

## YB - 1を中心とした乳癌及び胃癌の新規治療戦略

柴田, 智博

<https://doi.org/10.15017/1654807>

---

出版情報：九州大学, 2015, 博士（臨床薬学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

博士論文

YB-1 を中心とした乳癌及び胃癌の  
新規治療戦略

2016 年

九州大学大学院薬学府 臨床薬学専攻

創薬腫瘍科学講座

柴田 智博

## [目次]

	ページ
【略語】	3
【要旨】	5
【序論】	7
【本論】	
<b>第1部 乳癌細胞における YB-1 による ER<math>\alpha</math> 及び HER2 発現制御 とそのメカニズム</b>	
第1章 YB-1 誘導 HER2 発現に対する ER $\alpha$ の関与	12
第2章 乳癌細胞における YB-1 による ER $\alpha$ 発現制御	25
第3章 乳癌における YB-1 発現と治療薬感受性	35
結果と考察	40
<b>第2部 胃癌細胞における YB-1 による HER2 発現制御とそのメカニズム</b>	
第1章 胃癌細胞における YB-1 による HER2 発現制御	45
第2章 胃癌における YB-1 発現と治療薬感受性	49
結果と考察	51
【方法】	53
【参考文献】	65
【業績】	72
【謝辞】	75

[略 号]

本論文中以下の略号を用いる

Akt: protein kinase B

ATP: Adenosine-5'-triphosphate

BMI1: B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog

cDNA: complementary DNA

c-Met: c-Mesenchymal-Epithelial Transition factor

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation

CHX: Cycloheximide

CSS: Charcoal Stripped Serum

DEPC: diethyl pyrocarbonate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: deoxyribonucleic acid

Dox: Doxycycline

DISH: Dual in situ hybridization

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Etylene Diamine Tetraacetic Acid

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EGFR-TKI: EGFR-tyrosine kinase inhibitor

ER $\alpha$ : Eestrogen Receptor  $\alpha$

Erk: Extracellular signal-Related Kinase

FBS: Fetal Bovine Serum

Fig: Figure

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HER3: Human Epidermal Growth Factor Receptor 3

HRP: horseradish peroxidase

mRNA: messenger RNA

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF: poly vinylidene difluoride

RNA: ribonucleic acid

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

RSK2: Ribosomal S6 Kinases 2

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

siRNA: small interfering RNA

Tam: Tamoxifen

TBS: Tris Buffered Saline

Ub: Ubiquitin

YB-1: Y-box binding protein-1

## 【要旨】

現在、がんの上皮増殖因子受容体 EGFR ファミリー分子（EGFR、HER2、HER3、HER4）を標的とした分子標的薬が数多く開発されており、治療方針を決定する上でがん細胞での EGFR ファミリー分子の発現や変異の有無が非常に重要となっている。EGFR ファミリーの1つである HER2 の遺伝子増幅又は過剰発現は乳癌や胃癌患者の予後不良因子として知られている。近年、抗 HER2 抗体である Trastuzumab（Herceptin®）の登場により HER2 陽性乳癌患者や胃癌患者の予後が大きく改善された。そのため、治療標的として HER2 が乳癌や胃癌を含む様々ながん種で大きな注目を集めている。

YB-1 は Cold Shock Domain を含む原始的な多機能制御因子であり、がんの多剤耐性獲得、増殖及び細胞周期に重要な役割を担っている。これまでに当研究室において、YB-1 は抗がん剤耐性に関わる MDR1/Pgp や EGFR ファミリーの発現を制御する転写因子であることを報告してきた。また、核内での YB-1 の発現が乳癌や肺癌細胞において EGFR ファミリーのなかで HER2 の発現をより特異的に制御していることを報告した。

さらに、YB-1 は乳癌のオンコプロテインであり、乳癌患者で核内 YB-1 発現は乳癌の増殖に関わる ER $\alpha$  及び HER2 発現と関連することが報告されている。乳癌細胞の増殖及び悪性進展は HER2 発現とともにホルモン受容体であるエストロゲン受容体 ER $\alpha$  発現に緊密に依存しており、乳癌患者の約 90% は ER $\alpha$  及び HER2 のいずれかを発現している。そのため、ER $\alpha$  及び HER2 は乳癌の治療標的として非常に重要であり、治療薬選択の際のバイオマーカーとして用いられる。しかし、YB-1 による ER $\alpha$  及び HER2 発現制御の詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、第 1 部では乳癌細胞を用い YB-1 による ER $\alpha$  及び HER2 発現制御メカニズムの解明と YB-1 が HER2 標的薬の治療感受性と関連するか否かについて検討を行った。

他方、近年 HER2 陽性胃癌患者に対する Trastuzumab の有効性が報告され、臨床応用され

ている。そのため、HER2 の発現制御メカニズムの解明と治療感受性を規定する因子を同定することは胃癌の治療戦略の発展につながると考えた。そこで、第 2 部では胃癌における YB-1 の HER2 発現への関与や HER2 標的薬の感受性との関連について検討を行った。

第 1 部では、乳癌において、【1】 ER $\alpha$  陽性乳癌細胞で、核内 YB-1 発現誘導は HER2 発現を亢進し ER $\alpha$  発現が低下した。【2】 ER $\alpha$  標的薬 (tamoxifen、fulvestrant) は YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合を増加させ、HER2 発現が亢進した。【3】 YB-1 発現誘導は、ER $\alpha$  のユビキチン化の増加と ER $\alpha$  のプロテアソームでの分解が亢進した。【4】 マウス皮下移植モデルにおいて、YB-1 発現誘導は tamoxifen 治療に抵抗性を示した。第 1 部において、乳癌において、YB-1 による ER $\alpha$  及び HER2 発現制御メカニズムを明らかにし、YB-1 が内分泌治療薬の感受性の指標となることを示した。

第 2 部では、胃癌において、【1】 siRNA を用いた YB-1 発現抑制条件下においては胃癌細胞の HER2 発現が特異的に低下した。【2】 HER2 遺伝子増幅を示す胃癌細胞株における YB-1 発現抑制により、HER2 標的薬 lapatinib に対する感受性の低下と下流シグナル因子 Akt の活性化が維持された。【3】 クロマチン免疫沈降法により YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合が観察された。第 2 部において、胃癌において YB-1 による HER2 発現制御メカニズムを明らかにし、HER2 標的薬の感受性の指標となることを示した。

今後、これらの知見を基盤にして、核内 YB-1 発現の有無を検討することにより乳癌と胃癌の分子病態を把握することが、HER2 標的薬や内分泌治療薬の治療適正化を目指した新規がん治療戦略の創出へ貢献できると考えている。

## 【序論】

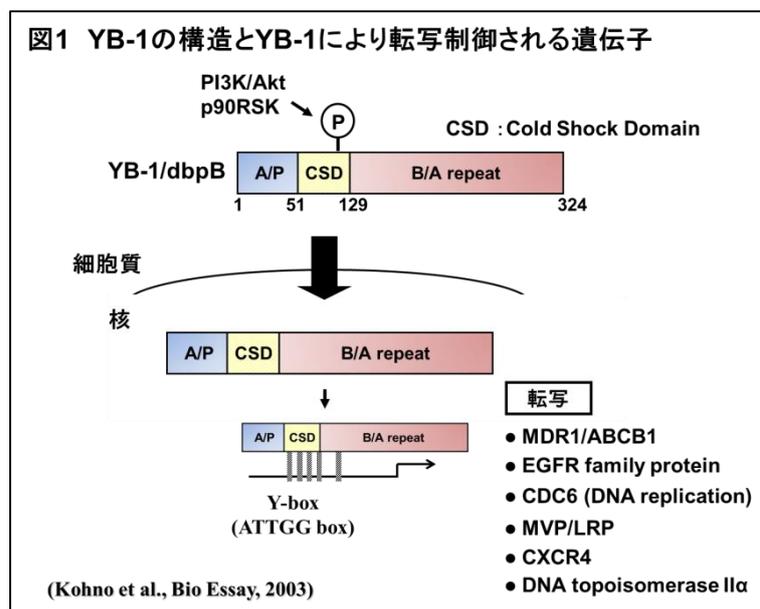
現在、がんの上皮増殖因子受容体（EGFR）ファミリーを標的とした分子標的薬が数多く開発されており、がんの治療方針を決定する上でがん細胞での EGFR ファミリーの発現や変異の有無が非常に重要となっている<sup>(1)</sup>。EGFR ファミリーは、ErbB1/EGFR/HER1、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3 及び ErbB4/HER4 の 4 種類に分類される。EGFR ファミリーを標的とした分子標的薬は様々ながん種で既に臨床応用されており、EGFR を標的とした薬剤は主に EGFR に増殖が依存している肺癌や大腸癌に対し、また、HER2 を標的とした薬剤は HER2 に増殖が依存している乳癌や胃癌に対し用いられている（表 1）<sup>(1)</sup>。

一般名/商品名	標的分子	適応がん腫	承認年
Trastuzumab/Herceptin	HER2	乳癌、胃癌	2001
Gefitinib/Iressa	EGFR	非小細胞肺癌 (EGFR/exon19del,L858R)	2002
Erlotinib/Tarceva	EGFR	非小細胞肺癌、膵癌	2007
Cetuximab/Erbitux	EGFR	大腸癌、頭頸部癌	2008
Lapatinib/Tykerb	EGFR/HER2	乳癌	2009
Panitumumab/Vectibix	EGFR	大腸癌	2010
Pertuzumab/Perjeta	HER2	乳癌	2013
Trastuzumab emtansine/Kadcyla	HER2	乳癌	2013
Afatinib/Gilotrif	EGFR/HER2	非小細胞肺癌 (EGFR/exon19del,L858R)	2014

HER2 の遺伝子増幅又は過剰発現は乳癌患者の予後不良因子として知られている<sup>(2,3)</sup>。2001 年、抗 HER2 抗体薬である Trastuzumab（Herceptin®）の登場により HER2 陽性乳癌患者の予後が大きく改善された<sup>(4,5)</sup>。また、HER2 標的小分子薬として EGFR 及び HER2 チロシンキナーゼ阻害薬である Lapatinib（Tykerb®）が HER2 陽性乳癌に対し投与され、Trastuzumab 耐性乳癌に対する有効性が報告されている<sup>(6-8)</sup>。さらに、HER2 の遺伝子増幅又は過剰発現は胃癌の予後不良因子として

も知られている。胃癌の約 20-30%に HER2 の遺伝子増幅が起こることが報告されており、HER2 陽性胃癌患者に対する Trastuzumab の有効性を検討した第三相臨床試験 (ToGA trial) では、5-FU を中心とした既存の化学療法と Trastuzumab の併用が有意に予後を延長することが示された<sup>(9-12)</sup>。現在も乳癌や胃癌を対象に HER2 を標的とした治療薬の開発が活発に進められている。

Y-ボックス結合タンパク -1 (YB-1/dbpB) は、細菌からヒトにまで保存され、DNA や RNA との結合に重要な Cold Shock Domain (CSD) を持つ 49kDa の原始的タンパク質である<sup>(13,14)</sup>。YB-1 は、DNA との結合能が高く、転写因子の 1 つで



あることを我々の研究グループより報告している (図 1)<sup>(13,14)</sup>。さらに、YB-1 は転写因子としてだけでなく DNA 障害修復、mRNA 安定化、ゲノム不安定化など多様な機能を有している<sup>(15,16)</sup>。また、YB-1 のノックアウトマウスは胎生致死であり、ノックアウトマウスの胎児より単離された線維芽細胞 (MEF) は野生型マウスと比較し、増殖能が有意に低下していることが報告されている<sup>(17)</sup>。このことは、YB-1 が細胞の生存や増殖においても非常に重要な役割を担っていることを示している。

一方 YB-1 のがん悪性進展への関与について、当研究室及び Royer らは、がんの多剤耐性を担う ABC トランスポーター ABCB1/MDR1/P-gp の発現制御に YB-1 が関与するという事を明らかにした<sup>(18,19)</sup>。その後我々を含む多くの研究室により、YB-1 の核内高発現や発現上昇が卵巣癌や骨肉腫、肺癌、小児グリオーマなどの多くのがん種の患者における予後不良因子であり、薬剤耐性の獲得

がん種	核内YB-1との関連が報告されている特性
卵巣癌	シスプラチン耐性 P糖タンパク発現 予後不良
乳癌	パクリタキセル耐性 P糖タンパク発現 予後不良
骨肉腫	P糖タンパク発現
滑膜肉腫	P糖タンパク発現 予後不良
前立腺癌	P糖タンパク発現 抗アンドロゲン療法耐性
肺癌	予後不良
膠芽腫	予後不良
多発性骨髄腫	予後不良

やがんの増殖及び転移を亢進することが報告された (表 2)<sup>(20-24)</sup>。また、YB-1 のがん細胞における重要な役割の 1 つは転写因子として cyclin A、cyclin B、CDC6、EGFR、HER2 発現を制御し、細胞の増殖や細胞周期に寄与することである<sup>(25-30)</sup>。さらに、乳癌及び肺癌細胞において① YB-1 が EGFR や HER2 のプロモーター領域へ結合すること、② YB-1 の発現抑制は EGFR 及び HER2 の発現を減少させることを我々の研究グループより報告している<sup>(28,29)</sup>。

YB-1 は乳癌において、腫瘍形成や悪性進展に深く関与することが多数報告されている。2005 年に Bergmann らは、YB-1 のノックインマウスは様々な病理像を示す乳癌を 100%発症することから、YB-1 は乳癌のオンコプロテインの 1 つであることを報告した<sup>(31)</sup>。さらに、乳腺上皮細胞は、YB-1 強制発現により段階的に乳癌の形質を獲得することが報告されている<sup>(32)</sup>。初期段階では、YB-1 がヒストンアセチル化酵素である p300 の発現を誘導することで、自己複製能に関わる B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (BMI1) などのプロモーターへの

結合が促進し、後期段階では **RSK2** シグナルやホルモン受容体の発現低下を誘導しトリプルネガティブ乳癌の形質の獲得を引き起こすことが報告されている。これらの報告は、**YB-1** が乳癌の腫瘍形成や悪性進展に深く関与していることを示唆している。

他方、乳癌細胞の増殖及び悪性進展は **HER2** 発現とともにホルモン受容体であるエストロゲン受容体 ( $ER\alpha$ ) 発現に緊密に依存しており<sup>(33)</sup>、乳癌患者の約 90% は  $ER\alpha$  または **HER2** のいずれかを発現している<sup>(34)</sup>。  $ER\alpha$

**表3 乳癌のサブタイプと治療薬** (Goldhirsch et al., Ann Oncol. 2011)  
がん細胞の増殖を促進する因子を標的とした治療薬が使用される

サブタイプ	増殖因子	治療薬
<b>Luminal A</b>	<b>ER and/or PgR 陽性</b> HER2 陰性 Ki67 低値(<14%)	ホルモン治療 (LHRH agonist, aromatase inhibitor, tamoxifen, fulvestrant)
<b>Luminal B - HER2 negative</b>	<b>ER and/or PgR 陽性</b> HER2 陰性、Ki67 高値	ホルモン治療
<b>Luminal B - HER2 positive</b>	<b>ER and/or PgR 陽性</b> <b>HER2 過剰発現もしくは増幅あり</b> 、Ki67 低～高値	ホルモン療治療 and/or <b>HER2標的薬</b>
<b>HER2 disease</b>	ER and PgR 陰性 <b>HER2 過剰発現もしくは増幅あり</b>	<b>HER2標的薬</b> (trastuzumab, lapatinib)
<b>Triple negative</b>	ER and PgR 陰性 HER2 陰性	殺細胞性抗がん剤 (5-FU, cyclophosphamide, paclitaxel)

は乳癌患者の約 70% に発現し、リガンドである  $17\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ ) が結合し活性化体となることで転写因子として細胞周期関連因子や増殖因子の発現を誘導する<sup>(35)</sup>。この  $ER\alpha$  と **HER2** の発現を指標にして、 $ER\alpha$  陽性乳癌患者に対しては、 $E_2/ER\alpha$  標的薬である Tamoxifen (Nolvadex<sup>®</sup>) や Fulvestrant (Faslodex<sup>®</sup>)、Anastrozole (Arimidex<sup>®</sup>) などを中心としたホルモン治療が行われ、**HER2** 陽性乳癌患者に対しては **HER2** 標的薬が用いられる (表 3)<sup>(36)</sup>。そのため、 $ER\alpha$  及び **HER2** 発現は乳癌治療薬選択の際のバイオマーカーとして非常に重要である。乳癌に関して、我々の研究グループは **YB-1** 核内発現が **HER2** 発現と正の相関 ( $P = 0.0153$ ) を示し、 $ER\alpha$  発現と負の相関 ( $P = 0.0122$ ) を示すことを報告している<sup>(28)</sup>。しかし、**YB-1** による  $ER\alpha$  及び **HER2** 発現制御の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

以上の背景より、第 1 部では乳癌細胞を用い YB-1 による ER $\alpha$  及び HER2 制御メカニズムの解明と YB-1 が乳癌治療薬の治療感受性と関連するか否かについて検討を行った。

また、胃癌においても HER2 は非常に重要な標的因子であり、HER2 の発現制御メカニズムの解明と治療感受性を規定する因子の同定は胃癌の治療戦略の発展に重要である。そこで、第 2 部では、胃癌細胞において YB-1 が HER2 発現を制御するか否かを明らかにし、HER2 標的薬の治療感受性と関連するか否かを検討した。

## 【本論】

# 第1部 乳癌細胞における YB-1 による ER $\alpha$ 及び HER2

## 発現制御とそのメカニズム

### 第1章 YB-1 誘導 HER2 発現に対する ER $\alpha$ の関与

2008年に当研究室から、① YB-1 発現抑制により ER $\alpha$  陽性細胞でのみ HER2 発現が抑制されること、② 乳癌患者における核内 YB-1 発現が HER2 発現と正の相関を ER $\alpha$  発現と負の相関を示すこと、③ 乳癌患者において HER2 発現が ER $\alpha$  発現と負の相関を示すことを報告した<sup>(28)</sup>。そのため、HER2 発現に YB-1 や ER $\alpha$  が関わっていることが考えられるが、YB-1 と ER $\alpha$  と HER2 間の関連については明らかになっていない。そこで、まず HER2 発現に ER $\alpha$  が関与するか否か検討を行った。

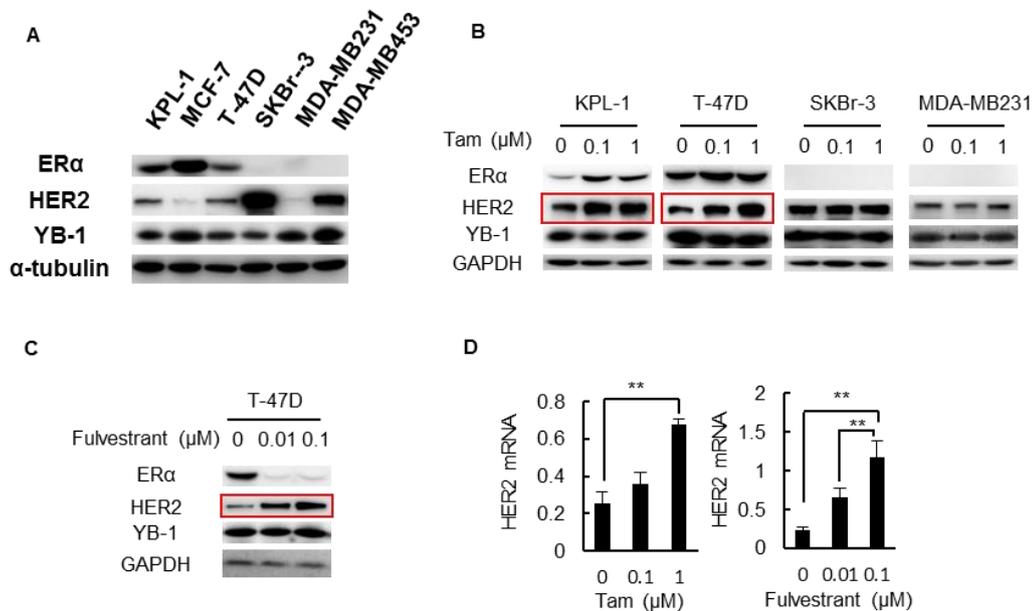
#### 乳癌細胞株での HER2 発現に対する ER $\alpha$ 標的薬の効果検討

本研究では、ER $\alpha$  陽性乳癌細胞株3株 (KLP-1、MCF-7、T-47D) と ER $\alpha$  陰性乳癌細胞株3株 (SKBr-3、MDA-MB231、MDA-MB453) を用い検討を行った (Fig. 1A)。

ER $\alpha$  標的薬による HER2 発現への関与を検討するため、tamoxifen (ER $\alpha$  antagonist) 処理後の HER2 発現を検討した。その結果、ER $\alpha$  陽性細胞で tamoxifen の濃度依存的に HER2 発現の上昇が観察された。一方、ER $\alpha$  陰性細胞では tamoxifen 処理による HER2 発現に変化は観察されなかった (Fig. 1B)。

また、fulvestrant (ER $\alpha$  down regulator) 処理により ER $\alpha$  陽性細胞 T-47D での HER2 発現上昇が観察された (Fig. 1C)。さらに、T-47D での tamoxifen、fulvestrant 処理後の *HER2* mRNA 発現量を検討したところ、薬剤処理により濃度依存的に *HER2* mRNA 発現量の増加が観察された (Fig. 1D)。

以上の結果より、ER $\alpha$  陽性乳癌細胞における ER $\alpha$  の阻害は mRNA レベルでの HER2 発現を増加させることが明らかになった。



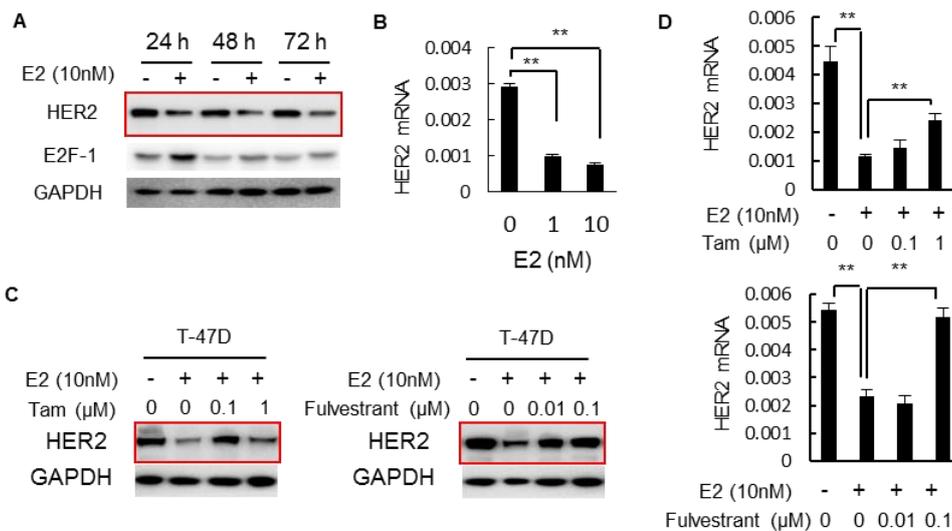
**Figure 1** 乳癌細胞株における、HER2 発現に対する ER $\alpha$  標的薬の影響

- (A) 乳癌細胞株での ER $\alpha$ 、HER2、YB-1 発現を Western-Blot 法で検討した。  
 (B) Tamoxifen 72 時間処理後の ER $\alpha$ 、HER2、YB-1 発現。  
 (C) Fulvestrant 72 時間処理後の ER $\alpha$ 、HER2、YB-1 発現。  
 (D) T-47D における tamoxifen 又は fulvestrant 48 時間処理後の *HER2* mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により検討。Mean $\pm$ S.D., n=3. \*\*P<0.01

## HER2 発現に対するエストラジオールの効果検討

次に、ER $\alpha$  の活性が HER2 発現に関与するか否かを検討するため、ER $\alpha$  の agonist である 17 $\beta$ -エストラジオール(E2)処理後の HER2 発現を検討した。T-47D を E2 処理すると HER2 タンパク及び mRNA 発現量の減少が観察された (Fig. 2A,B)。E2 が機能的に作用しているか否かのコントロールとして、E2 により発現亢進するタンパクの1つである E2F-1 を用いた。この E2 による HER2 タンパク及び mRNA 発現量の減少は tamoxifen 又は fulvestrat により回復した (Fig. 2C,D)。

以上の結果から、ER $\alpha$  活性化は HER2 発現を抑制することが明らかになった。

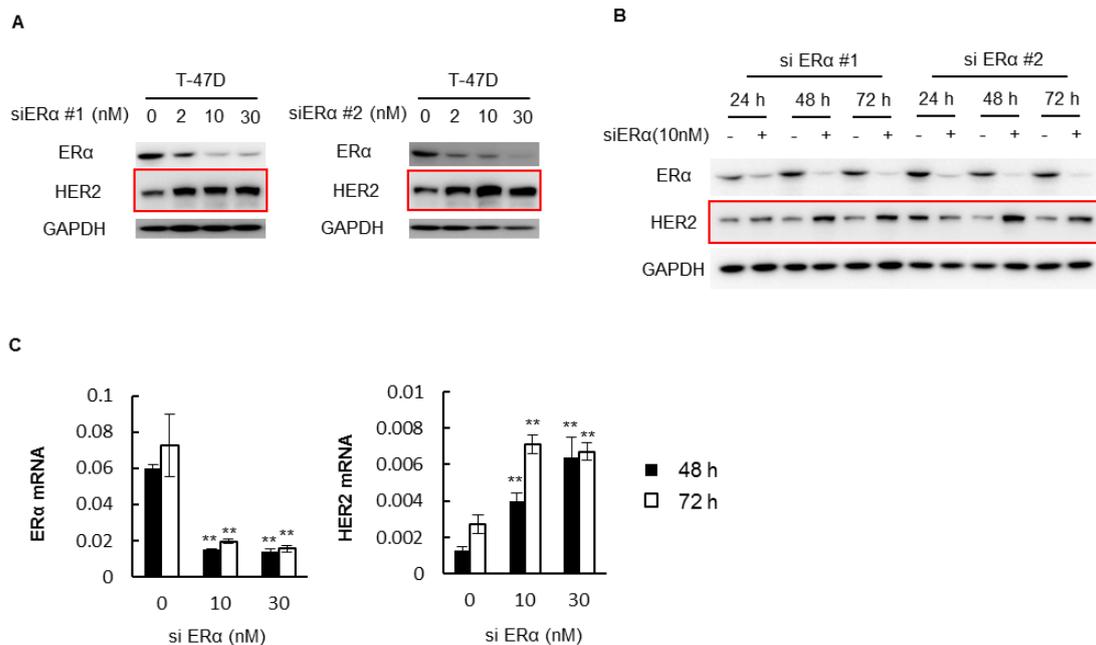


**Figure 2** 乳癌細胞株における、HER2 発現に対するエストラジオールの影響  
 (A) T-47D をチャコール処理血清含有培地で 24 時間培養後、E2 (10nM) を 24-72 時間処理後の HER2、E2F-1 発現を Western-Blot 法で検討した。  
 (B) T-47D における E2 (10nM) 48 時間処理後の HER2 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により検討。Mean±S.D., n=3. \*\*P<0.01  
 (C)(D) T-47D をチャコール処理血清含有培地で 24 時間培養後、E2 (10nM) と tamoxifen 又は fulvestrant を同時処理後 72 時間での HER2 発現と 48 時間での HER2 mRNA 発現をそれぞれ Western-Blot 法と real-time RT-PCR 法で検討した。Mean±S.D., n=3. \*\*P<0.01

## HER2 発現に対する ER $\alpha$ siRNA による ER $\alpha$ 発現抑制の効果検討

次に、ER $\alpha$  発現の抑制が HER2 発現に影響を与えるか否か ER $\alpha$  に対する siRNA を用いて検討した。ER $\alpha$  siRNA 処理による ER $\alpha$  発現抑制は 2 種類の ER $\alpha$  siRNA (#1、#2) それぞれで濃度及び時間依存的に HER2 タンパク発現を上昇させた (Fig. 3A,B)。同様に、ER $\alpha$  siRNA の濃度及び時間依存的に HER2 mRNA 発現上昇が観察された (Fig. 3C)。

以上の結果から、ER $\alpha$  陽性細胞では、ER $\alpha$  が HER2 発現を負に制御していると考えられる。



**Figure 3 ER $\alpha$  発現抑制の HER2 発現に対する影響**

(A) T-47D 細胞に対し、ER $\alpha$  siRNA (2、10、30nM) 導入後 72 時間での ER $\alpha$ 、HER2 発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) T-47D 細胞に対し ER $\alpha$  siRNA (10nM) 導入後 24、48、72 時間での ER $\alpha$ 、HER2 発現を Western-Blot 法で検討した。

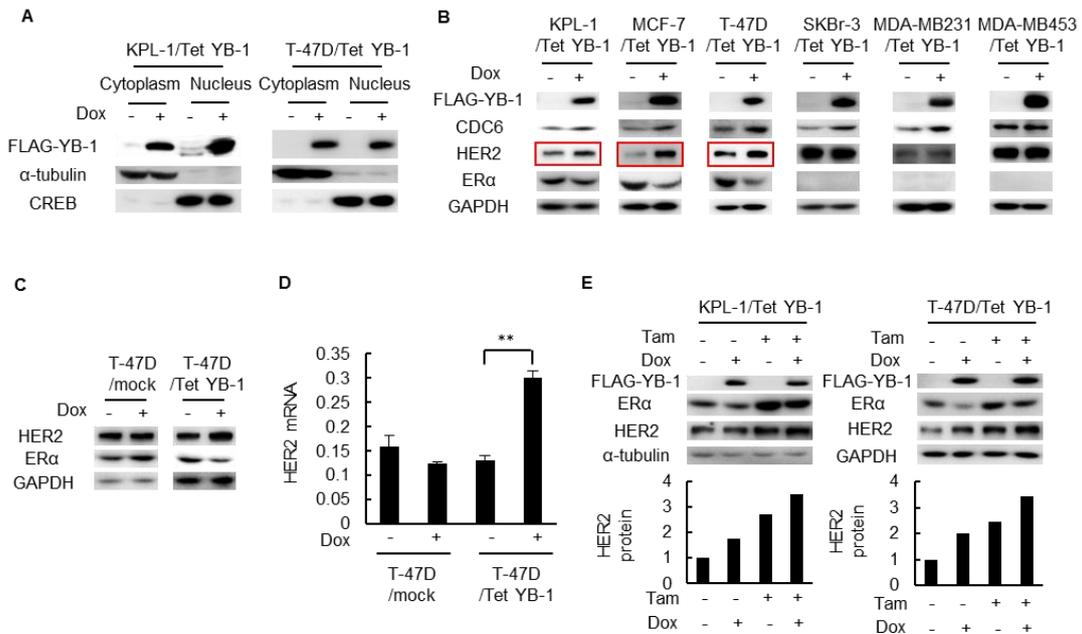
(C) T-47D 細胞に対し ER $\alpha$  siRNA (10nM) 導入後 48、72 時間での ER $\alpha$  mRNA、HER2 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で検討した。Mean $\pm$ S.D., n=3. \*\* $P$ <0.01

## 核内 YB-1 誘導時の ER $\alpha$ 発現と HER2 発現に対する効果検討

次に、核移行シグナルを有する YB-1 の発現誘導系 (FLAG-YB-1 Tet-On システム、産業医科大学 和泉弘人准教授との共同研究で作成) を駆使し、YB-1 の核内発現を誘導した際の HER2 と ER $\alpha$  の発現について検討を行った。

まず、YB-1 Tet-On システムを導入した際に doxycycline (Dox) 処理により核内の YB-1 発現が誘導されることを確認した (Fig. 4A)。YB-1 Tet-On システムを乳癌細胞株 6 株に導入し YB-1 発現を誘導したところ、ER $\alpha$  陽性細胞でのみ HER2 発現の上昇が観察されたが、ER $\alpha$  陰性細胞では HER2 発現に変化は観察されなかった (Fig. 4B)。また、ER $\alpha$  陽性細胞で YB-1 発現誘導により ER $\alpha$  発現が減少した (Fig. 4B)。発現誘導された YB-1 が機能的に作用しているか否かのコントロールとして、YB-1 により発現誘導されるタンパクの 1 つである CDC6 を用いた<sup>(30)</sup>。いずれの乳癌細胞においても YB-1 発現誘導により CDC6 発現が増加した (Fig. 4B)。また、T-47D 細胞に YB-1 Tet-On システムを安定的に導入した T-47D/Tet YB-1 株及び T-47D/mock 株を作成した。T-47D/Tet YB-1 でのみ Dox 処理により HER2 発現上昇と ER $\alpha$  発現減少が観察された (Fig. 4C)。一方、T-47D/mock では Dox を処理した場合でも HER2、ER $\alpha$  に変化は認められなかった (Fig. 4C)。また、Dox 処理により T-47D/Tet YB-1 でのみ HER2 mRNA 発現上昇が観察された (Fig. 4D)。KPL-1/Tet YB-1 及び T-47D/Tet YB-1 に対し、Dox と tamoxifen の併用実験を行ったところ、それぞれ単独処理で HER2 発現が上昇し、併用により HER2 発現はさらに増加することが観察された (Fig. 4E)。

以上の結果より、ER $\alpha$  陽性乳癌細胞における YB-1 発現の誘導は ER $\alpha$  発現を減少させた。さらに、HER2 発現を増加させ、tamoxifen の併用によりその効果がさらに増強されることを示した。



**Figure 4 YB-1 Tet-On システムを用いた核内 YB-1 誘導時の ER $\alpha$  発現と HER2 発現**

(A) KPL-1、T-47D の YB-1 Tet-On システム安定導入株 (KPL-1/Tet YB-1、T-47D/Tet YB-1) を作成。Dox (1 $\mu$ g/ml) 72 時間処理後、細胞質分画と核分画に分離し、核分画の FLAG-YB-1 発現を Western-Blot 法で検討した。核分画の control とし CREB を、細胞質分画の control とし  $\alpha$ -tubulin を用いた。

(B) 乳癌細胞株 6 株に対し、YB-1 Tet-On システムを導入し、Dox (1 $\mu$ g/ml) 72 時間処理後の FLAG-YB-1、CDC6、HER2、ER $\alpha$  発現を Western-Blot 法で検討した。

(C) T-47D の Tet-On システム安定導入株を用い、Dox (1 $\mu$ g/ml) 72 時間処理後の HER2、ER $\alpha$  発現を Western-Blot 法で検討した。

(D) T-47D の Tet-On システム安定導入株を用い、Dox (1 $\mu$ g/ml) 48 時間処理後の HER2 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で検討した。Mean $\pm$ S.D., n=3. \*\* $P$ <0.01

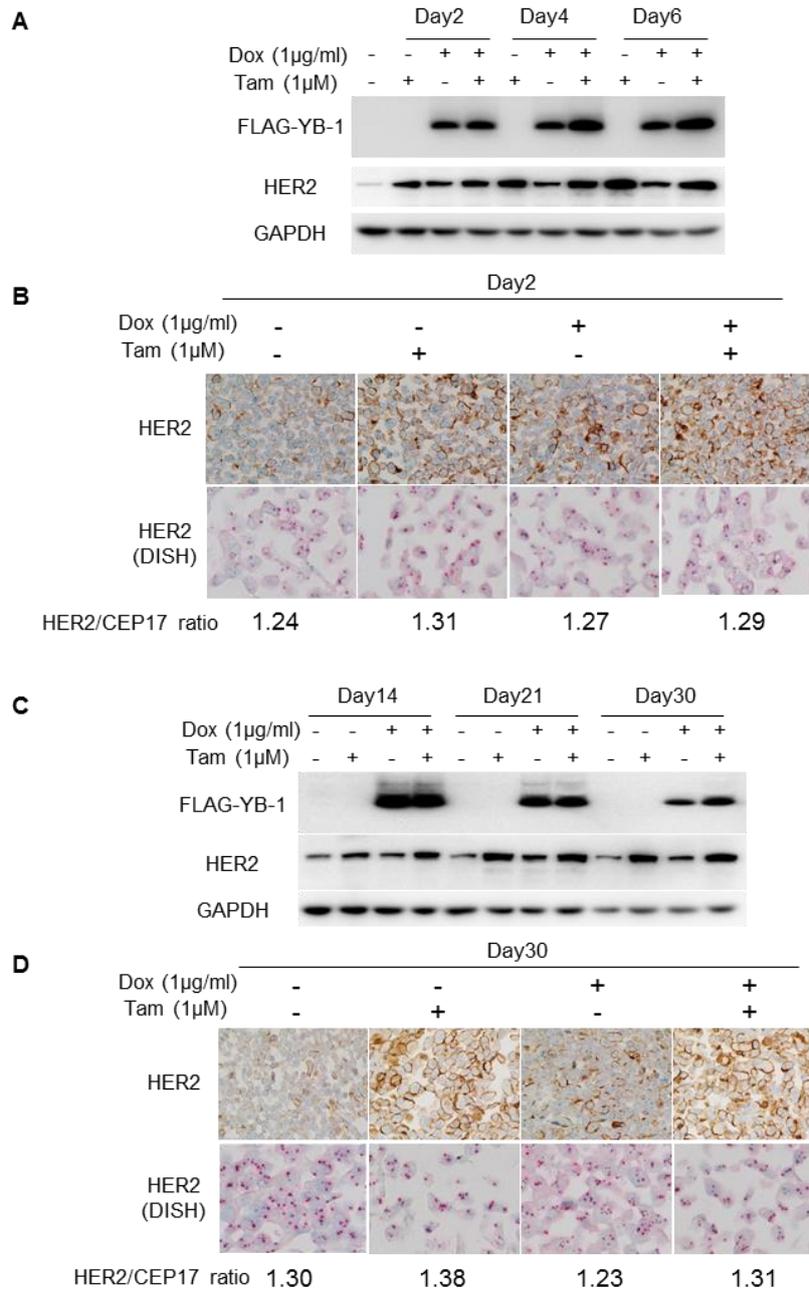
(E) KPL-1、T-47D の YB-1 Tet-On システム安定導入株を用い、Dox (1 $\mu$ g/ml) 又は tamoxifen (1 $\mu$ M) 72 時間処理後の HER2、ER $\alpha$  発現を Western-Blot 法で検討した。

## 核内 YB-1 発現誘導時の HER2 遺伝子増幅に対する効果検討

2011 年に Davies らは、正常乳腺上皮細胞において YB-1 の強制発現により弱い HER2 の遺伝子増幅 (HER2/CEP17 ratio > 1.7) が誘導されることを報告した<sup>(37)</sup>。そこで、我々は T-47D/Tet YB-1 を用い、YB-1 が HER2 の遺伝子増幅に関与するか否か検討した。Dox を短期間 (2-6 日間) 処理し YB-1 発現を誘導すると、HER2 タンパク発現の増加が Western-Blot 法及び免疫組織化学染色 (IHC) 法により観察された (**Fig. 5A**)。一方、HER2 の遺伝子増幅の有無を Dual in situ hybridization (DISH) 法により検討した結果、HER2/CEP17 ratio が全て 1.7 以下であり HER2 の遺伝子増幅は観察されなかった (**Fig. 5B**)。さらに、Dox を長期間 (14-30 日間) 処理し YB-1 発現を長期間誘導した。その結果、HER2 タンパク発現の増加が Western-Blot 法及び IHC 法により観察されたが、短期間処理と同様に HER2 の遺伝子増幅は認められなかった (**Fig. 5C,D**)。

以上の結果より、YB-1 は遺伝子増幅なしで HER2 発現上昇を誘導することを明らかにした。

ここまでの結果から、ER $\alpha$  陽性細胞でのみ ER $\alpha$  は HER2 発現を負に制御し、YB-1 は ER $\alpha$  発現を負に制御し HER2 発現を正に制御していた。



