胞株によって異なるが、MS-275は2~8 $\mu$ M、FK228は1.5~3nMであった。UNC0638がPARP阻害剤との相乗効果、すなわち合成致死性を示したのに対して、MS-275とFK228はいずれもU2OS、MCF7、HCT116およびHeLa細胞の全ての細胞において相乗効果を認めなかった。

#### D. 考察

DNA二本鎖切断の修復はBRCA1/BARD1がエラーのない相同組換え修復を誘導するのに対して、53BP1/RIF1がエラーを来しやすい非相同末端再結合を誘導し、この2つのメカニズムが拮抗して存在することが知られている。BRCA1/BARD1複合体にはいくつかの異なった複合体が存在するが、申請者らはこのうち、RIF1を阻害して相同組換え修復を誘導するBRCA1/BARD1複合体を損傷局所に集積させるためにHP1を介したBARD1とH3K9me2の結合が必須であることを明らかにした。一方、53BP1の損傷局所への集積にはメチル化H4K20と53BP1の結合が必須で、H4のアセチル化によってこの結合が阻害されることがこれまでに示されていた。本研究結果からHDAC阻害剤がH3K9acとH4acを介してそれぞれBRCA1と53BP1の集積を阻害し、相同組換え修復と非相同末端再結合を阻害する機序が明らかとなった。PARP阻害剤は相同組換え修復不全と合成致死性を来すが、本研究結果からもわかるように相同組換え修復と非相同末端再結合の両経路を阻害する場合には合成致死性を生じさせないものと考えられる。したがって、放射線療法など、直接二本鎖切断を生じさせる治療法との併用に効果が期待される。

#### E. 結論

HDAC阻害剤はH3K9acとH4acを介してそれぞれBRCA1/BARD1と53BP1/RIF1の集積を阻害し、相同組換え修復と非相同末端再結合を阻害する。

#### 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) NF- $\kappa$ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, Hattori H, Roche-Molina M, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Sato K. *Oncotarget*. 2015 Jan 12. [Epub ahead of print]
- 2) Interaction of BARD1 and HP1 is required for BRCA1 retention at sites of DNA damage. Wu W, Nishikawa H, Fukuda T, Vittal V, Asano M, Miyoshi Y, Klevit RE, Ohta T. *Cancer Res*. 2015 Jan 29. [Epub ahead of print]
- 3) LSD1 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Basal-Like Breast Cancer, and Sensitivity to PARP Inhibition. Nagasawa S, Sedukhina AS, Nakagawa Y, Maeda I, Kubota M, Ohnuma S, Tsugawa K, Ohta T, Roche-Molina M, Bernal JA, Narváez AJ, Jeyasekharan AD, Sato K. *PLoS One*. 10(2), 2015 Feb
- 4) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. Ohtake F, Saeki Y, Sakamoto K, Ohtake K, Nishikawa H, Tsuchiya H, Ohta T, Tanaka K, Kanno J. *EMBO Rep*. 16(2):192-201, 2015 Feb

##### 2. 学会発表

- 1) 第15回ホルモンと癌研究会：シンポジウム「BRCA1の新規クロマチン結合機構を標的としたがん治療戦略」太田智彦. 2014年7月
- 2) 第22回日本乳癌学会学術総会：シンポジウム「BRCA1の新規DNA損傷応答メカニズムを標的とした治療戦略」太田智彦. 2014年7月
- 3) 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会：シンポジウム「BRCA1のDNA損傷応答とヒストン修飾」太田智彦. 2014年8月
- 4) Benzon Symposium No 60 - Nuclear Regulation by Ubiquitin：ポスター「ATM-dependent but RNF168-independent BRCA1/BARD1 retention at sites of DNA damage.」太田智彦. 2014年8月
- 5) 第73回日本癌学会学術総会：シンポジウム「Therapeutic strategy targeting the mechanism of BRCA1 retention at DNA damage sites via a histone modification.」太田智彦. 2014年9月
- 6) Fusion Conference DNA Replication as a Source of DNA Damage：ポスター「HP1 gamma mediates BARD1 retention on Lys9-dimethyla

ted histone H3 at sites of DNA damage」太田智彦. 2014年10月

- 7) International Symposium on Homeostasis through development, life, and diseases : シンポジウム「BRCA1 retention at DNA double-strand breaks in homology-directed repair pathways」太田智彦. 2014年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし