

論文の内容の要旨

論文題目 難治性乳癌における新規 NF- κ B 標的遺伝子産物 Tropomodulin 1 による
造腫瘍能促進機構の解析

氏名 呉 羽 拓

【序文】

乳癌はその遺伝子発現プロファイルからいくつかのグループに分類されることが知られている。ホルモンレセプターであるエストロゲンレセプター(ER)やプロゲステロンレセプター(PR)を発現する luminal-like type、治療標的分子である受容体型チロシンキナーゼ ErbB2 を発現する ErbB2-expressing type、正常乳腺と遺伝子発現プロファイルが類似する normal breast-like type、および ER や PR、ErbB2 といった治療標的分子を発現しない basal-like type の 4 つに分類される。この中でも、basal-like type 乳癌は他の subtype よりも悪性度が高く、ホルモン療法や ErbB2 を標的としたハーセプチン治療が無効なため、極めて予後の悪い難治性乳癌である。現在、basal-like type 乳癌に対する治療標的候補として、EGFR や c-KIT に対する阻害剤、および src 阻害剤などが挙げられるが、阻害剤の特異性や臨床データが揃っていないなど問題点が残されていることから、basal-like type 乳癌に対する治療標的分子の開発が依然として必要とされている。そこで我々は新たな治療標的分子候補を探索するため、basal-like type 乳癌において転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化していることに着目し、basal-like type 乳癌の癌悪性化に関与する新規 NF- κ B 標的遺伝子を探索することを目的とした。

【方法と結果】

新規 NF- κ B 標的遺伝子を探索するため、NF- κ B 恒常的活性化が顕著に起きている乳癌細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行った。まず初めに、NF- κ B 活性化を特異的に抑制することのできる I κ B α -SR を発現させ NF- κ B 活性を抑制し (図 1A)、遺伝子発現が二倍以上減少する 48 個の遺伝子群を選択した (図 1B)。

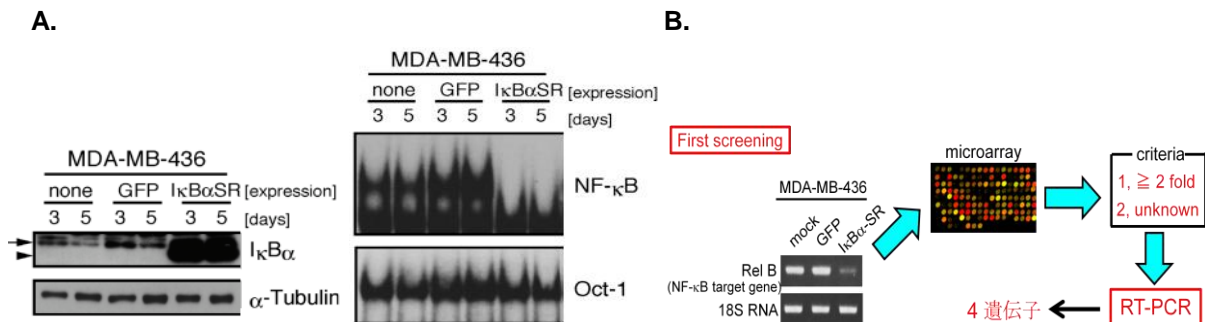


図 1 basal-like type 乳癌細胞における新規 NF- κ B 標的遺伝子の同定法

さらに、既知 NF- κ B 標的遺伝子を除き、RT-PCR 法により発現変動が確認された遺伝子の中から機能が明らかでない遺伝子を選択した結果、新規 NF- κ B 標的遺伝子候補として 4 つの遺伝子に絞ることができた (図 1B)。次に、ヌードマウスを用いて *in vivo* における造腫瘍能を検討した。4 つの候補遺伝子それぞれを NF- κ B 活性の低い乳癌細胞株 MDA-MB-231 に過剰発現し、安定発現細胞を作製した (図 2A)。次に、安定発現細

胞をヌードマウスの fat pad に注射し、40 日間造腫瘍能を計測した。その結果、我々は一つの遺伝子 Tropomodulin 1 (Tmod1) というアクチン結合タンパク質が造腫瘍能を促進することを明らかにした (図 2B, C)。

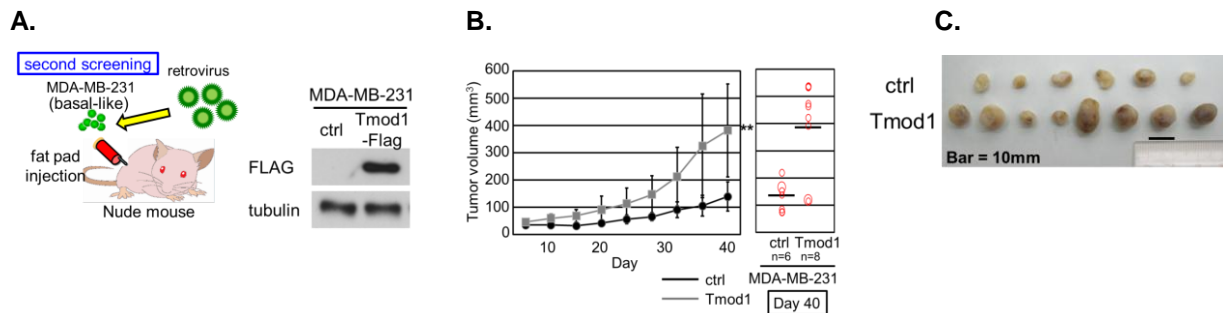


図 2 ヌードマウスを用いたスクリーニング方法 2 における、造腫瘍能検討

Tmod1 はアクチンフィラメントの pointed end 側をキャップし、アクチンフィラメントの安定性に関与することが知られているが、Tmod1 の癌悪性化への関与は現在報告されていない。そこで次に、basal-like type 乳癌細胞における Tmod1 の造腫瘍能促進機構を解析した。造腫瘍能が促進したことから、増殖能に変化があるのではないかと考え、まず通常培養条件下における 2D 増殖を比較した。4 日毎に生細胞数を計測し細胞数を比較したところ、2D 増殖に変化は見られなかった(図 3A)。そこで、腫瘍環境を模倣した実験系であるタイプ 1 コラーゲン 3D 培養を行い 3D 増殖を比較したところ、Tmod1 過剰発現により増殖能が促進することが明らかとなった(図 3A)。このことから、Tmod1 はタイプ 1 コラーゲンの分解能を促進することで増殖能を促進しているのではないかと考えられた。そこで、MMP 阻害剤である MMI270 をタイプ 1 コラーゲン中に添加し MMP 活性を抑制した際の増殖能を検討した。すると、Tmod1 により促進された細胞増殖は MMI270 添加により抑制されコントロールと同程度の増殖を示した (図 3A)。このことから、MMP 依存的に 3D 増殖能の促進が起きていることが明らかとなった。

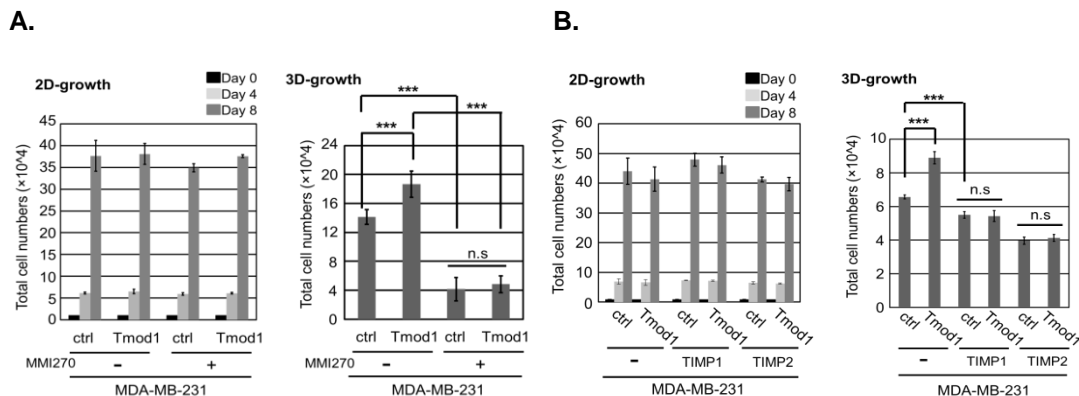


図 3 2D および 3D 培養法を用いた Tmod1 安定発現細胞増殖能の検討

次に我々は、分泌型 MMP あるいは膜結合型 MMP どちらが 3D 増殖に関与しているかを検討するため、リコンビナントタンパク TIMP1 および TIMP2 を使用し、増殖能を検討した。TIMP1 および TIMP2 それぞれをタイプ 1 コラーゲン中に添加し培養すると、3D 増殖能は両者の阻害剤により抑制されることが明らかとなった (図 3B)。このことより、MT1-MMP および MT1-MMP による活性化を受ける分泌型 MMPs が 3D 増殖に関与しているのではないかと示唆された。

次に、basal-like type 乳癌細胞 MDA-MB-231 の内因性 Tmod1 の機能を評価するため、Tmod1 ノックダウン

実験を行った。コントロールとして Luciferase に対する shRNA、Tmod1 に対しては 2 つの shRNA を用いて Tmod1 をノックダウンした (図 4A)。これらの細胞を用いて 2D 増殖能および 3D 増殖能を検討したところ、2D 培養時の増殖能に変化は認められなかったが、タイプ 1 コラーゲン 3D 培養時では増殖能が抑制された (図 4B, 4C)。以上のことより、Tmod1 は basal-like type 乳癌細胞の 3D 増殖能に関与していることが明らかとなった。

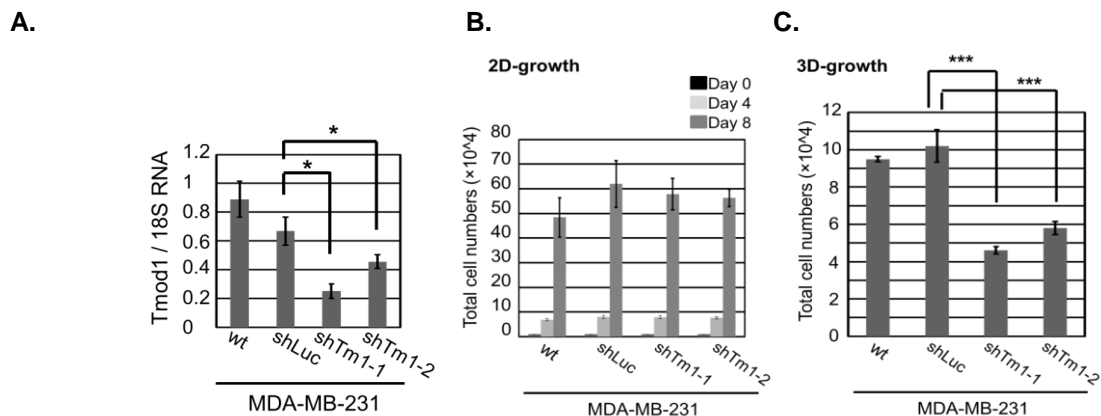


図 4 2D および 3D 培養法を用いた Tmod1 ノックダウン細胞増殖能の検討

次に、Tmod1 による 3D 増殖に MMP が関与していることから、Tmod1 ノックダウンにより MMP の発現に変化があるかどうかを検討した。タイプ 1 コラーゲンを分解する MMP1、MT1-MMP、および MT1-MMP により活性化される MMP2、MMP9、MMP13 の mRNA 発現を RT-PCR 法により検討した。MMP1、MT1-MMP および MMP9 の発現に変化は認められなかったが、MMP13 発現が Tmod1 ノックダウンにより減少することを突き止めた (図 5A)。また、MDA-MB-231 細胞における MMP2 の発現は認められなかった (図 5B)。このことより、Tmod1 による 3D 増殖には MMP13 が関与しているのではないかと示唆された。

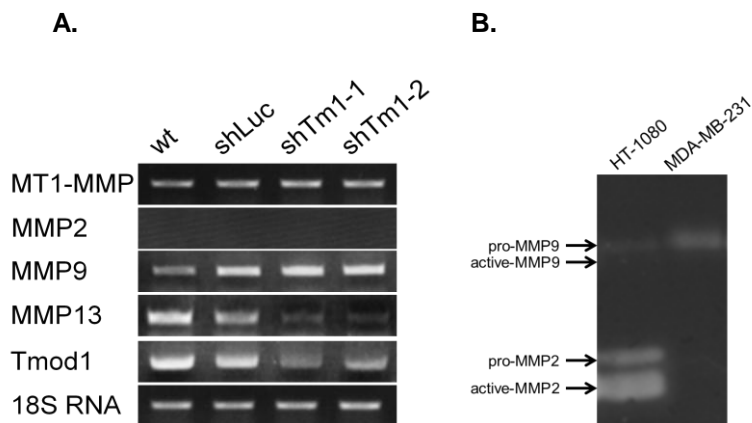


図 5 3D 増殖促進に関与する MMP family members mRNA 発現の比較

最後に、Tmod1 による MMP13 発現制御機構を明らかにするため、MMP13 発現に関与するシグナルを検討した。pERK、p-p38、pJNK、β-catenin に関して検討を行ったところ、Tmod1 ノックダウンによりβ-catenin 発現が抑制されることが明らかとなった (図 6A)。また、β-catenin の核移行およびβ-catenin /TCF-Lef 複合体の転写活性も Tmod1 ノックダウンにより抑制されることを確認している (図 6B, 6C)。さらに、Tmod1 ノックダウンによるβ-catenin のタンパク質発現低下は mRNA レベルあるいはタンパク質レベル、どちらにより制御を受けているのかを検討した。β-catenin の mRNA 発現量を Real-Time PCR 法により検討を行ったところ、Tmod1 ノックダウ

ンによる mRNA 発現の低下は認められなかった (図 6D)。そこで、 β -catenin のタンパク質発現は翻訳後のプロテアソーム分解による制御を受けているのではないかと考え、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて検討を行った。 β -catenin のタンパク質発現量は MG132 添加により蓄積し、Tmod1 ノックダウン細胞において見られた β -catenin の発現低下が抑制された (図 6E)。

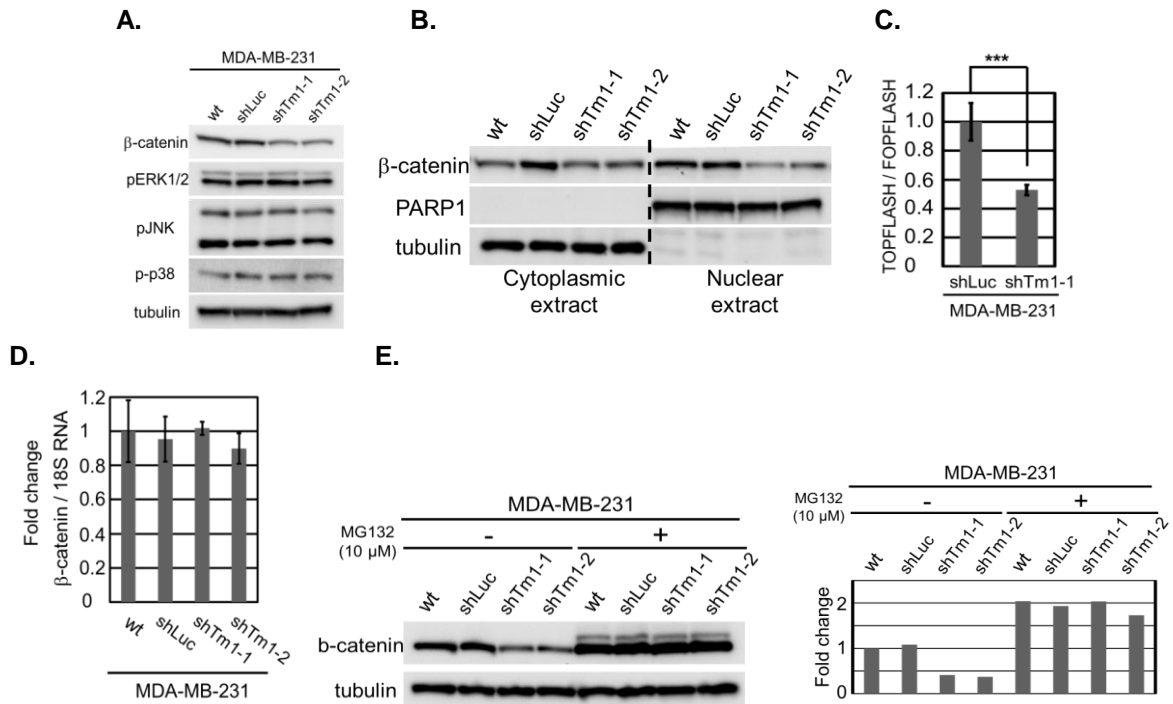


図 6 MMP13 発現制御機構の解析

以上のことより、Tmod1 は β -catenin のプロテアソーム分解を抑制し、タンパク質の安定化を促進しているのではないかと示唆された。現在、Tmod1 による β -catenin タンパク質安定化制御機構の詳細な検討を行っている。

【結語】

本研究から、新規 NF- κ B 標的遺伝子 Tmod1 が basal-like type 乳癌の悪性化に関与していることが確認された。また、Tmod1 は β -catenin のタンパク質安定化を促進することで、その標的遺伝子 MMP13 の発現を制御しているのではないかと考えられた。今後、MMP13 に関するノックダウン実験を行い、3D 増殖能に MMP13 が関与しているかどうかを検討していきたい。

basal-like type 乳癌において Tmod1 は高発現していることから、本研究成果ががん治療薬の開発につながることを期待する。