**Figure 5** YB-1 Tet-On システムを駆使した核内 YB-1 誘導時の HER2 遺伝子増幅に対する影響

(A)(B) T-47D/Tet YB-1 を用い、Dox (1 $\mu$ g/ml) 又は tamoxifen (1 $\mu$ M) 2、4、6 日処理後の FLAG-YB-1 と HER2 発現を Western-Blot 法で検討した(A)。Dox 又は tamoxifen 2 日処理後の HER2 発現を免疫組織化学染色 (IHC) 法により、HER2 遺伝子増幅の有無を DISH 法により検討(B)。

(C)(D) T-47D/Tet YB-1 を用い、Dox (1 $\mu$ g/ml) 又は tamoxifen (1 $\mu$ M) 14、21、30 日処理後の FLAG-YB-1 と HER2 発現を Western-Blot 法で検討した(C)。Dox 又は tamoxifen 30 日処理後の HER2 発現を IHC 法により、HER2 遺伝子増幅の有無を DISH 法により検討(D)。

## YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合に対するエストラジールの効果検討

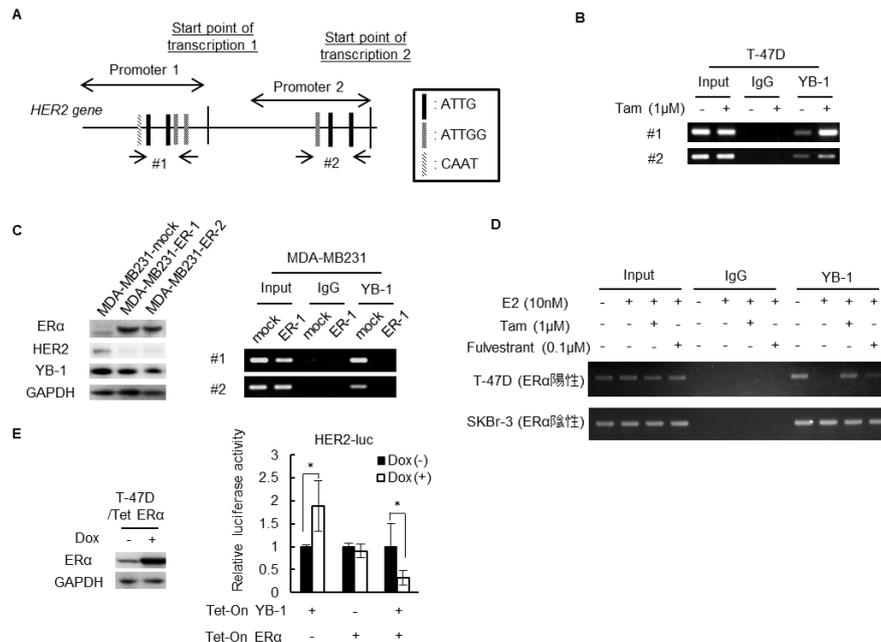
YB-1 発現誘導時の HER2 発現に ER $\alpha$  が関与するか否かを明らかにするため、ChIP アッセイにより YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合の有無と ER $\alpha$  の発現や ER $\alpha$  標的薬の影響を検討した。HER2 のプロモーター領域には YB-1 の結合領域である Y-box が多数存在しており<sup>(27,38,39)</sup>、この Y-box (#1、2) への YB-1 の結合を検討したところ、T-47D 細胞で領域#1 と領域#2 へ YB-1 が結合していることが明らかになった (**Fig. 6A,B**)。さらに、tamoxifen 処理により HER2 プロモーター領域 (#1、#2) への YB-1 の結合がさらに上昇した (**Fig. 6A,B**)。次に、ER $\alpha$  陰性である MDA-MB231 の ER $\alpha$  強制発現株を作成し、YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合を検討したところ、ER $\alpha$  強制発現株で HER2 タンパクの発現減少とともに、HER2 プロモーター領域 (#1、#2) への YB-1 の結合が減少した (**Fig. 6C**)。

さらに、ER $\alpha$  の活性化が YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合に影響するか否か検討した。その結果、ER $\alpha$  陽性細胞である T-47D では E2 処理により YB-1 の HER2 プロモーター領域 (#2) への結合が減少した (**Fig. 6D**)。さらに、tamoxifen 又は fulvestrant 処理により YB-1 の HER2 プロモーター領域 (#2) への結合が回復した (**Fig. 6D**)。一方、ER $\alpha$  陰性細胞である SKBr-3 では、E2 や tamoxifen、fulvestrant を処理した場合でも YB-1 の HER2 プロモーター領域 (#2) への結合に変化は観察されなかった (**Fig. 6D**)。

次に、MDA-MB231 の YB-1 Tet-On システムと ER $\alpha$  Tet-On システムを用い、HER2 プロモーター活性をルシフェラーゼ活性により評価した。YB-1 のみを誘導した場合には、HER2 のプロモーター活性が有意に上昇したが、YB-1 と ER $\alpha$

の両者の発現を誘導すると **HER2** のプロモーター活性は有意に減少した (**Fig. 6E**)。これらの結果は **Fig. 1-3** で観察された現象と一致していた。

以上の結果から、**ER $\alpha$**  は **YB-1** 誘導の **HER2** 発現を転写の段階で負に制御していると考えられる。



**Figure 6** **YB-1** の **HER2** プロモーター領域への結合に対するエストラジオール及び **ER $\alpha$**  標的薬の影響

(A) **HER2** プロモーター領域の Y-box (ATTG、ATTGG、CAAT)。

(B) T-47D を用い、tamoxifen (1 $\mu$ M) 24 時間処理後、抗 YB-1 抗体を用いた ChIP assay により DNA 単離。各領域 (#1、#2) のプライマーを用い PCR により増幅後、アガロースゲル電気泳動により検討。

(C) MDA-M231 の **ER $\alpha$**  強制発現株 (MDA-M231-ER-1、MDA-M231-ER-2) を作成。抗 YB-1 抗体を用いた ChIP assay により DNA 単離。各領域 (#1、#2) のプライマーを用い PCR により増幅後、アガロースゲル電気泳動により検討。

(D) T-47D 及び SKBr-3 を用い、チャコール処理血清含有培地で 24 時間培養後、E2 (10nM) と tamoxifen (1 $\mu$ M)、fulvestrant (0.1 $\mu$ M) を 24 時間処理。抗 YB-1 抗体を用いた ChIP assay により DNA 単離後、#2 領域のプライマーを用い PCR により増幅。アガロースゲル電気泳動により検討。

(E) T-47D を用い、YB-1 Tet-On システムと **ER $\alpha$**  Tet-On システムを導入し、Dox (1 $\mu$ g/ml) 24 時間処理後の **HER2** プロモーター活性をホタルルシフェラーゼ活性により検討。Mean $\pm$ S.D., n=3. \**P*<0.05

## YB-1 と ER $\alpha$ の結合とその結合ドメインの検討

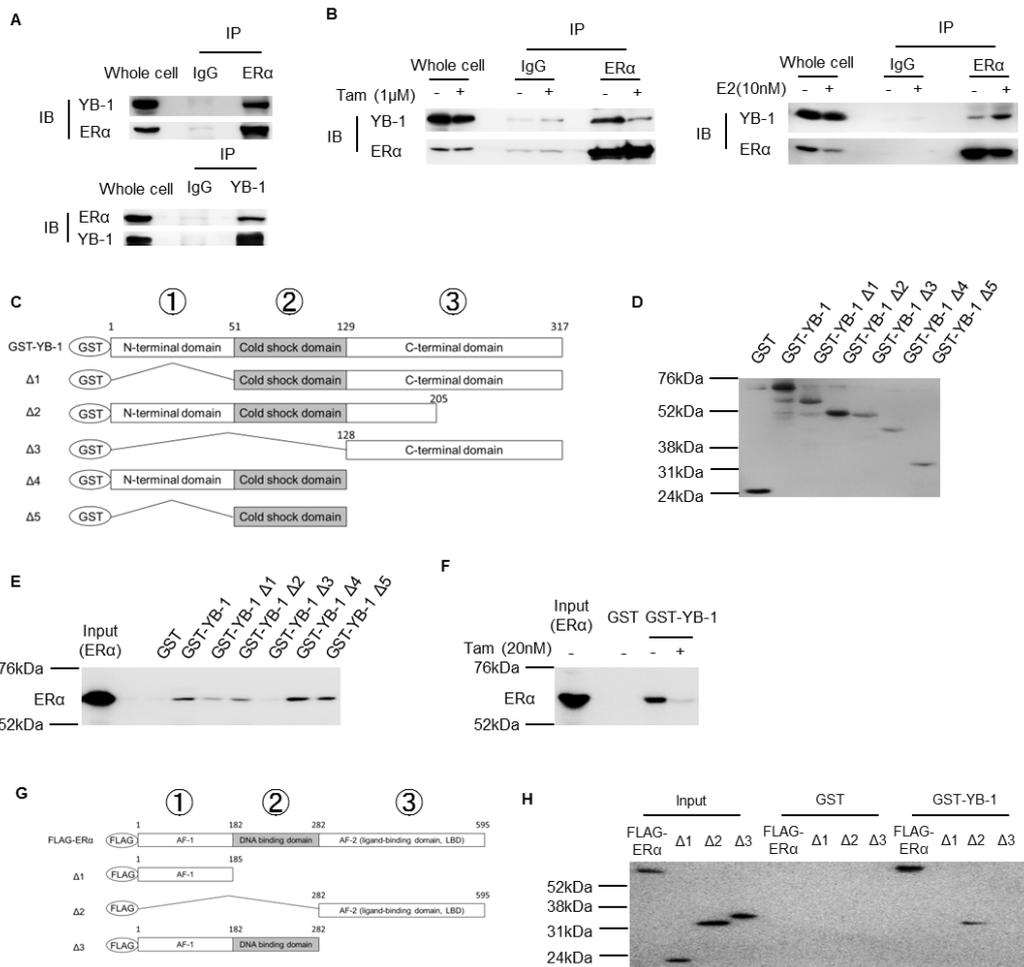
ER $\alpha$  の YB-1 誘導 HER2 発現への詳細な関与メカニズムを検討するため、まず YB-1 と ER $\alpha$  が結合するか否かを共免疫沈降法により検討した。その結果、細胞内で YB-1 と ER $\alpha$  の結合が観察された (**Fig. 7A**)。次に、YB-1 と ER $\alpha$  の結合に tamoxifen または E2 が影響するか否か検討した。その結果、tamoxifen は YB-1 と ER $\alpha$  の結合を阻害し、E2 は YB-1 と ER $\alpha$  の結合を増加させた (**Fig. 7B**)。このことより、YB-1 は活性化型の ER $\alpha$  への結合能が大きいと考えられる。

YB-1 は、① N 末端の mRNA との結合能が高い (A/P repeat) 領域、② DNA 上の Y-box と結合する Cold Shock Domain (CSD)、③ C 末端のタンパクとの結合能の高い (B/A repeat) 領域の 3 領域から構成される<sup>(13,14)</sup>。そこで、次に、YB-1 における ER $\alpha$  との結合部位を同定するため YB-1 の欠失変異体を用い、大腸菌による pull down assay を行った (**Fig. 7C,D**)。その結果、GST-YB-1 タンパクと ER $\alpha$  タンパクは直接結合しており、GST-YB-1  $\Delta$ 3 のみが ER $\alpha$  との結合が観察されなかった (**Fig. 7E**)。このことより、YB-1 は CSD を介し ER $\alpha$  と直接結合していると考えられる。さらに、YB-1 と ER $\alpha$  の直接結合は tamoxifen により抑制された (**Fig. 7F**)。この結果から、tamoxifen は YB-1 と ER $\alpha$  の直接結合を阻害すると考えられる。

ER $\alpha$  は、① N 末端領域 (AF-1) のリン酸化部位が多数存在する領域、② DNA 上の Estrogen Response Element (ERE) と結合する DNA binding domain、③ C 末端領域 (AF-2) の E2 結合領域である Ligand Binding Domain (LBD) の 3 領域から構成される<sup>(40)</sup>。AF-1 のリン酸化及び LBD への E2 の結合が ER $\alpha$  の核内移行や co-factor と ER $\alpha$  の結合の増加を誘導する。そこで、次に、ER $\alpha$  における YB-1 との結合部位を同定するため、ER $\alpha$  の欠失変異体を作成した (**Fig. 7G**)。Pull down

assay により FLAG-ER $\alpha$  と FLAG-ER $\alpha$   $\Delta$ 2 だけが YB-1 と結合していたことから ER $\alpha$  は LBD を介し YB-1 と結合していると考えられる (Fig. 7H)。

以上の結果より、YB-1 と ER $\alpha$  はそれぞれ CSD と LBD を介して直接結合し、ER $\alpha$  は YB-1 と直接結合することで YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合を抑制していると考えられる。



**Figure 7 YB-1 と ERα の結合に対するエストラジオール及び ERα 標的薬の影響**

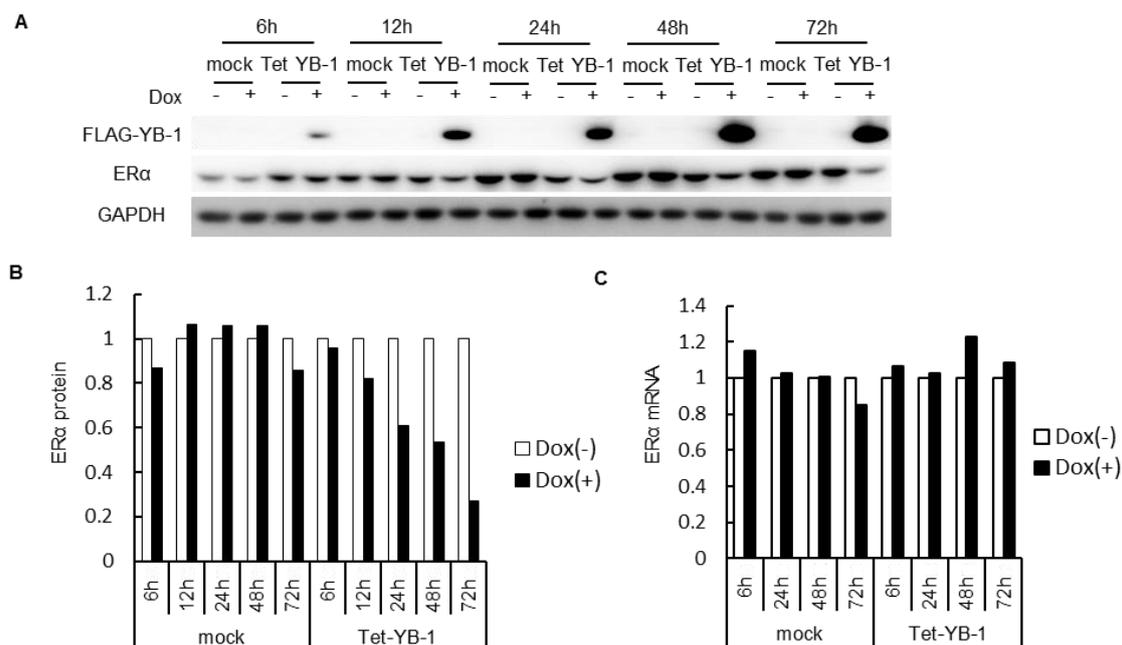
- (A) T-47D を用い、抗 ERα 抗体で免疫沈降後、抗 YB-1 抗体で結合を検出 (上)。T-47D を用い、抗 YB-1 抗体で免疫沈降後、抗 ERα 抗体で結合を検出 (下)。
- (B) T-47D を用い、tamoxifen (1 $\mu$ M、左) 又は E2 (10nM、右) を処理し、抗 ERα 抗体で免疫沈降後、抗 YB-1 抗体で結合を検出。
- (C) YB-1 欠失変異体の模式図。
- (D) YB-1 欠失変異体の誘導を Western-Blot 法で検討。
- (E) GST-pull down assay を行い、GST-YB-1 欠失変異体と ERα の結合を Western-Blot 法で検討。
- (F) GST-pull down assay のグルタチオンビーズによる沈降時に tamoxifen (20nM) を添加し、GST-YB-1 と ERα の結合を Western-Blot 法で検討。
- (G) ERα 欠失変異体の模式図。
- (H) GST-pull down assay を行い、GST-YB-1 と FLAG-ERα 欠失変異体の結合を Western-Blot 法で検討。

## 第2章 乳癌細胞における YB-1 による ER $\alpha$ 発現制御

### YB-1 の ER $\alpha$ タンパク発現と ER $\alpha$ mRNA 発現に対する効果検討

以前当研究室でのヒト臨床検体を用いた検討から、YB-1 発現と ER $\alpha$  発現が負の相関を示すことを報告した<sup>(28)</sup>。本研究においても、YB-1 発現誘導により ER $\alpha$  発現が減少することを観察している (**Fig. 4B**)。そのため、YB-1 が ER $\alpha$  発現を負に制御していることが考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで、YB-1 による ER $\alpha$  発現抑制メカニズムについて検討した。

T-47D/Tet YB-1 を用い Dox 処理による YB-1 誘導後の ER $\alpha$  発現について検討した結果、YB-1 誘導後時間依存的に ER $\alpha$  タンパク発現が低下した (**Fig. 8A,B**)。一方、ER $\alpha$  mRNA 発現を検討した結果、Dox 処理後 72 時間までの ER $\alpha$  mRNA 発現量に変化は観察されなかった (**Fig. 8C**)。そのため、YB-1 による ER $\alpha$  発現制御は翻訳後の制御であると考えられる。



**Figure 8** YB-1 誘導時の ER $\alpha$  タンパク発現と ER $\alpha$  mRNA 発現に対する影響

(A) T-47D/mock と T-47D/Tet YB-1 における、Dox (1 $\mu$ g/ml) 処理後の FLAG-YB-1 と ER $\alpha$  発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) (A)での Western-Blot 法の結果を定量。ローディングコントロールの GAPDH で補正し、Dox 未処理群を 100%とし補正。

(C) T-47D/mock と T-47D/Tet YB-1 における、Dox (1 $\mu$ g/ml) 処理後の ER $\alpha$  mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で検討した。

## YB-1 誘導時の ER $\alpha$ タンパクの安定性の検討

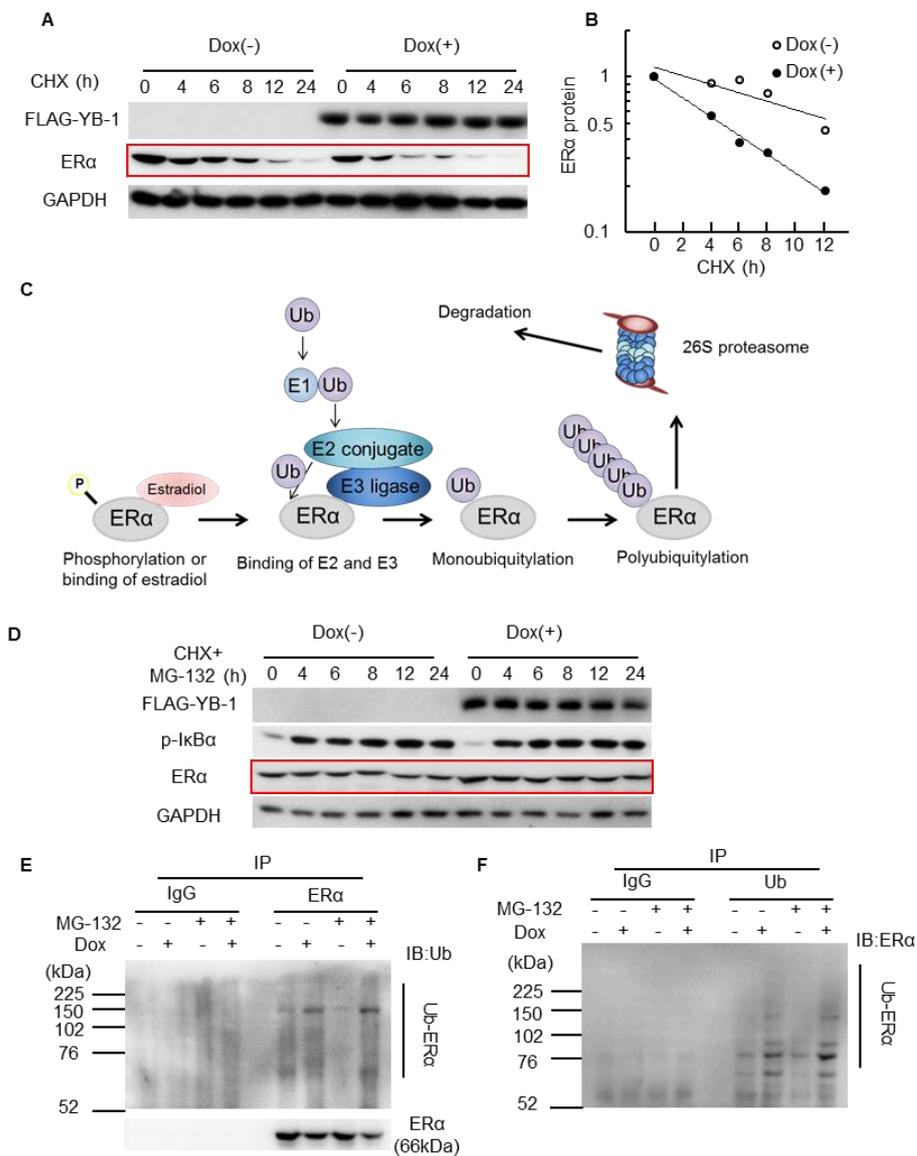
YB-1 による ER $\alpha$  の詳細な翻訳後制御メカニズムを検討するため、タンパク合成抑制剤である Cycloheximide (CHX) 処理後の ER $\alpha$  タンパクの安定性を検討した。Dox 未処理時の ER $\alpha$  タンパクの半減期は約 8–10 時間であったが、Dox 処理による YB-1 誘導時は ER $\alpha$  タンパクの半減期が約 5 時間となり、YB-1 発現誘導により ER $\alpha$  の分解速度が亢進していた (Fig. 9A,B)。

ER $\alpha$  は主にユビキチン (Ubiquitin, Ub) - プロテアソーム系を介した経路により分解されることが報告されている (Fig. 9C) <sup>(40)</sup>。そこで次に、プロテアソーム阻害剤 (MG-132) 処理時の ER $\alpha$  タンパクの発現を検討した。

MG-132 と CHX を処理すると、Dox 未処理時に ER $\alpha$  発現にほとんど変化は観察されなかった (Fig. 9D)。これは、既存の報告と一致し ER $\alpha$  がプロテアソームで分解されていることを示している。一方、Dox 処理による YB-1 誘導時においても同様に MG-132 と CHX 処理により ER $\alpha$  発現に変化は観察されなかった (Fig. 9D)。I $\kappa$ B $\alpha$  はリン酸化されることでプロテアソームにより分解されることが知られており、p-I $\kappa$ B $\alpha$  をプロテアソーム阻害剤の効果の指標とした。

以上の結果より、YB-1 は ER $\alpha$  のプロテアソームでの分解を促進していると考えられる。

ER $\alpha$  は、E3 ligase が結合し E2 conjugate によりユビキチン化を受けることでプロテアソームでの分解が誘導される (Fig. 9C) <sup>(40)</sup>。そのため、YB-1 誘導時の ER $\alpha$  のユビキチン化を共免疫沈降法により検討した。その結果、YB-1 発現誘導により、ER $\alpha$  のユビキチン化が亢進していることが観察された (Fig. 9E,F)。これらの結果から、YB-1 は ER $\alpha$  のユビキチン化を誘導することでプロテアソームでの分解を促進し、ER $\alpha$  発現を負に制御していると考えられる。



**Figure 9 YB-1 誘導時の ERα の安定性と ERα のユビキチン化に対する影響**

(A) T-47D/Tet YB-1 に対し、Dox (1μg/ml) 12 時間処理後、CHX (10μg/ml) 処理後の FLAG-YB-1 と ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) (A)での Western-Blot 法の結果を定量。ローディングコントロールの GAPDH で補正し、CHX 未処理時を 1 とし補正。

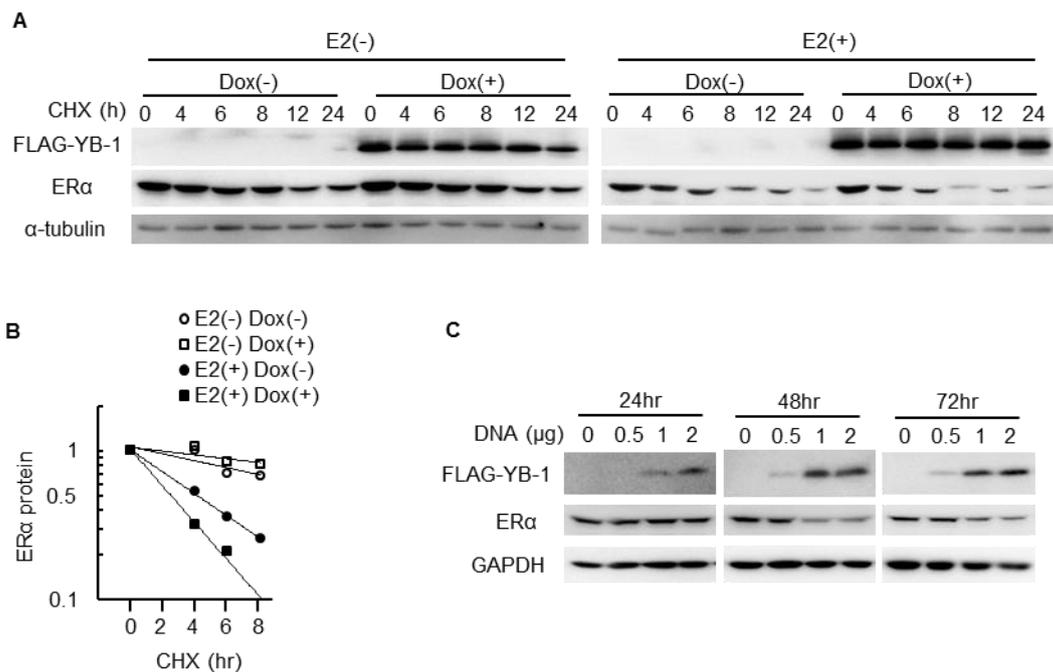
(C) ERα のユビキチン - プロテアソーム系での分解過程モデル。

(D) T-47D/Tet YB-1 に対し、Dox (1μg/ml) 12 時間処理し、CHX (10μg/ml) と MG-132 (10μM) 処理後の FLAG-YB-1 と p-IκBα、ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

(E)(F) T-47D/Tet YB-1 に対し、Dox (1μg/ml) 12 時間処理後、MG-132 (10μM) 8 時間処理。抗 ERα 抗体で免疫沈降し、抗ユビキチン (Ub) 抗体で検出 (E)。抗 Ub 抗体で免疫沈降し、抗 ERα 抗体で検出 (F) (Western-Blot 法)。

## YB-1 と ER $\alpha$ の結合が ER $\alpha$ 安定性に与える影響を検討

ER $\alpha$  は、N 末端領域のリン酸化又は C 末端領域への E2 の結合により、E2 ユビキチン conjugate によるモノユビキチン化が亢進し、ER $\alpha$  の分解が誘導されることが報告されている (Fig. 9C)<sup>(40)</sup>。また、YB-1 は E2 により活性化された ER $\alpha$  への結合が増加する (Fig. 7B) ことから、E2 誘導の ER $\alpha$  分解への YB-1 の関与を検討した。E2 非存在下での ER $\alpha$  タンパクの半減期は約 12 時間であり、E2 存在下での ER $\alpha$  タンパクの半減期は約 4 時間と E2 により分解が亢進した (Fig. 10A,B)。また、E2 存在時に YB-1 発現を誘導すると ER $\alpha$  の分解速度がさらに亢進した (Fig. 10A,B)。さらに、YB-1 発現が ER $\alpha$  の分解に直接関与するか否か検討した。その結果、FLAG-YB-1 を一過性に導入後 48 時間、72 時間において FLAG-YB-1 の濃度依存的に ER $\alpha$  発現が減少した (Fig. 10C)。



**Figure 10 YB-1 と ERα の結合が ERα 安定性に与える影響**

(A) T-47D/Tet YB-1 におけるチャコール処理血清非含有（左）又は含有（右）培地で 24 時間培養後、E2 (10nM) 24 時間処理。その後、Dox (1μg/ml) を 12 時間処理し、CHX (10μg/ml) 処理後の FLAG-YB-1 と ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) (A)での Western-Blot 法の結果を定量。ローディングコントロールの α-tubulin で補正し、CHX 未処理時を 1 とし補正。

(C) T-47D に対し、FLAG-YB-1 (0.5、1、2μg/ml) 導入後、24、48、72 時間での FLAG-YB-1 と ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

## YB-1 と ER $\alpha$ の直接結合が ER $\alpha$ のプロテアソームでの分解に与える影響を検討

次に、YB-1 と ER $\alpha$  の結合が ER $\alpha$  の分解に関与するか否かを検討するため、ER $\alpha$  と結合しない CSD を欠損した FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 を導入時の ER $\alpha$  の発現について検討を行った。その結果、FLAG-YB-1 導入により ER $\alpha$  発現の減少が観察されたが、FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 導入時には ER $\alpha$  発現に変化は観察されなかった (**Fig. 11A**)。

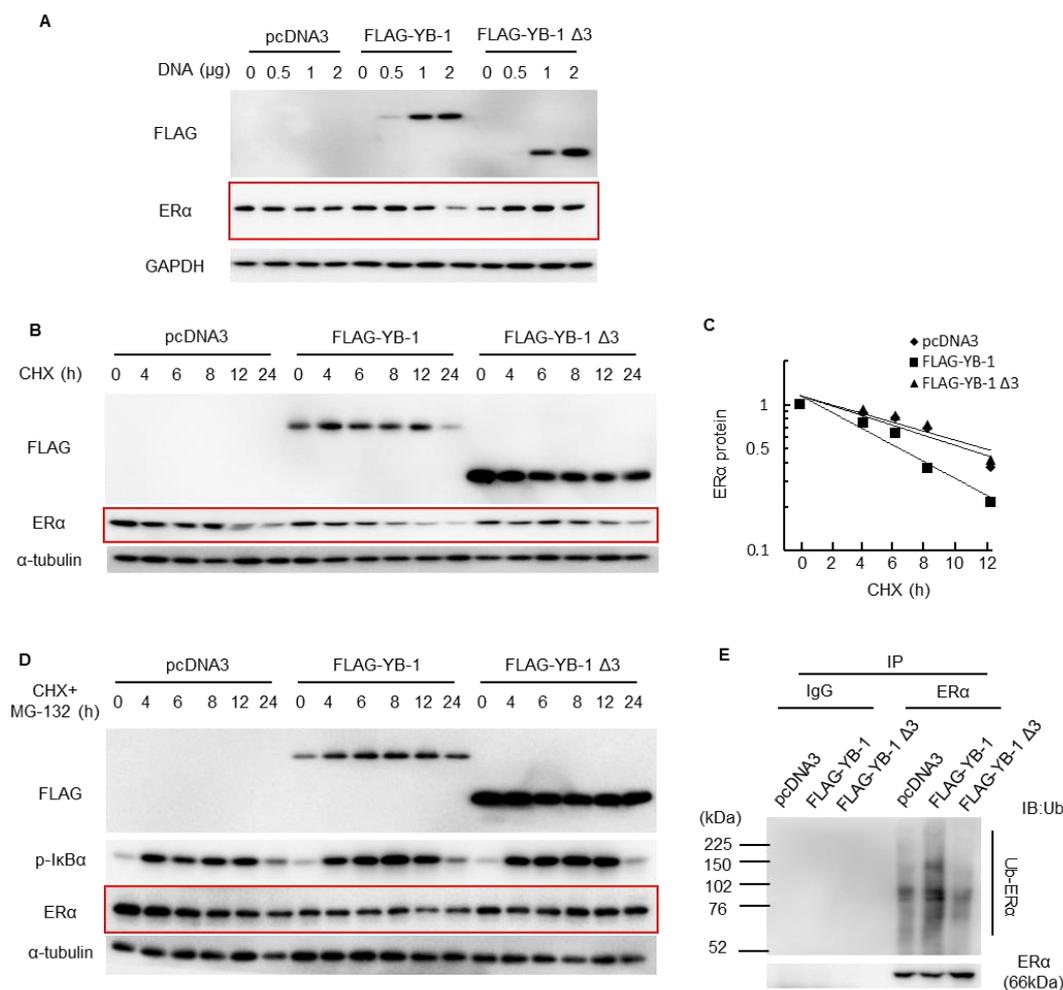
この結果から、YB-1 の ER $\alpha$  への直接結合は ER $\alpha$  発現抑制に重要であることが示された。

次に、YB-1 と ER $\alpha$  の結合が ER $\alpha$  のユビキチン化に関与するか否かを検討するため CHX 処理後の ER $\alpha$  の発現を検討した。

pcDNA3 導入時は ER $\alpha$  の半減期は約 10 時間であったが、FLAG-YB-1 導入時には ER $\alpha$  の半減期が約 7-8 時間となり YB-1 により分解が促進されていることが観察された (**Fig. 11B,C**)。しかし、FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 導入時には ER $\alpha$  の半減期は約 10 時間であり pcDNA3 導入時とほぼ同程度であった (**Fig. 11B,C**)。

さらに、MG-132 処理により FLAG-YB-1 により ER $\alpha$  がプロテアソームで分解されるか否かを検討した。FLAG-YB-1 導入時においても pcDNA3 及び FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 導入時とほぼ同等に ER $\alpha$  の分解は誘導されなかった (**Fig. 11D**)。

YB-1 は ER $\alpha$  のユビキチン化を促進することから、YB-1 と ER $\alpha$  の結合が ER $\alpha$  のユビキチン化に関与するか否かを検討した。FLAG-YB-1 導入により ER $\alpha$  のユビキチン化が増加していることが観察されたが、FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 導入時には ER $\alpha$  のユビキチン化の亢進は観察されなかった (**Fig. 11E**)。



**Figure 11 YB-1 と ERα の結合が ERα のユビキチン化に与える影響**

(A) T-47D に対し、FLAG-YB-1 又は FLAG-YB-1 Δ3 (0.5、1、2μg/ml) 導入後 72 時間での FLAG-YB-1 と ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) T-47D に対し、FLAG-YB-1 又は FLAG-YB-1 Δ3 (2μg/ml) 導入後 24 時間で、CHX (10μg/ml) 処理し、その後の FLAG-YB-1 と ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

(C) (A)での Western-Blot 法の結果を定量。ローディングコントロールの α-tubulin で補正し、CHX 未処理時を 1 とし補正。

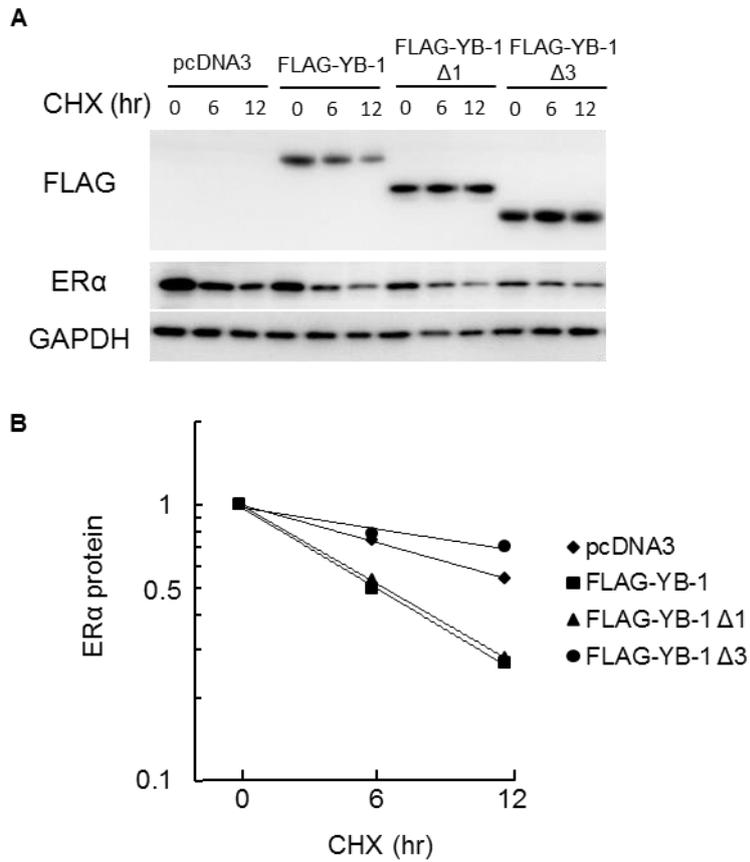
(D) T-47D に対し、FLAG-YB-1 又は FLAG-YB-1 Δ3 (2μg/ml) 導入後 24 時間で、CHX (10μg/ml) と MG-132 (10μM) 処理し、その後の FLAG-YB-1 と ERα 発現を Western-Blot 法で検討した。

(E) T-47D/Tet YB-1 に対し、FLAG-YB-1 又は FLAG-YB-1 Δ3 (2μg/ml) を導入し 24 時間後、MG-132 (10μM) 8 時間処理。抗 ERα 抗体で免疫沈降し、抗 Ub 抗体で検出 (Western-Blot 法)。

YB-1 と ER $\alpha$  の結合が ER $\alpha$  の安定性に重要であるか否かを、ER $\alpha$  との結合能を有する FLAG-YB-1  $\Delta$ 1 と ER $\alpha$  との結合能を有さない FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 の欠失変異体を用いさらに検討を行った。

FLAG-YB-1 導入により ER $\alpha$  の分解が促進しその半減期は約 6 時間であった (**Fig. 12A,B**)。また、ER $\alpha$  との結合能を持つ FLAG-YB-1  $\Delta$ 1 導入時も、FLAG-YB-1 導入時と同程度の半減期を示したが、ER $\alpha$  との結合能を持たない FLAG-YB-1  $\Delta$ 3 導入時には pcDNA3 導入時と同程度の半減期を示し、ER $\alpha$  の分解は促進されなかった (**Fig. 12A,B**)。

以上の結果から、YB-1 は ER $\alpha$  と結合することで ER $\alpha$  のユビキチン化を誘導し、プロテアソームでの分解を促進していると考えられる。



**Figure 12 YB-1 と ER $\alpha$  の結合が ER $\alpha$  の安定性に与える影響**

(A) T-47D に対し、FLAG-YB-1、FLAG-YB-1  $\Delta 1$ 、FLAG-YB-1  $\Delta 3$  (2 $\mu$ g/ml) 導入後 24 時間で、CHX (10 $\mu$ g/ml) 処理し、その後の FLAG-YB-1 と ER $\alpha$  発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) (A)での Western-Blot 法の結果を定量。ローディングコントロールの GAPDH で補正し、CHX 未処理時を 1 とし補正。

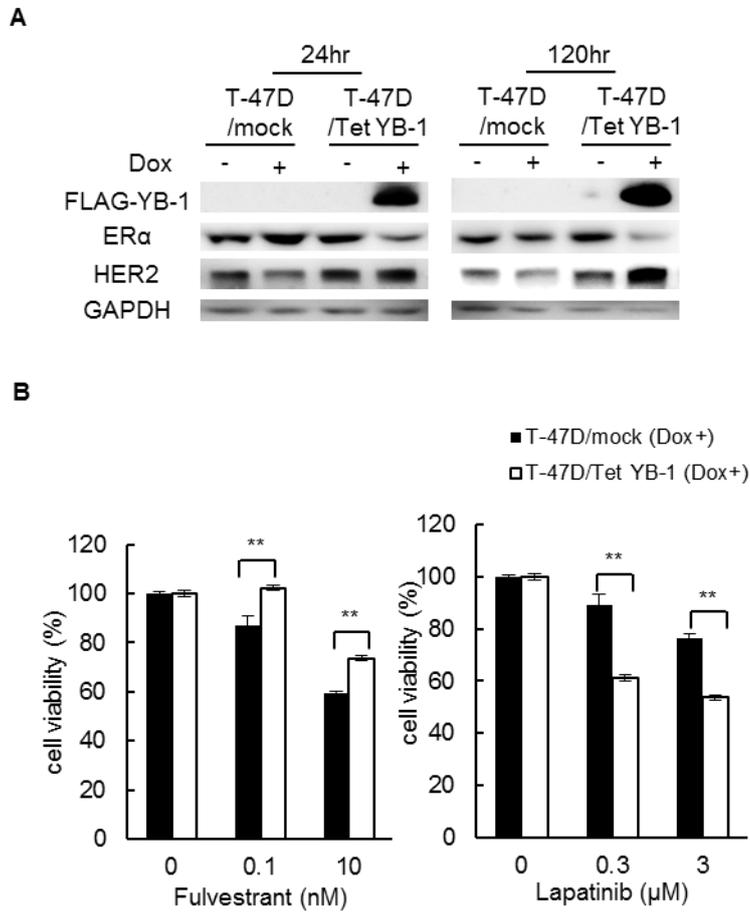
### 第3章 乳癌における YB-1 発現と治療薬感受性

2000 年代前半から現在までにかけて分子標的薬によるがん治療が発展してきた。しかし、分子標的薬による治療にはがん細胞の増殖が依存する標的分子の同定とその発現制御メカニズムの解明が必要不可欠である。そのため、現在、乳癌患者に対し、ER $\alpha$  標的薬や HER2 標的薬を使用する上で、針生検や切除検体を用い、ER $\alpha$  発現や HER2 発現の有無により治療方針が決定されている<sup>(36)</sup>。しかし、外科切除前後又は薬物治療前後で ER $\alpha$  や HER2 の発現が変化し治療抵抗性となることが報告されている<sup>(41,42)</sup>。第1章と第2章より YB-1 は ER $\alpha$  や HER2 発現をそれぞれ負と正に制御することを明らかにした。そこで、乳癌の標的分子の発現を制御する YB-1 発現の薬物治療感受性への関与を明らかにし、YB-1 が分子標的薬の選択やがん細胞の特性を判断する上で有用なバイオマーカーとなるか否か検討することが重要であると考え、YB-1 が乳癌治療薬の感受性に関与するか否か検討を行った。

#### YB-1 発現誘導時の fulvestrant と lapatinib 感受性の検討

T-47D/mock 及び T-47D/Tet YB-1 を用い、Dox 処理後 24 時間、120 時間後の ER $\alpha$  と HER2 発現を検討した。これまでの結果と同様に Dox 処理後 24 時間、120 時間後のいずれの場合も T-47D/Tet YB-1 において ER $\alpha$  発現の低下と HER2 発現の上昇が観察された (**Fig. 13A**)。この条件下で、fulvestrant と lapatinib の感受性について検討したところ、YB-1 発現誘導により lapatinib に対し高感受性を示し、fulvestrant に対し耐性となった (**Fig. 13B**)。

この結果より、YB-1 は乳癌の治療標的である ER $\alpha$  と HER2 の発現を制御することで、乳癌治療薬の感受性を変化させたと考えられる。



**Figure 13** 乳癌細胞株における、YB-1 発現誘導の fulvestrant と lapatinib 感受性に与える影響

(A) T-47D/mock 及び T-47D/Tet YB-1 に対する、Dox (1 $\mu$ g/ml) 24 時間又は 120 時間処理後の FLAG-YB-1 と ER $\alpha$ 、HER2 発現を Western-Blot 法で検討した。

(B) T-47D/mock 及び T-47D/Tet YB-1 を用い、Dox (1 $\mu$ g/ml) 24 時間し、その後 fulvestrant 又は lapatinib を 96 時間処理後の細胞数を Coulter Counter により計測。

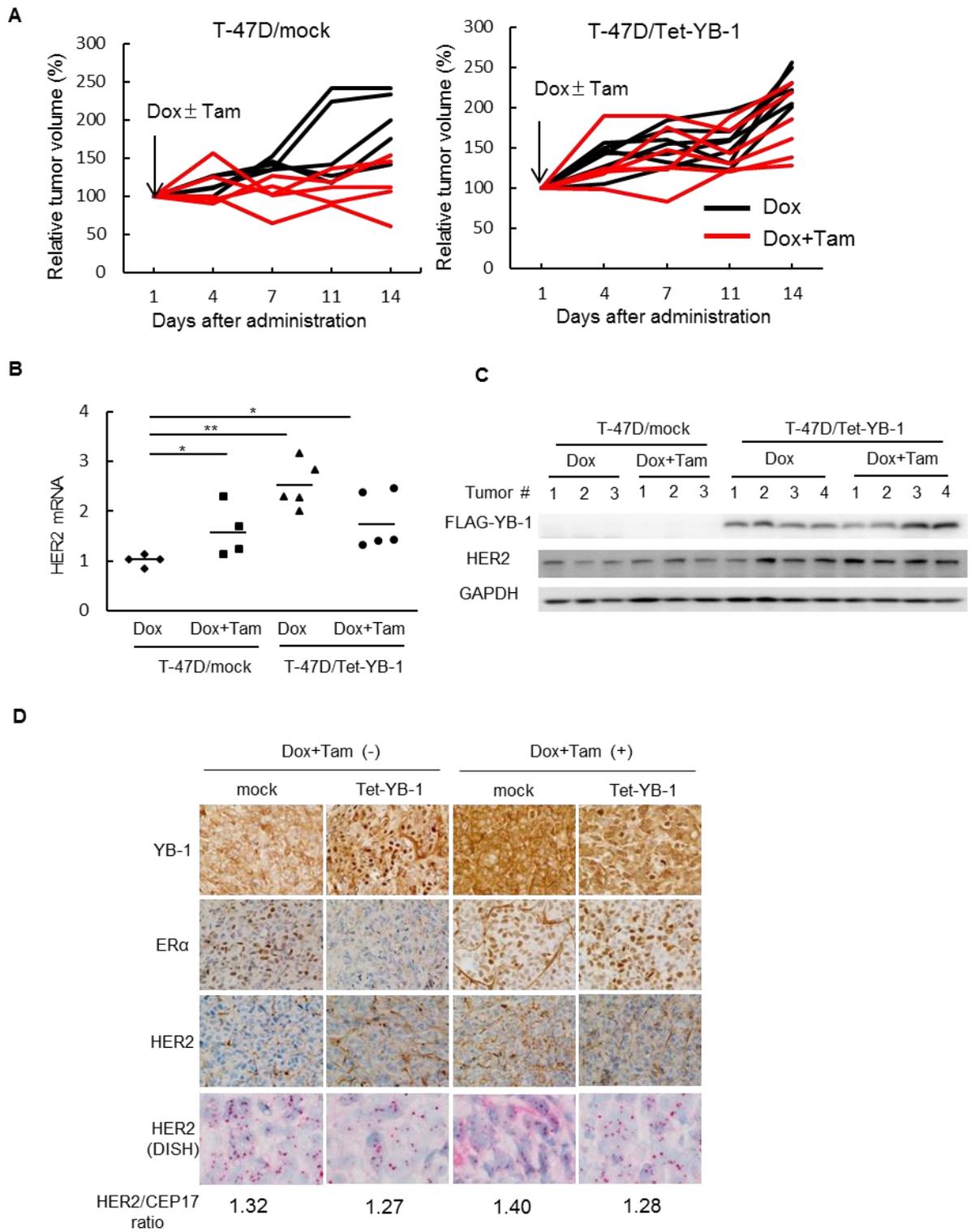
Mean $\pm$ S.D., n=3. \*\* $P$ <0.01

次に、マウス皮下移植モデルにおいて YB-1 誘導時の tamoxifen 感受性について検討を行った。すべてマウスに対し Dox を投与し、T-47D/mock を比較対照とし用いた。T-47D/mock (mock) 及び T-47D/Tet YB-1 (Tet-YB-1) を用い皮下移植を行った。その結果、mock 腫瘍では tamoxifen 投薬により腫瘍体積が抑制された (Fig. 14A)。一方、Tet YB-1 腫瘍では tamoxifen 投薬による腫瘍体積の減少はほとんど観察されなかった (Fig. 14A)。

次に、腫瘍内での HER2 発現を比較したところ、HER2 mRNA 発現は、mock 腫瘍と比較して、mock 腫瘍 tamoxifen 投薬群及び Tet YB-1 腫瘍で有意に上昇していた (Fig. 14B)。さらに、腫瘍内の HER2 タンパク発現量を Western-Blot 法で検討したところ、HER2 mRNA 発現と同様に mock 腫瘍と比較して mock 腫瘍 tamoxifen 投薬群及び Tet YB-1 腫瘍で HER2 タンパク発現が上昇していることが観察された (Fig. 14C)。

腫瘍内の ER $\alpha$  及び HER2 発現を IHC 法により検討を行った。その結果、mock 腫瘍と比較し Tet YB-1 腫瘍で ER $\alpha$  発現が低下し HER2 発現が増加していた (Fig. 14D)。さらに、mock 腫瘍と比較し mock 腫瘍 tamoxifen 投薬群において HER2 発現が増加した (Fig. 14D)。また、HER2 遺伝子増幅に関しても検討したが、皮下移植モデルにおいても YB-1 発現や tamoxifen 投薬は HER2 の遺伝子増幅に影響を与えなかった。

以上の結果から、マウス皮下移植モデルにおいて YB-1 発現の誘導により ER $\alpha$  発現が低下し、HER2 発現が上昇することで tamoxifen に対し抵抗性を示したと考えられる。



**Figure 14 乳癌皮下移植モデルにおける、YB-1 発現誘導の tamoxifen 感受性に与える影響**

(A) T-47D/mock 及び T-47D/Tet YB-1 ( $5.0 \times 10^6$  cells/mouse) 皮下移植後、腫瘍体積が  $100\text{-}150\text{mm}^3$  に達したマウスに対し、Dox (1mg/mouse、1日1回経口投与) と tamoxifen ( $500\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、1日1回皮下投与) の投薬を行った。投薬開始後14日で腫瘍を回収。腫瘍体積は投薬開始時を100%として補正。

(B) (A)の腫瘍内の *HER2* mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法により検討。Mean $\pm$ S.D., n=4 (T-47D/mock) , n=5 (T-47D/Tet YB-1)

(C) (A)の腫瘍内の *HER2* タンパク発現量を Western-Blot 法で検討。

(D) (A)の腫瘍内の YB-1、ER $\alpha$ 、*HER2* 発現量を IHC 法により検討。*HER2* 遺伝子増幅の有無を DISH 法により検討。*HER2/CEP17* は平均値を示した (n=5)。

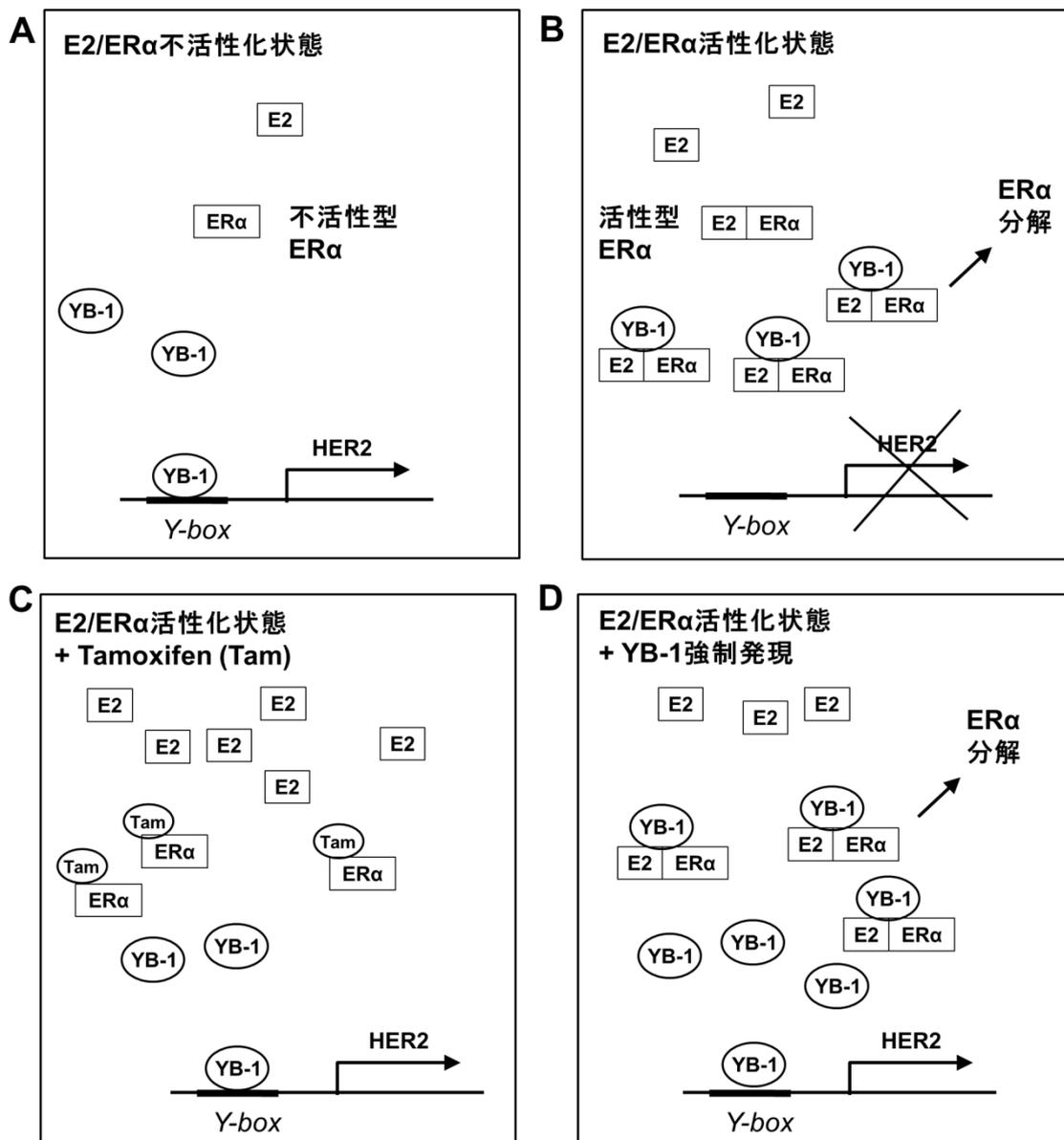
## [結果と考察]

第1部では乳癌細胞を用いYB-1によるER $\alpha$ 及びHER2制御メカニズムとYB-1発現がER $\alpha$ 標的薬とHER2標的薬の治療感受性に関与するか否かについて検討を行った。

その結果以下のような知見を得た。

- ① ER $\alpha$ がLBDを介してYB-1のCSDに結合することでYB-1のHER2プロモーター上のY-boxへの結合が減少し、YB-1誘導のHER2の転写が抑制される (**Fig. 15A,B**)。
- ② TamoxifenやfulvestrantなどのER $\alpha$ 標的薬はYB-1とER $\alpha$ の結合を阻害し、遊離したYB-1がHER2の転写を促進する (**Fig. 15C**)。
- ③ YB-1の高発現により、YB-1誘導のHER2転写が促進する。と同時に、YB-1はER $\alpha$ との結合を介しER $\alpha$ のユビキチン化を亢進することで、プロテアソームでの分解を誘導する (**Fig. 15D**)。
- ④ YB-1の高発現により、*in vitro*及び*in vivo*のいずれの条件下においてもER $\alpha$ 標的薬に対し耐性を示した (**Fig. 13,14**)。
- ⑤ 久留米大学病院病理部(河原明彦博士、鹿毛政義教授)との共同研究により、閉経前の乳癌患者では核内YB-1発現とHER2発現、ER $\alpha$ 発現の間に関連はなかったが、閉経後の乳癌患者では核内YB-1発現とHER2発現に有意な正の相関が、ER $\alpha$ 発現と有意な負の相関があることが明らかになった(未発表データ)。

以上の結果から、YB-1が乳癌の治療標的分子であるER $\alpha$ 発現を負にHER2発現を正に制御し、乳癌治療薬感受性の有用なバイオマーカーとなり得ることを示した。



**Figure 15** 本研究から考えられる YB-1 による HER2 と ERα 発現制御機序

(A) E2/ERα の発現が低い状況下では、YB-1 は HER2 のプロモーターに結合することで、HER2 の転写を誘導する。

(B) E2/ERα の発現が高い状況下では、ERα が YB-1 の CSD に結合することで YB-1 の HER2 プロモーター上の Y-box に結合することが抑制される。

(C) Tamoxifen や fulvestrant などの ERα 標的薬は YB-1 と ERα の結合を阻害するため、遊離した YB-1 が HER2 の転写を促進する。

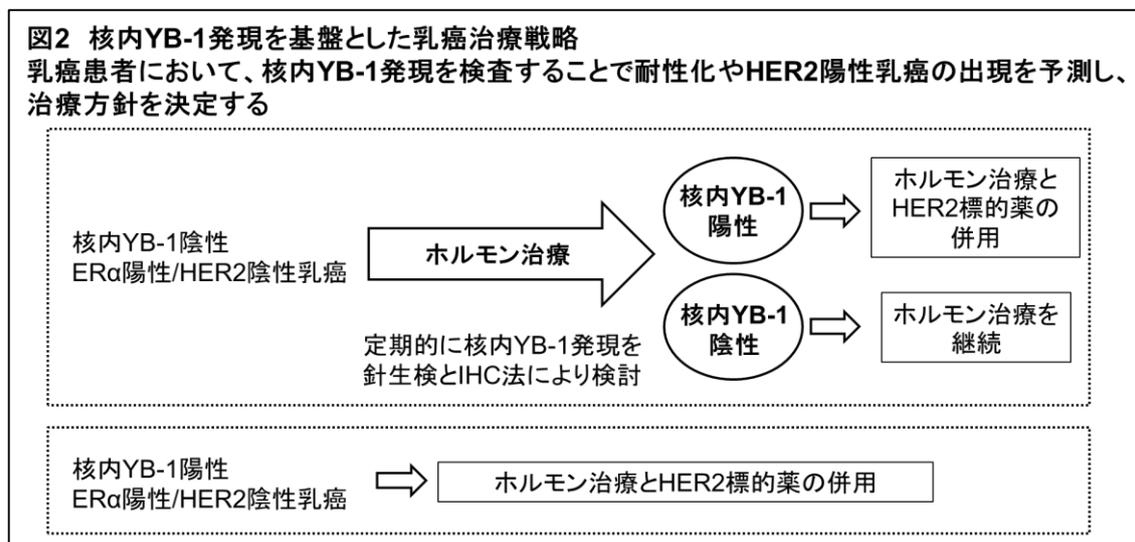
(D) YB-1 を強制発現すると、YB-1 は ERα との結合を介し ERα の分解を誘導するとともに HER2 発現を誘導する。

本研究において、YB-1 は HER2 発現を転写レベルで制御し、HER2 の遺伝子増幅には影響しないことが明らかになった。乳癌患者の約 20%に HER2 の遺伝子増幅又は過剰発現が見られ、HER2 標的薬は HER2 遺伝子増幅陽性や HER2 IHC (3+) 又は (2+) の患者に使用される。HER2 IHC (3+) の患者は約 90%に HER2 遺伝子増幅があり、約 10%に遺伝子増幅を伴わない HER2 過剰発現が認められる。一方、HER2 IHC (2+) の患者では約 20%に遺伝子増幅があり、約 80%に遺伝子増幅を伴わない HER2 過剰発現が認められる<sup>(43,44)</sup>。そのため、本研究により明らかになった YB-1 による HER2 転写促進は、10%の HER2 IHC (3+) や 80%の HER2 IHC (2+) の HER2 遺伝子増幅がない患者群の HER2 過剰発現に寄与していることが考えられる。それゆえ、HER2 遺伝子増幅を伴わない HER2 陽性乳癌の出現予測や HER2 標的薬の感受性の指標として YB-1 発現を検討することが有用であると考えられる。

さらに、近年、ER $\alpha$  陽性乳癌患者に対する術後の tamoxifen による補助療法は 5 年間で中止した場合と比較し、10 年間継続した場合で再発率及び死亡率が抑制されることが報告された<sup>(45,46)</sup>。しかし、最近、術後に tamoxifen を含めたホルモン療法を行った患者群の中で、約 10-30%で ER 陽性/HER2 陰性であった患者が ER 陰性/HER2 陽性の乳癌に性質が変化することが報告された<sup>(41,42)</sup>。このような患者群ではホルモン治療により YB-1 と ER $\alpha$  の結合が阻害され、遊離した YB-1 による HER2 発現誘導が起きている可能性が考えられる (Fig. 15C)。

