

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

乳がん・子宮がんにおける性ホルモン応答遺伝子の機能解明と治療標的への応用

研究代表者 佐藤 航(ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門)

乳がん、子宮内膜がんは共に女性ホルモンであるエストロゲンがその増殖に関与するホルモン依存性のがんであり、両者ともにエストロゲン受容体 α (ER α)を発現しているものが多い。エストロゲン受容体は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写因子として機能し、応答遺伝子の発現量を制御することによってがん増殖、進展に関わっている¹⁾。臨床においては、乳がんでは、ER α の機能阻害を目的としてアンタゴニスト(タモキシフェンなど)や、エストロゲン産生の阻害を目的としたアロマターゼ阻害剤などを用いたホルモン療法が行なわれている。しかし、治療過程においてホルモン療法に対して耐性を獲得するがんが生じることが問題になっており、このようながんに対しては有効な治療方法が存在しない。また、ホルモン療法に対して抵抗性を獲得した後もERが陽性のままであることが多く、その分子機構は不明である。子宮がんでは、ホルモン療法としてプロゲステロン療法が行われている。しかしながら、術後補助療法としてのホルモン療法による生存率の改善効果が乏しいことから、子宮がんではホルモン療法の使用は限定的である。これらの状況を克服するには、乳がんと子宮がんにおけるエストロゲン応答性の特異性、ホルモン療法に対する反応性、ならびにエストロゲン依存性から非依存性の増殖機構を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムなどを明らかにする必要があると考えられる。

我々は、エストロゲンシグナルの解明を目的に、エストロゲン応答遺伝子の同定、機能解析を進めている。Efpは乳がん細胞においてエストロゲン応答遺伝子として単離したものであり、Efp遺伝子の3'非翻訳領域にER α の結合配列が存在し、エストロゲンによって転写が活性化されることを見出した²⁾。Efpの生体における機能解明を目的にEfp遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作製したところ、子宮の低形成が認められるとともに、Efpのエストロゲン誘発性発現が消失しており、Efpは子宮の生理的機能に重要な役割を担うことが明らかになった³⁾。Efpの乳がんにおける作用に関しては、乳がん細胞MCF-7において、エストロゲン誘導性にEfpの発現が誘導されることが認められた。また、乳がんの臨床病理学的解析により、Efp免疫反応性がリンパ節転移、ER α の発現と正の相関があり、

組織学的グレードと負の相関があることが認められている⁴⁾。さらに、乳がん患者の無再発生存率および全生存率の多変量解析により、Efp免疫反応性は予後不良と相関することが示された⁴⁾。Efpを介する乳がんの増殖に関わるメカニズムとしては、Efpがユビキチンリガーゼとして、細胞周期チェックポイントとして機能する14-3-3 σ のユビキチン修飾を行い、プロテアソームによる分解を促進することを明らかにした⁵⁾。これらのことより、Efpがエストロゲン依存性のがん増殖に重要な因子であり、新たな治療標的となることが考えられた。

一方、近年、二本鎖RNAと相補的な塩基配列を持つmRNAが分解される現象を利用したRNA干渉(RNAi)の技術が、基礎研究のみならず、臨床応用を目指して開発されている。特に、21-23塩基の二本鎖低分子RNAであるsmall interfering RNA (siRNA)は、がん関連遺伝子の発現抑制を可能にする治療法への応用が注目されている。しかし、siRNAはしばしば標的遺伝子以外の遺伝子をノックダウンする(オフターゲット効果)ことが知られており、望ましくない副作用を引き起こす可能性が指摘されている。加えて、二本鎖RNAは、炎症性サイトカインおよびI型インターフェロンの産生を誘導することが知られており、副作用の要因の1つになりうる。最近、siRNA配列とRNAi活性との相関関係について系統的研究が行われ、オフターゲット効果が低く、且つ、遺伝子発現抑制有効に優れたsiRNA配列を検索するための新しいアルゴリズムが開発された⁶⁾。さらに、siRNAの一部の配列をDNAで置換したDNA修飾siRNA(キメラsiRNA)は、オフターゲット効果が少なく、免疫応答誘導性が低いことが明らかにされ、臨床での応用に好都合な性質をもつsiRNAとして期待されている。

そこで我々は、Efpを標的とする有効なsiRNAを設計するため、上記のアルゴリズムを用いて、有力な候補配列を複数得た。これらのEfpに対するsiRNA (siEfp)をMCF-7細胞に導入し、Efp遺伝子の発現抑制効率を評価し、最も発現抑制効果の高い配列を選別した⁷⁾。また、キメラsiEfpは、siEfpと同様に効率的にMCF-7細胞におけるEfp発現を抑制することが確かめられた。さらに、14-3-3 σ タンパク質の発現に対するsiEfpおよびキメラsiEfpの効果

を解析したところ、siEfpおよびキメラsiEfpは、MCF-7細胞における14-3-3σタンパク質の発現を増加させることが判明した。また、これらのsiRNAおよびキメラsiRNAをMCF-7細胞に導入したところ細胞増殖を抑制することが確かめられた。

MCF-7細胞の細胞周期進行に対するこれらsiRNAの影響を解析したところ、エストロゲン存在下ならびに非存在下においても、siEfpおよびキメラsiEfpはS期の細胞の割合を減少させ、反対にG0/G1期の細胞の割合を増加させることが確かめられた。

乳がん細胞の*in vivo*増殖に対するsiRNAおよびキメラsiEfpの効果を評価するため、MCF-7細胞を免疫不全マウスの皮下に注射し異種移植モデルを作製した。この形成された腫瘍にsiEfpを投与することにより、コントロールのsiRNA (siControl)と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された。また、形成された腫瘍組織におけるEfpおよび14-3-3σタンパク質の発現レベルは、siControl処置マウスと比較して、Efpタンパク質の発現量は減少し、14-3-3σタンパク質の発現量は増加していた。また、同一の*in vivo*モデルを用いて、MCF-7細胞の腫瘍形成に対するキメラsiEfpの効果を調べたところ、キメラsiEfpはキメラsiControlと比較して、腫瘍の増殖を有意に抑制することが示された。キメラsiEfpを投与した腫瘍において、Efpタンパク質の発現が有意に抑制され、14-3-3σの発現が上昇することが認められた。これらの結果より、siEfpおよびキメラsiEfpが、乳がん細胞におけるEfp発現を特異的に抑制することにより、生体において腫瘍増殖を効果的に抑制することが示された。

加えて、Efpは子宮内膜がんにおいても発現しており、がん増殖に関与している可能性が考えられている。Efpは乳がんの約70%で発現しており、さらに、ERαの発現に関わらず、乳がんの独立した予後因子となることが示されている⁴⁾。従って、Efpは、ERα陽性の乳がん、子宮がんのみにとどまらず、ERαを発現していない内分泌抵抗性の乳がん、子宮がんにおいても新しい治療標的となりうる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Muramatsu M, Inoue S. Estrogen Receptors: How Do They Control Reproductive and Nonreproductive Functions? *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 1-10.
- 2) Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, Ikegami A, Ouchi Y, Orimo H, Muramatsu M. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11117-21.
- 3) Orimo A, Inoue S, Minowa O, Tominaga N, Tomioka Y, Sato M, Kuno J, Hiroi H, Shimizu Y, et al. Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12027-32.
- 4) Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, et al. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6148-54.
- 5) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002; 417: 871-5.
- 6) Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, Nishi K, Yamato K, Takahashi F, Juni A, Saigo K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 2136-51.
- 7) Ueyama K, Ikeda K, Sato W, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits Breast cancer cell proliferation and *in vivo* tumor growth. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 624-32.

研究成果リスト

論文

- 1) Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Inoue S. MicroRNA Library-Based Functional Screening Identified Androgen-Sensitive miR-216a as a Player in Bicalutamide Resistance in Prostate Cancer. *J Clin Med* 2015; 4: 1853.

学会発表

- 1) 佐藤航, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. エストロゲン応答遺伝子Efpを標的とする小分子核酸の子宮内膜がんモデルにおける治療効果. 第13回RCGMフロンティアシンポジウム, 2015年10月30日, 日高市
- 2) Sato W, Abe Y, Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Takeda S, Horie-Inoue K, Inoue S. Efp as a therapeutic target for endometrial cancer. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier, November 11, 2016, Hidaka-shi, Japan.
- 3) 池田和博, 佐藤航, 堀江公仁子, 井上聡. エストロゲン応答遺伝子Efpは子宮内膜がんの治療標的となる, 第23回日本ステロイドホルモン学術集会, 2016年1月15日, 倉敷市