ホルモン治療を継続的に行う場合には、定期的な針生検などによる YB-1 の核内発現の検査が乳癌のサブタイプの変化や乳癌治療薬の感受性を予測するバイオマーカーとして用いられることを期待している (図 2)。そのため今後、臨床検体を用いた検討によりホルモン治療経過による核内 YB-1 と ER $\alpha$  及び HER2 発現の追跡調査を行いたい。さらに、転移巣や再発巣での核内 YB-1 発現と ER $\alpha$

発現、HER2 発現を検討し、核内 YB-1 発現が転移や再発と関連するか否か検討する。その結果、YB-1 を臨床での診断マーカーとして応用を目指す。



ER $\alpha$  陰性細胞においてなぜ YB-1 により HER2 発現が誘導されないかについては依然明らかになっていないため、さらなる検討が必要である。ER $\alpha$  陰性細胞において YB-1 により HER2 発現が誘導されない要因として、ER $\alpha$  陰性細胞では YB-1 以外の転写因子により HER2 発現が制御されている可能性が考えられる。HER2 の転写因子として、AP-2 や ETS が報告されている<sup>(47,48)</sup>。そのため、YB-1 でなく AP-2 や ETS などの転写因子が ER $\alpha$  陰性細胞において HER2 の転写に優位に働いている可能性がある。

ユビキチン - プロテアソーム系での分解機構では、標的タンパクに E3 ligase が結合し、E3 ligase に E2 conjugate が結合することで E2 conjugate により標的タンパクがユビキチン化され、プロテアソームでの分解が誘導される (Fig. 12C)<sup>(40)</sup>。ER $\alpha$  の E2 conjugate として UBCH7 が、また、ER $\alpha$  の E3 ligase として MDM2、SCF<sup>SKP2</sup>、E6AP、EFP、BRCA1、CRL3<sup>SPOP</sup>、CRL4B、CRL5 の 8 種類が ER $\alpha$  のユビキチン - プロテアソーム系での分解に関わることが報告されている<sup>(40)</sup>。

本研究では、YB-1 が ER $\alpha$  を分解するメカニズムとして、YB-1 が ER $\alpha$  と直接結合し ER $\alpha$  のユビキチン化を促進することで、プロテアソームで分解されることを明らかにした。そのため、YB-1 が ER $\alpha$  の E2 conjugate 又は E3 ligase として働くことで ER $\alpha$  のユビキチン化を促進している可能性が考えられる。

YB-1 は、現在までに p73 や p53、PCNA など数多くのタンパクと結合することが報告されており<sup>(15,16)</sup>、YB-1 が ER $\alpha$  の E3 ligase として働き、E2 conjugate と結合しユビキチン化を誘導することも考えられる。しかし、YB-1 が既報の E2 conjugate 又は E3 ligase の ER $\alpha$  への結合を促進させるか、または、YB-1 自身が E2 conjugate 又は E3 ligase として働いているかの詳細は不明でありさらなる検討が必要である。

乳癌患者において、閉経後でのみ YB-1 と HER2、ER $\alpha$  に関連が見られることから、閉経後では E2/ER $\alpha$  の活性が低く YB-1 が優位に働いていることが示唆される。今回の基礎研究、臨床検体を用いた検討から明らかになった YB-1 による HER2 及び ER $\alpha$  発現制御メカニズムを基盤とし、核内 YB-1 発現を HER2 標的薬及びホルモン治療薬の効果を予測するバイオマーカーとして臨床応用を目指す。

## 第2部 胃癌細胞での HER2 標的薬感受性に対する

### YB-1 の関与メカニズム<sup>(39)</sup>

近年 HER2 陽性胃癌患者に対する Trastuzumab の有効性が報告され、臨床応用されている。そのため、HER2 の発現制御メカニズムの解明と治療感受性を規定する因子を同定することは胃癌の治療戦略の発展につながると考えた。そこで、第2部では胃癌における YB-1 の HER2 発現への関与や HER2 標的薬の感受性との関連について検討を行った。

#### 第1章 胃癌細胞における YB-1 による HER2 発現制御と機序

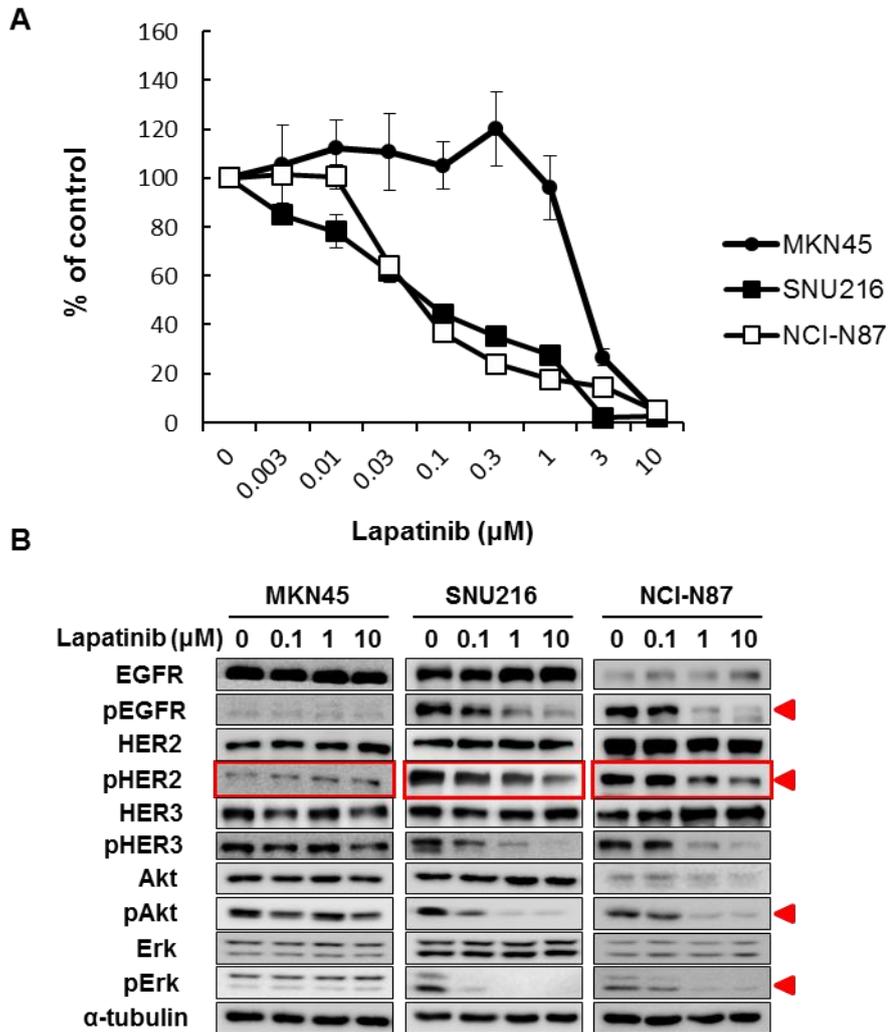
##### ヒト胃癌細胞株における増殖因子受容体の発現と HER2 標的薬の感受性の検討

HER2 陽性胃癌細胞株において EGFR/HER2 チロシンキナーゼ阻害剤である lapatinib の感受性について検討した。細胞株は HER2 遺伝子増幅を有する SNU216、NCI-N87 を用いた。また、Met の遺伝子増幅を有する MKN45 を用いた。SNU216 と NCI-N87 は lapatinib に対し非常に高い感受性を示し、IC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.08 μM と 0.05 μM であった (Fig. 16A)。一方で、MKN45 は lapatinib に対する感受性が低かった (Fig. 16A)。

続いて、lapatinib 処理後の下流シグナル変化について検討した。Lapatinib 処理により高感受性を示した SNU-216 及び NCI-N87 では EGFR と HER2、Akt、Erk のリン酸化が抑制された (Fig. 16B)。一方、低感受性である MKN45 では lapatinib 処理による下流シグナルの変化は観察されなかった。Akt や Erk などの下流シグナルは細胞の生存・増殖に重要であるため、SNU-216 及び NCI-N87 では lapatinib

処理により EGFR や HER2 に加え、これらの下流シグナルが抑制されたために増殖が抑制されたと考えられる。

以上の結果より、lapatinib に高感受性を示した HER2 遺伝子増幅を有する SNU216 と NCI-N87 を用いて YB-1 の HER2 発現制御メカニズムを検討した。



**Figure 16** 胃癌細胞株（MKN45、SNU216、NCI-N87）の lapatinib（EGFR/HER2-TKI）感受性と下流シグナル

(A) Lapatinib 処理後 72 時間での薬剤感受性を WST 法で検討した。Mean±S.D., n=3

(B) Lapatinib 処理後 6 時間で EGFR ファミリー及び下流シグナル発現を Western-Blot 法で検討した。

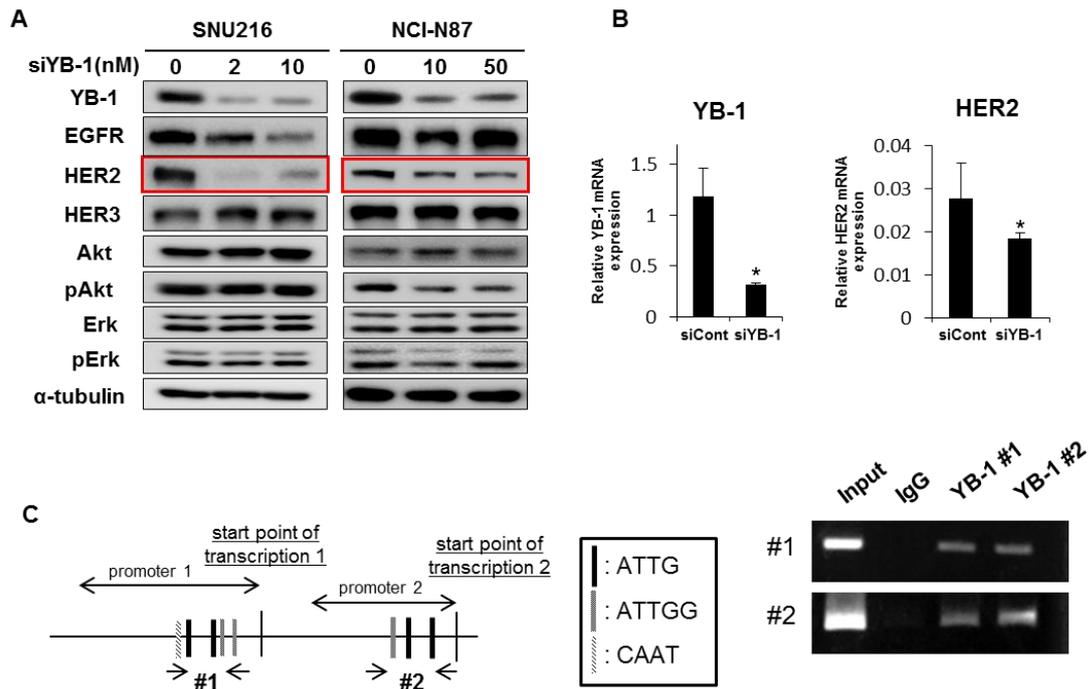
## ヒト胃癌細胞株における YB-1 発現抑制時の増殖因子受容体発現の検討

YB-1 発現抑制時の EGFR ファミリータンパクの発現を検討した。SNU216 と NCI-N87 において、YB-1 siRNA により YB-1 の発現を抑制すると HER2 発現が減少した。一方、SNU216 では EGFR の減少が観察されたが HER3 の発現は変化しなかった。また、NCI-N87 では EGFR と HER3 の発現に大きな変化は観察されなかった (**Fig. 17A**)。このため、YB-1 は EGFR ファミリータンパクの中で HER2 をより特異的に制御していると考えられる。

さらに、YB-1 発現抑制時の *HER2* mRNA 発現を検討した結果、SNU216 で YB-1 発現抑制により *YB-1* mRNA 発現の減少とともに *HER2* mRNA 発現が有意に減少した (**Fig. 17B**)。以上の結果から、YB-1 は *HER2* 発現を転写の過程で制御している可能性が考えられた。

そこで、YB-1 が *HER2* の転写に関与するか否かを明らかにするため、ChIP アッセイにより YB-1 の *HER2* プロモーター領域への結合を検討した。*HER2* のプロモーター領域には YB-1 の結合領域である Y-box が多数存在しており、この Y-box (#1、2) への結合を検討したところ、領域#1 と領域#2 へ YB-1 が結合していることが明らかになった。

以上の結果から、YB-1 は *HER2* の転写因子として *HER2* のプロモーター領域へ結合し、*HER2* の転写を促進していると考えられる。



**Figure 17** 胃癌細胞株における YB-1 発現抑制による EGFR ファミリータンパク発現への影響

(A) SNU216 及び NCI-N87 を用い、YB-1 siRNA 導入後 48 時間での EGFR ファミリータンパク及び下流シグナルを Western-Blot 法で検討した。

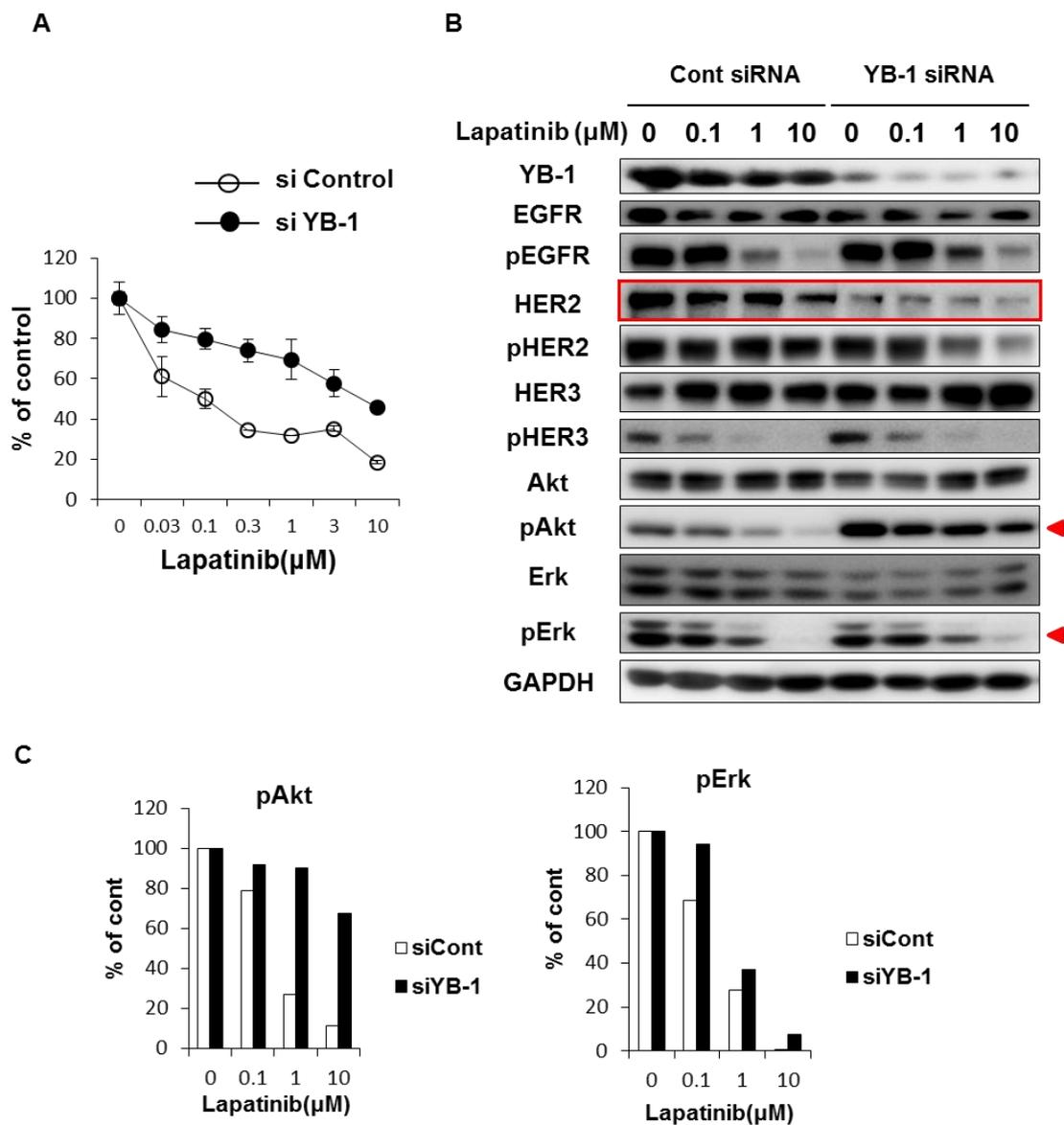
(B) SNU216 を用い、YB-1 siRNA (10nM) 導入後 48 時間での YB-1 mRNA 発現と HER2 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で検討した。Mean $\pm$ S.D., n=3

(C) HER2 プロモーター領域の Y-box (ATTG、ATTGG、CAAT) (左)。SNU216 で抗 YB-1 抗体 (st1968、#1) 又は抗 YB-1 抗体 (ab76149、#2) を用いた ChIP assay により DNA 単離後、各領域 (#1、#2) のプライマーを用い PCR により増幅。アガロースゲル電気泳動により検討 (右)。

## 第2章 胃癌における YB-1 発現と治療薬感受性

### YB-1 発現抑制時の HER2 標的薬感受性の検討

YB-1 発現が HER2 標的薬の感受性に影響するか否かを明らかにするため、YB-1 発現抑制時の HER2 標的薬の感受性を検討した。その結果、NCI-N87 で Control siRNA 処理時には IC<sub>50</sub> が 0.1 μM であったが、YB-1siRNA 処理時には IC<sub>50</sub> が 9.5 μM となり YB-1 発現抑制により HER2 標的薬に対し約 100 倍の耐性を示した (**Fig. 18A**)。次に、耐性メカニズムを明らかにするため、YB-1 発現抑制時の lapatinib 処理による下流シグナルの変化について検討した。その結果、YB-1 発現抑制により HER2 発現の減少が観察された (**Fig. 18B**)。また、lapatinib 処理時の Akt と Erk のリン酸化が Control siRNA と比較して YB-1siRNA 処理時に維持されていることを観察した (**Fig. 18B,C**)。このため、YB-1 発現抑制時には lapatinib の標的分子である HER2 の発現が減少し、Akt、Erk のリン酸化が維持されていることが、lapatinib に対し耐性となった原因であると考えられる。



**Figure 18** NCI-N87 での YB-1 発現抑制時の lapatinib 感受性と下流シグナル  
 (A) YB-1siRNA を 24 時間処理し、lapatinib を 72 時間処理後の細胞数を Coulter Counter により計測。Mean±S.D., n=3  
 (B) YB-1 発現抑制時の増殖因子受容体及び下流シグナルの発現と lapatinib による効果 (Western-Blot 法)。  
 (C) (B)での Western-Blot 法の結果を定量。ローディングコントロールの GAPDH で補正し、Control siRNA 及び YB-1 siRNA を各々 lapatinib (0μM) を 100%とし補正。

## [結果と考察]

第2部では、胃癌細胞において YB-1 発現の抑制が EGFR ファミリータンパクの中で HER2 を特異的に負に制御し、YB-1 発現が HER2 標的薬の感受性の指標となることを示した。

HER2 標的薬である lapatinib は HER2 陽性の胃癌細胞において増殖抑制効果が高いことが報告されている。さらに、近年、Wu らにより胃癌において YB-1 が肝臓への転移及び予後と有意に相関することを報告した<sup>(49)</sup>。そのため、胃癌における YB-1 と HER2 の役割に注目が集まっており、胃癌での YB-1 と HER2 の関連を明らかにすることは胃癌の病態（予後や転移能）の把握や治療方針の発展に重要であると考えられる。

SNU216 と NCI-N87 は HER2 に生存・増殖を依存しており、lapatinib に対し高感受性を示した (**Fig. 16A**)。さらに、lapatinib は EGFR や HER2、HER3 のリン酸化を抑制し、下流シグナルの Akt と Erk のリン酸化を抑制した (**Fig. 16B**)。EGFR ファミリータンパクからの Akt や Erk を中心とする下流シグナルは細胞の生存と増殖に重要である。そのため、チロシンキナーゼ阻害薬による細胞の増殖抑制効果を評価する指標として用いられる。

本研究では、YB-1 発現抑制時に lapatinib を処理すると lapatinib に対し耐性となることを初めて明らかにした (**Fig. 18A**)。この結果は、YB-1 発現抑制により HER2 発現を特異的に抑制し、標的因子が減少したことが要因と考えられる。YB-1 発現抑制時は si Control と比較して lapatinib 処理の Akt 及び Erk のリン酸化が維持していたため lapatinib に対し耐性を示したと考えられる (**Fig. 18B**)。

Lapatinib 処理時に Akt、Erk のリン酸化が維持されていたメカニズムは明らかでないが、HER3 のリン酸化がコントロール (si Control) と比較し、YB-1 発現抑制時においてわずかに増加している傾向が観察された。そのため、HER2 から

の生存・増殖シグナルが減少したことの代償として他の受容体からのシグナルが増加し、Akt や Erk のリン酸化が維持されている可能性が考えられる。

乳癌や肺癌で殺細胞性の抗がん剤（Paclitaxel、Cisplatin）により、YB-1 の核内移行が誘導され YB-1 により制御される因子が誘導されることが多数報告されている<sup>(14,19,20)</sup>。さらに、胃癌において 5-FU 系抗がん剤を中心とした治療後に、約 10% の患者で HER2 陽性胃癌へ性質が変化することが報告されている<sup>(50)</sup>。そのため、胃癌で用いられる殺細胞性の抗がん剤が YB-1 の活性化を誘導し、HER2 発現を増加させている可能性が考えられる。そこで、YB-1 の核内発現の有無を検査することで HER2 陽性胃癌の出現の予測や今後 HER2 標的薬の予防的投与を行う際に、その指標となることを期待している。胃癌患者において YB-1 が HER2 標的薬使用の際のバイオマーカーとなり得るか否かについてさらなる検討が必要である。

## 【方法】

### 細胞

MCF-7、T-47D、SKBr-3、MDA-MB231、MBA-MB453 は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から、KPL-1 は Health Science Research Resources Bank (大阪、日本) から購入した。

MKN45、SNU216、NCI-N87 は Japanese Collection of Research Bioresources (大阪、日本) から購入した。

KPL-1、MCF-7、T-47D、SKBr-3、MDA-MB231、MBA-MB453 は 10%FBS 含有 DMEM で培養し MKN45、SNU216、NCI-N87 は 10%FBS 含有 RPMI で培養した。SKBr-3、SNU216、NCI-N87 は HER2 遺伝子増幅を有し、MKN45 は c-Met 遺伝子増幅を有している。

### 試薬

試薬は以下に示す会社から購入した。

Lapatinib、MG132 : Calbiochem (Darmstadt, Germany)。Fulvestrant、cycloheximide : Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)。Protein-G Sepharose 4B : Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)。Hygromycin B、tamoxifen、17β-エストラジオール、doxycycline (Dox) : 和光純薬工業 (大阪、日本)。

抗 YB-1 抗体 (st1968) は我々の研究室で作成したものを使用した<sup>(19)</sup>。抗 YB-1 抗体 (st1968) は、細胞質及び核内の YB-1 を認識するため、免疫組織化学染色法に使用した。その他の抗体は以下に示す会社から購入した。

抗 YB-1 抗体 (EP2708Y; ab76149) : Abcam (Cambridge, UK)。抗 YB-1 抗体 (EP2708Y; ab76149) は、Western-Blot 法、ChIP アッセイ、共免疫沈降法で用いた。抗 HER2 抗体 (1:1,000; 06-562)、抗 phosphor-HER2 (Tyr1248) 抗体 (1:1,000;

06-229)抗体、抗 HER3 抗体 (1:1,000; 05-390) : Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)。抗 CDC6 抗体 (1:1,000; C42F7; 3387S)、抗 CREB 抗体 (1:1,000; 48H2; 9197L)、抗 ubiquitin (Ub) 抗体 (1:1,000; 3933S)、抗 EGFR 抗体 (1:1,000; 2232)、抗 phospho-EGFR (Tyr1068) 抗体 (1:1,000; 3777)、抗 phospho-HER3 (Tyr1248) 抗体 (1:1,000; 4791)、抗 Erk1/2 抗体 (1:1,000; 9102)、抗 phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr1204) 抗体 (1:1,000; 9101)、抗 Akt 抗体 (1:1,000; 9272)、抗 phospho-Akt (Ser 473) (1:1,000; 9271) 抗体、抗 phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser 32/Ser 36) 抗体 : Cell Signaling Technology (Beverly, MA)。抗 ER $\alpha$  抗体 (1:400; HC-20; sc-543)、Control Mouse IgG : Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。抗 $\alpha$ -tubulin 抗体 (1:5,000; B-5-1-2; T6074)、抗 FLAG (M2) 抗体 (1:1,000; F1804) : Sigma-Aldrich (St Louis, MO)。抗 GAPDH 抗体 (1:5,000; 2275-PC-100) : Trevigen (Gaithersburg, MD)。抗 rabbit IgG HRP 抗体 (Rabbit TrueBlot) (1:1,000; 18-8816-33) : eBioscience (San Diego, CA)。抗 rabbit IgG HRP 抗体は、共免疫沈降法の 2 次抗体とし用いた。

### siRNA による発現抑制

YB-1 siRNA (5'-GGUUCCCACCUUACUACAU-3') は QIAGEN Inc. (Valencia, CA) から購入した。ER $\alpha$  siRNA #1 (5'-AAACGUGUCUGUGUUGUAGGUGACC-3')、ER $\alpha$  siRNA #2 (5'-GGCAGUGUAUAAUCUAUCUCCACUA-3')、control siRNA (medium GC complex) は Invitrogen から購入した。

siRNA は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と Opti-MEM medium (Invitrogen) を使用して、細胞を抗生物質非含有培地で播種してから 24 時間後に細胞導入し、24 時間後に等量培地を添加することで中和した。

### 薬剤感受性の測定

対数増殖期にある細胞を 96 well プレートに 播種し (MKN45 :  $2.5 \times 10^3$  cells、SNU216 :  $2.0 \times 10^3$  cells、NCI-N87 :  $7.0 \times 10^3$  cells)、24 時間培養した後、薬剤を添加した。薬剤を添加後 37°C で 72 時間培養した。生細胞数測定試薬 SF (ナカラ イテスク、京都、日本) を各 well に 20 $\mu$ l 加えて 37°C で 2-3 時間培養し、450 nm の吸光度を測定した。IC<sub>50</sub> 値は吸光度の値がコントロールの半分になる薬剤濃度を生存曲線から決定した。

### チャコール処理血清 (charcoal-stripped serum, CSS) 調整

Fetal bovine serum (FBS) 50 ml に 0.75 g dextran-coated charcoal (Sigma-Aldrich) を添加し、4°C で一晩攪拌。その後、5000 $\times$ g で 20 分間遠心し上清回収。0.45- $\mu$ m pore size filter で 1 回、0.22- $\mu$ m pore size filter で 2 回 filtration 後、使用時まで-30°C で保存。

### 細胞増殖アッセイ (第 1 部)

T-47D/mock 又は T47D/Tet YB-1 を 24 well プレートに 播種し ( $2.0 \times 10^5$  cells/500  $\mu$ l)、24 時間培養した後、Dox (1 $\mu$ g/ml) を添加。24 時間後薬剤を各濃度に調整し添加した。薬剤を添加後 37°C で 96 時間培養した。PBS で洗浄した後、トリプシンを 500 $\mu$ l/well 入れ、生細胞数を計測した。IC<sub>50</sub> 値は生細胞数の値がコントロールの半分になる薬剤濃度を生存曲線から決定した。

### 細胞増殖アッセイ (第 2 部)

対数増殖期にある細胞 (NCI-N87) を 24 well プレートに 播種し ( $4.0 \times 10^5$  cells/400  $\mu$ l)、24 時間培養した後、siRNA を 100 $\mu$ l に調整し、細胞導入した。24 時間後薬剤を各濃度に調整し、500 $\mu$ l/well で添加した。薬剤を添加後 37°C で 72

時間培養した。PBS で洗浄した後、トリプシンを 500 $\mu$ l/well 入れ、生細胞数を計測した。IC<sub>50</sub> 値は生細胞数の値がコントロールの半分になる薬剤濃度を生存曲線から決定した。

### タンパク質の回収

細胞は氷上で PBS により 2 回洗浄し、Lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 0.1  $\mu$ g/mL leupeptin, 0.1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) を添加し 30 分間静置した。スクレイパーでチューブに回収した細胞懸濁液を、15000 rpm で 10 分間遠心し上清を回収した。

### タンパク質濃度の定量

回収した細胞のタンパク質を含むサンプルは Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA) を用い、プロトコールに従って定量した。それぞれのサンプルに Sample Buffer (500 mM Tris-HCl (pH6.8) , 16% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) , 20% saccharose, 0.016% Bromophenol blue) を 4 倍希釈にして加え、Lysis Buffer を用いて濃度を調整した。

### Western-Blot 法

濃縮ゲル及び 10% アクリルアミドの分離ゲルからなるゲルの各レーンに濃度調整したサンプルを同量になるようにアプライし、定電流条件下で電気泳動によりタンパク質を分離した。泳動には TGS Buffer (2.5 mM Tris, 19.2 mM glycine, 0.1% SDS) を用いた。続いて、泳動したアクリルアミドゲルから定電流条件下 5% メタノールを含む TG Buffer (2.5 mM Tris, 19.2mM glycine) を用いてポリフ

ッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Immobilon membranes, Milipore Corp., MA) に転写した。転写後の PVDF 膜を 5% スキムミルク (明治乳業、東京、日本) を含む TTBS Buffer (20 mM Tris, 13.5 mM NaCl, 0.01 % Tween20) 中で室温、45 分間ブロッキングし、1% スキムミルクを含む TTBS Buffer を用いて適切な濃度に希釈した一次抗体に一晩浸した。1% スキムミルクを含む TTBS Buffer で 3 回洗浄した。さらに、PVDF 膜をそれぞれの二次抗体に室温で 3 時間以上浸した。1% スキムミルクを含む TTBS Buffer で 3 回洗った後、Western Lightning™ Plus-ECL (Perkin Elmer Life Science, Inc., MA) を用いて、LAS-4000 mini (GE Healthcare UK Limited) により検出した。

### 核タンパク質の抽出

細胞を氷上で PBS により 2 回洗浄し、PBS を用いてチューブに回収した。細胞懸濁液を入れたチューブを 15000 rpm で 10 分間遠心し、細胞ペレットを得た。ペレットに対して 1:1 の体積となるように Buffer A (10 mM HEPES, 10 mM EDTA, 0.4% IGEPAL, 1 mM dithiothreitol (DTT) , 1 mM PMSF, 0.1 µg/ml leupeptin, 0.1 µg/ml aprotinin, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) を加え、よくピペティングした後 10 分間氷上で静置し、3000 rpm で 10 分間遠心した上清を細胞質分画として回収した。さらに、残ったペレットに Buffer A を 300 µl 加えてよく洗いこみ、3000 rpm で 10 分間遠心した後ペレットを得た。ペレットに対して 3:2 の体積となるように Buffer B (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 µg/ml leupeptin, 0.1 µg/ml aprotinin, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) を加えて、4°C で 2 時間ボルテックスをかけた。その後、15000 rpm で 10 分間遠心し上清を核分画として回収した。

### YB-1/Tet-On システム

pEB-Tet-On YB-1 は、pcDNA3 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) より生成した Amp 耐性及び hygromycin 耐性配列を pEB-multi vector (Clontech) へ挿入した。 TRE-Tight 、 rtTA 、 YB-1-3×NLS (AGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTA GATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATACGGCC ) -3×FLAGは、 pEB-multi vectorのBamHI-EcoRV siteに挿入した。

### YB-1/Tet-On システムによる YB-1 発現誘導系

KPL-1, MCF-7, T-47D, SKBr-3, MDA-MB231, MDA-MB453 に対し、 Lipofectamine LTX を使い、 pEB-Tet-On YB-1 plasmid DNA を導入し 24 時間後抗生物質非含有培地に交換。さらに、24 時間後 200 µg/mL の hygromycin B を培地に添加し、一晚培養後 Dox (1 µg/ml) を添加。72 時間 Dox 処理後細胞を回収し Western-Blot 法によりタンパク発現を検討。

Tet-On システム安定導入株 (KPL-1/Tet YB-1, T-47D/mock, T-47D/Tet YB-1) は、200 µg/mL hygromycin B により選別後、クローニングにより安定導入株を樹立。

### ER $\alpha$ 強制発現株樹立

ER $\alpha$ 陰性細胞株である MDA-MB231 に対し、Lipofectamine LTX を用い pRc/CMV vector 又は pRc/CMV ER $\alpha$  (東北大学林慎一先生より供与) を導入し、24 時間後抗生物質非含有培地に交換。さらに、24 時間後 500 µg/mL G418 disulfate (ナカライテスク) を培地に添加し、その後クローニングにより安定導入株を樹立。

## 全 RNA の抽出

回収する細胞は PBS で 2 回洗った後、ISOGEN（和光純薬工業）を用いて 1.5 ml チューブに回収した。室温で 5 分静置した後、開始容量の 0.2 倍量のクロロホルムを加えボルテックスをかけた。それを室温で 5 分静置した後 12000 rpm で 15 分間遠心し、最上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。そこへ開始容量の 0.8 倍のイソプロパノールを加えて 10 回転倒混和し、12000 rpm で 10 分間遠心した。チューブの底のペレットに、70% エタノールを加えて 12000 rpm で 5 分間遠心した。沈殿したペレットを乾燥させ、適量のジエチルピロカルボネート（diethyl pyrocarbonate; DEPC）処理水（ナカライテスク）に溶解した。

## Real-time RT-PCR

抽出した全 RNA は TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit（Applied Biosystems）とそれぞれの TaqMan® Gene Expression Assay（Applied Biosystems）（Gene; Assay ID: HER2; HS100599ml）を加え、7300 Real Time PCR System（Applied Biosystems）により定量化した。

## 共免疫沈降法

細胞は氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、PBS 2ml/15cm dish を加えスクレイパーにより回収後、1500rpm で 5 分間遠心。ペレットにプロテアーゼ阻害剤混合物を添加した IP Lysis buffer 200 $\mu$ l（50 mM Tris-HCl buffer（pH 7.5）, 250mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.3% NP-40）を添加して氷上で 30 分静置し、溶解した。3000rpm で 15 分間遠心分離した。回収したタンパク質溶液を NET-gel buffer（50 mM Tris-HCl（pH 7.5）, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.25% gelatin, 0.02% sodium azide, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin）により全量 1ml

(2mg/ml) に調整した。Protein-G Sepharose 4B を添加し、1 時間緩やかに攪拌しプレクリアを行い、2000rpm で 2 分間遠心分離し上清を使用した。続いて表記の免疫沈降用抗体をタンパク質 1mg 当たり 4 $\mu$ g 添加し、4°C で一晩緩やかに攪拌した。Protein-G Sepharose 4B を添加して 4°C で 1 時間緩やかに攪拌した。Protein-G Sepharose 4B を 3 回 NET-gel buffer で洗浄し、SDS サンプル buffer 30 $\mu$ l で溶出し、Western-Blot 法で検討した。

### **Luciferase Assay**

HER2 プロモーター配列は胎盤の DNA より以下のプライマーを用い PCR を行った。Primer pair : 5'-CTCGAGTTCTTGCTATCTTACTCCCTTCCT-3'、5'-GGATCCGCCTTCCCTTAACCCTATCGCC-3'。

PCR 産物は、クローニングし pGL3 basic vector (Promega) の XhoI-BamHI site に組み換えた。

pGL3 HER2-luc vector、pEB-Tet-On YB-1、pEB-Tet-On ER $\alpha$ 、renilla luciferase expression vector を Lipofectamine LTX (Invitrogen) と Opti-MEM medium (Invitrogen) を使用して同時にトランスフェクション。

24 時間後細胞を PBS で wash し、Dox (1  $\mu$ g/ml) を 24 時間処理。

トランスフェクション後 48 時間で、Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) を用いルシフェラーゼ活性を検討。

### **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) アッセイ**

ChIP アッセイは EZ ChIP kit (Millipore Corp.) を用い行った。

37%ホルムアルデヒドにより固定後、90 秒間ソニケーション(15 秒 on, 30 秒 off)

を行い、DNA 断片を回収。Protein- G Sepharose 4B を添加し、1 時間緩やかに攪

拌し、プレクリアを行った。2000rpm で2分間遠心分離し、上清を使用した。溶出したクロマチンは抗 YB-1 抗体を 2 $\mu$ g/ml の濃度となるよう添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩緩やかに攪拌した。Protein-G Sepharose 4B を添加して 4 $^{\circ}$ C で1時間緩やかに攪拌した。Low salt wash buffer で1回、High salt wash buffer で1回、LiCl buffer で1回、TE-buffer で2回洗浄し、DNA を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.Valencia, CA) により抽出。

精製した DNA 1 $\mu$ l を 50  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O に溶解し、以下のプライマーで PCR を行った。PCR は、95 $^{\circ}$ C 2分、95 $^{\circ}$ C 1分 56 $^{\circ}$ C 30秒 72 $^{\circ}$ C 30秒 $\times$ 38-40 サイクル、72 $^{\circ}$ C 30秒 12 $^{\circ}$ C 10分で行い、サイクル数は以下のサイクルで行った。

(T-47D: 38cycles, SKBr-3, MDA-MB231: 40cycles)

Primer pairs: HER2#1, 5'-AAAAGGCTCATGTCCCCGTG-3' (forward) 、  
5'-GGTGTACCGCGACTGCGTAC-3' (reverse); HER2#2,  
5'-AGGGGCTCCAATAGAA-3' (forward) 、 5'-AATTTGGGAGGAGACAG-3'  
(reverse)。PCR 産物は 2%アガロースゲルで泳動後、エチジウムブロマイドで染色し解析。

### **Pull down assay**

YB-1 の欠失変異体は以前に報告されたものを用いた<sup>(51)</sup>。

GST 融合タンパクを 1mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG、ナカライテスク) により誘導した大腸菌 (BL-21、Invitrogen) は、プロテアーゼ阻害剤混合物を添加した X-buffer (50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 1 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM PMSF) に懸濁後、30 秒間ソニケーションにより破碎。15000rpm 10 分間遠心後、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を添加し 4 $^{\circ}$ C で4時間攪拌。X-buffer で4回洗浄 (2000rpm 2分間) 後、大腸菌によ

り生成された FLAG-ER $\alpha$ タンパクを添加し 4°C で一晩攪拌。その後、X-buffer で5回洗浄し、SDS サンプル buffer 30 $\mu$ l で溶出した後、Western-Blot 法で検討した。

### ER $\alpha$ 欠失変異体

pTH-FLAG-ER $\alpha$ は、pTH-ER $\alpha$ （産業医科大学和泉弘人先生との共同研究にて供与）より ER $\alpha$  gene を生成し、pTH-FLAG vector に挿入した。ER $\alpha$ 欠失変異体は、PrimeSTAR<sup>®</sup> Mutagenesis Basal Kit を用い、以下のプライマーを用い PCR を行った。

Primer pairs:  $\Delta 1$ , 5'-GCTACTGTTGAGAATTCGCGGCCGCT-3' and  
5'-ATTCTCAACAGTAGCGAGTCTCCTT-3';  $\Delta 2$ ,  
5'-TGGAATTCTCTGCTGGAGACATGAGA-3' and  
5'-CAGCAGAGAATTCCAATTCGCCCTT-3';  $\Delta 3$ ,  
5'-TGGGGTCTTGAGAATTCGCGGCCGCT-3' and  
5'-ATTCTCAAGACCCCACTTCACCCCT-3'.

### ER $\alpha$ 分解能の測定

T-47D/Tet YB-1 (4.0 $\times 10^5$  cells/35mm<sup>2</sup> dish) を播種し、一晩培養後 Dox (1  $\mu$ g/ml) 含有培地に培地交換。12時間培養後 CHX (10  $\mu$ g/ml) と MG-132 (10 $\mu$ M) を添加。CHX と MG-132 を添加後、4、6、8、12、24時間でタンパク回収し Western-Blot 法で検討した。

### ER $\alpha$ ユビキチン化の測定

T-47D/Tet YB-1 (3.0 $\times 10^6$  cells/15cm<sup>2</sup> dish) を播種し、一晩培養後 Dox (1  $\mu$ g/ml)

含有培地に培地交換。12 時間培養後、MG-132 (10  $\mu$ M) を添加し 8 時間培養。その後、抗 ER $\alpha$  抗体又は抗 Ub 抗体により免疫沈降を行い、Western-Blot 法で検討した。

### 実験動物

6~7 週齢のメスの BALB/c nu/nu nude マウスは CLEA (佐賀、日本) より購入した。購入した実験動物は、12 時間サイクルの明暗条件下、ビニールアイソレーターで飼育した。餌及び水は滅菌したものを与えた。

### ヌードマウス皮下移植実験

BALB/c nu/nu nude マウスの首元の皮下に 60 日間徐放性 17 $\beta$ -estradiol pellet (0.72mg) (Innovative Research of America, Sarasota, FL) を移植。17 $\beta$ -estradiol pellet を移植 3 日後に、右側腹部皮下に、T-47D/mock 又は T-47D/Tet YB-1 細胞 (5.0 $\times$ 10<sup>6</sup>cells) を 50% Matrigel (BD Bioscience, Mountain View, CA) に混合し移植した。移植後 7 日目より 3 日おきに腫瘍径を測定した。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) が 100-150 mm<sup>3</sup> になった時点で Dox (1mg/mouse、連日強制経口投与) 又は tamoxifen (500 $\mu$ g/mouse、連日皮下投与) の投与を行った。Tamoxifen は、100% エタノールに溶解後、peanuts oil (sigma) に懸濁し、250mg/50ml に調整し用いた。投薬開始後 14 日目に、麻酔下で腫瘍を回収した。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) は、長径 $\times$ 短径<sup>2</sup> $\times$ 0.5 として近似した。回収した腫瘍は、10% paraformaldehyde で固定を行い、一部を -80 $^{\circ}$ C で保存しタンパク及び mRNA を回収した。

### 腫瘍内タンパク回収

腫瘍塊にプロテアーゼ阻害剤混合物を添加した T-PER™ Tissue Protein Extraction

Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA) を添加後、30 秒間ソニケーションにより破碎。20 分間氷上に静置し、15000rpm 10 分間遠心後、上清を回収。その後、Western-Blot 法によりタンパク発現を検討。

### 【参考文献】

1. Roskoski R Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 79, 34-74 (2014)
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 235, 177-182 (1987)
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783-792 (2001)
4. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Gnant M, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 1659-1672 (2005)
5. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 369, 29-36 (2007)
6. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, Untch M, Rusnak DW, Spehar G, Mullin RJ, Keith BR, Gilmer TM, Berger M, Podratz KC, Slamon DJ. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 1630-1639 (2006)

7. Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol. Cancer Ther.* 6, 667-674 (2007)
8. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Crown J, Chan A, Campone M, Viens P, Davidson N, Gorbounova V, Raats JI, Skarlos D, Newstat B, Roychowdhury D, Paoletti P, Oliva C, Rubin S, Stein S, Geyer CE. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res. Treat.* 112, 533-543 (2008)
9. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, Fujino MA, Ooi A. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immune-sorbent assay. *Int. J. Cancer.* 98, 833-837 (2002)
10. Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann. Oncol.* 16, 273-278 (2005)
11. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann. Oncol.* 19, 1523-1529 (2008)
12. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. ToGA trial investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. *Lancet.* 376, 687-697 (2010)
13. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays.* 25, 691-698 (2003)
14. Kuwano M, Oda Y, Izumi H, Yang SJ, Uchiumi T, Iwamoto Y, Toi M, Fujii T, Yamana H, Kinoshita H, Kamura T, Tsuneyoshi M, Yasumoto K, Kohno K. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1485-1492 (2004)

15. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*. 19, 6194-6202 (2000)
16. Uramoto H, Izumi H, Ise T, Tada M, Uchiumi T, Kuwano M, Yasumoto K, Funa K, Kohno K. p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J. Biol. Chem.* 277, 31694-31702 (2002)
17. Uchiumi T, Fotovati A, Sasaguri T, Shibahara K, Shimada T, Fukuda T, Nakamura T, Izumi H, Tsuzuki T, Kuwano M, Kohno K. YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 281, 40440-40449 (2006)
18. Bargou RC, Jürchott K, Wagener C, Bergmann S, Metzner S, Bommert K, Mapara MY, Winzer KJ, Dietel M, Dörken B, Royer HD. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* 3, 447-450 (1997)
19. Ohga T, Koike K, Ono M, Makino Y, Itagaki Y, Tanimoto M, Kuwano M, Kohno K. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res.* 56, 4224-4228 (1996)
20. Kamura T, Yahata H, Amada S, Ogawa S, Sonoda T, Kobayashi H, Mitsumoto M, Kohno K, Kuwano M, Nakano H. Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer.* 85, 2450-2454 (1999)
21. Faury D, Nantel A, Dunn SE, Guiot MC, Haque T, Hauser P, Garami M, Bognár L, Hanzély Z, Liberski PP, Lopez-Aguilar E, Valera ET, Tone LG, Carret AS, Del Maestro RF, Gleave M, Montes JL, Pietsch T, Albrecht S, Jabado N. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J. Clin. Oncol.* 25, 1196-1208 (2007)
22. Oda Y, Sakamoto A, Shinohara N, Ohga T, Uchiumi T, Kohno K, Tsuneyoshi M, Kuwano M, Iwamoto Y. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 2273-2277 (1998)

23. Oda Y, Ohishi Y, Saito T, Hinoshita E, Uchiumi T, Kinukawa N, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Tsuneyoshi M. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II  $\alpha$  expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.* 199, 251-258 (2003)
24. Shibahara K, Sugio K, Osaki T, Uchiumi T, Maehara Y, Kohno K, Yasumoto K, Sugimachi K, Kuwano M. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 3151-3155 (2001)
25. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, Berger U, Schmidt A, Jürchott K, Schmitt M, Royer HD. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer.* 97, 278-282 (2002)
26. Jurchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, Piaggio G, Fietze E, Dietel M, Royer HD. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 27988-27996 (2003)
27. Wu J, Lee C, Yokom D, Jiang H, Cheang MC, Yorida E, Turbin D, Berquin IM, Mertens PR, Iftner T, Gilks CB, Dunn SE. Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res.* 66, 4872-4879 (2006)
28. Fujii T, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Nakashima K, Nakano K, Shirouzu K, Kohno K, Yanagawa T, Yamana H, Nishio K, Ono M, Kuwano M, Kage M. Expression of HER2 and estrogen receptor  $\alpha$  depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. *Cancer Res.* 68, 1504-1512 (2008)
29. Kashihara M, Azuma K, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Yanagawa T, Terazaki Y, Takamori S, Shirouzu K, Aizawa H, Nakano K, Kage M, Kuwano M, Ono M. Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 4, 1066-1074 (2009)
30. Basaki Y, Taguchi K, Izumi H, Murakami Y, Kubo T, Hosoi F, Watari K, Nakano K, Kawaguchi H, Ohno S, Kohno K, Ono M, Kuwano M. Y-box binding protein-1

- (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. *Eur. J. Cancer.* 46, 954-965 (2010)
31. Bergmann S, Royer-Pokora B, Fietze E, Jürchott K, Hildebrandt B, Trost D, Leenders F, Claude JC, Theuring F, Bargou R, Dietel M, Royer HD. YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification. *Cancer Res.* 65, 4078-4087 (2005)
  32. Davies AH, Reipas KM, Pambid MR, Berns R, Stratford AL, Fotovati A, Firmino N, Astanehe A, Hu K, Maxwell C, Mills GB, Dunn SE. YB-1 transforms human mammary epithelial cells through chromatin remodeling leading to the development of basal-like breast cancer. *Stem Cells.* 32, 1437-1450 (2014)
  33. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 1474-1481 (1999)
  34. Yamashita H, Iwase H, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Yoshimoto N, Endo Y, Fujii Y, Kobayashi S. Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann. Oncol.* 22, 1318-1325 (2011)
  35. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 713-722 (2007)
  36. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann. Oncol.* 22, 1736-1747 (2011)
  37. Davies AH, Barrett I, Pambid MR, Hu K, Stratford AL, Freeman S, Berquin IM, Pelech S, Hieter P, Maxwell C, Dunn SE. YB-1 evokes susceptibility to cancer through cytokinesis failure, mitotic dysfunction and HER2 amplification. *Oncogene.* 30:3649-3660 (2011)
  38. Sakura H, Maekawa T, Imamoto F, Yasuda K, Ishii S. Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene.* 73, 499-507 (1988)

39. Shibata T, Kan H, Murakami Y, Ureshino H, Watari K, Kawahara A, Kage M, Hattori S, Ono M, Kuwano M. Y-box binding protein-1 contributes to both HER2/ErbB2 expression and lapatinib sensitivity in human gastric cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 12, 737-746 (2013)
40. Zhou W, Slingerland JM. Links between oestrogen receptor activation and proteolysis: relevance to hormone-regulated cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 14, 26-38 (2014)
41. Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, Hatschek T, Skoog L, Bergh J. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J. Clin. Oncol.* 30, 2601-2608 (2012)
42. Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Fernö M, Rydén L. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast Cancer Res.Treat.*140, 93-104 (2013)
43. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 92, 2965-2974 (2001)
44. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingston RB, Gown AM. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA.* 291, 1972-1977 (2004)
45. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771-784 (2011)
46. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou MF, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan WH, Mathew BS, Mitra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzelka L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrútia G,

- Valentini M, Wang Y, Peto R; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of estrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 381, 805-816 (2013)
47. Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grooteclaes M, Winkler R. Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem. J.* 370, 323-329 (2003)
48. Bosc DG, Janknecht R. Regulation of Her2/neu promoter activity by the ETS transcription factor, ER81. *J. Cell Biochem.* 86, 174-183 (2002)
49. Wu Y, Yamada S, Izumi H, Li Z, Shimajiri S, Wang KY, Liu YP, Kohno K, Sasaguri Y. Strong YB-1 expression is associated with liver metastasis progression and predicts shorter disease-free survival in advanced gastric cancer. *J. Surg. Oncol.* 105, 724-730 (2012)
50. Sukawa Y, Yamamoto H, Noshio K, Ito M, Igarashi H, Naito T, Mitsuhashi K, Matsunaga Y, Takahashi T, Mikami M, Adachi Y, Suzuki H, Shinomura Y. HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer. *Digestion.* 89, 12-17 (2014)
51. Ise T, Nagatani G, Imamura T, Kato K, Takano H, Nomoto M, Izumi H, Ohmori H, Okamoto T, Ohga T, Uchiyama T, Kuwano M, Kohno K. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res.* 59, 342-346 (1999)

## 【業績】

### 発表論文

1. Watari K, **Shibata T**, Nabeshima H, Shinoda A, Fukunaga Y, Kawahara A, Karasuyama K, Fukushi J, Iwamoto Y, Kuwano M, Ono M. Impaired differentiation of macrophage lineage cells attenuates bone remodeling and inflammatory angiogenesis in Ndr1 deficient mice. **Sci Rep.** 6:19470; 2016.
2. Watari K\*, **Shibata T\***, Kawahara A, Sata K, Nabeshima H, Shinoda A, Abe H, Azuma K, Murakami Y, Izumi H, Takahashi T, Kage M, Kuwano M, Ono M. Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis through M2-type macrophages. **PLoS ONE.** 9(6):e99568; 2014 (\*Contributed equally to this study).
3. Murakami Y, Watari K, **Shibata T**, Uba M, Ureshino H, Kawahara A, Abe H, Izumi H, Mukaida N, Kuwano M, Ono M. N-myc downstream-regulated gene 1 promotes tumor inflammatory angiogenesis through JNK activation and autocrine loop of interleukin-1 $\alpha$  by human gastric cancer cells. **J Biol Chem.** 288(35):25025-37; 2013.
4. **Shibata T**, Kan H, Murakami Y, Ureshino H, Watari K, Kawahara A, Kage M, Hattori S, Ono M, Kuwano M. Y-box binding protein-1 (YB-1) contributes to both HER2/ErbB2 expression and lapatinib sensitivity in human gastric cancer cells. **Mol Cancer Ther.** 12(5):737-46; 2013.
5. Watari K, Nakamura M, Fukunaga Y, Furuno A, **Shibata T**, Kawahara A, Hosoi F, Kuwano T, Kuwano M, Ono M. The antitumor effect of a novel angiogenesis inhibitor (an octahydronaphthalene derivative) targeting both VEGF receptor and NF- $\kappa$ B pathway. **Int J Cancer.** 131(2):310-213; 2012.
6. Azuma K, Kawahara A, Hattori S, Taira T, Tsurutani J, Watari K, **Shibata T**, Murakami Y, Takamori S, Ono M, Izumi H, Kage M, Yanagawa T, Nakagawa K, Hoshino T, Kuwano M. NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. **J Thorac Oncol.** 7(5):779-89; 2012.

### 学会発表

#### 国際学会

○**Tomohiro Shibata**, Kosuke Watari, Hiroto Izumi, Akihiko Kawahara, Satoshi Hattori, Chihiro Fukumitsu, Yuichi Murakami, Ryuji Takahashi, Uhi Toh, Ken-ichi Ito, Maki Tanaka, Masayoshi Kage, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono. Direct binding of ER $\alpha$  to YB-1 suppresses HER2 expression in human breast cancer. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. C13. Boston,

Massachusetts. November 5-9, 2015 (ポスター発表)

○**Tomohiro Shibata**, Hiroto Izumi, Akihiko Kawahara, Satoshi Hattori, Chihiro Fukumitsu, Ryuji Takahashi, Kosuke Watari, Yuichi Murakami, Kimitoshi Kohno, Ken-ichi Ito, Masayoshi Kage, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono. Y-box binding protein-1 YB-1 negatively regulates ER $\alpha$  expression accompanying by enhanced HER2/ErbB2 expression in breast cancer. AACR Annual Meeting 2014. LB-183. San Diego, California. April 5-9, 2014. (ポスター発表)

## 国内学会

### 2015年

○**柴田智博**、和泉弘人、河原明彦、渡公佑、村上雄一、伊藤研一、鹿毛政義、桑野信彦、小野眞弓。Y-box binding protein-1 (YB-1)によるヒト乳癌のER $\alpha$ とHER2の発現制御と治療適正化。第74回日本癌学会学術総会。愛知県名古屋市。2015年10月8-10日（発表日：10月10日）（ポスター発表）

○**柴田智博**、渡公佑、和泉弘人、河原明彦、村上雄一、鹿毛政義、桑野信彦、小野眞弓。ヒト乳癌のY-box binding protein-1 (YB-1)発現はER $\alpha$ とHER2発現を負と正に制御し治療適正化に貢献する。第19回日本がん分子標的治療学会学術集会。愛媛県松山市。2015年6月10-12日（発表日：6月12日）（口頭発表）

### 2014年

○**柴田智博**、和泉弘人、河原明彦、渡公佑、村上雄一、伊藤研一、鹿毛政義、桑野信彦、小野眞弓。ヒト乳癌細胞においてER $\alpha$ はY-box binding protein (YB-1)依存性HER2発現に影響し、分子標的薬の感受性を変化させる。神奈川県横浜市。第73回日本癌学会学術総会。2014年9月25-27日（発表日：9月26日）（口頭発表）

○**柴田智博**、和泉弘人、河原明彦、村上雄一、渡公佑、鹿毛政義、桑野信彦、小野眞弓。ヒト乳癌においてER $\alpha$ はY-box binding protein (YB-1)誘導のHER2発現を制御し、分子標的治療の適正化に貢献する。宮城県仙台市。第18回日本がん分子標的治療学会学術集会。2014年6月25-27日（発表日：6月26日）（ポスター発表）

### 2013年

○**柴田智博**、渡公佑、鍋島弘嗣、篠田あい、小野眞弓。がん細胞由来インターロイキン-1はマクロファージの活性化と腫瘍リンパ管新生とリンパ節転移を促進する。第30回日本薬学会九州支部大会。長崎県佐世保市。2013年12月7-8日（発表日：12月7日）（口頭発表）

○**柴田智博**、渡公佑、村上雄一、桑野信彦、小野眞弓。肺癌のリンパ節転移機序—マクロファージのリンパ管新生への関与。長野県松本市。第22回日本がん転移学会学術集会。2013年7月11-12日（発表日：7月11日）（ポスター発表）

○柴田智博、菅仁史、村上雄一、渡公佑、河原明彦、鹿毛政義、和泉弘人、桑野信彦、小野眞弓。Y-box 結合タンパク-1(YB-1)はヒト胃癌において HER2/ErbB2 発現とラパチニブの感受性を制御する。第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会。京都府京都市。2013 年 6 月 12-14 日（発表日：6 月 14 日）（口頭発表）

#### 2012 年

○柴田智博、渡公佑、河原明彦、村上雄一、鍋島弘嗣、東公一、鹿毛政義、向田直史、桑野信彦、高橋隆、小野眞弓。Interleukin-1 (IL-1) と下流シグナル活性化による肺癌のリンパ節転移亢進の機序と制御。第 71 回日本癌学会学術総会。北海道札幌市。2012 年 9 月 19 日-21 日（発表日：9 月 21 日）（口頭発表）

○柴田智博、渡公佑、村上雄一、向田直史、小野眞弓。Interleukin-1 (IL-1) とその下流シグナルはヒト肺癌のリンパ管新生とリンパ節転移を促進する。第 21 回日本がん転移学会学術集会。広島県広島市。2012 年 7 月 12 日-13 日（発表日：7 月 13 日）（口頭発表）

○柴田智博、渡公佑、河原明彦、村上雄一、鹿毛政義、向田直史、小野眞弓。Interleukin-1 (IL-1) とその下流シグナルはヒト肺癌のリンパ管新生とリンパ節転移を促進する。第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会。福岡県北九州市。2012 年 6 月 27 日-29 日（発表日：6 月 28 日）（口頭発表）

#### 受賞

2015 年 財団法人 日本対がん協会福岡県支部（財団法人 福岡県すこやか健康事業団） がん研究助成金 優秀賞受賞

## 【謝辞】

本研究に際し、本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、ご指導とご鞭撻を賜りました九州大学大学院 薬学研究院 創薬腫瘍科学講座 小野 眞弓 特任教授、渡 公佑 准教授に謹んで深謝致します。

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました九州大学大学院 医学研究院 桑野 信彦 名誉教授に謹んで深謝致します。

本研究に際し、御高閲賜りました九州大学大学院 薬学研究院 薬物動態学分野 家入 一郎 教授、医薬細胞生化学分野 宮本 智文 准教授に謹んで深謝致します。

本研究の推進にあたり、格別な御助言と御協力を賜りました産業医科大学 産業生態科学研究所 呼吸病態学 和泉 弘人准教授に謹んで深謝致します。

本研究の推進にあたり、格別な御助言と御協力を賜りました久留米大学病院病理部 鹿毛 政義 教授、河原 明彦 先生に謹んで深謝致します。

本研究に際し、有益なご助言とご協力を賜りました聖マリア健康科学研究所 村上 雄一 博士に謹んで深謝致します。

本研究に際し、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた九州大学大学院 薬学研究院 創薬腫瘍科学講座の皆様へ深く感謝致します。

最後に、この長きに渡る大学生活において、絶えることのない理解と愛情により、温かく見守り続け、精神的及び経済的に支援してくださいました両親をはじめとする家族に心より感謝申し上げます。

2016年2月 柴田智博