

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

YB-1 を中心とした乳癌及び胃癌の新規治療戦略

創薬腫瘍科学講座 3PS12031E 柴田智博

【序論】

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。

Y-box binding protein 1 (YB-1) は DNA や RNA との結合に重要な Cold Shock Domain (CSD) 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 α 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 α 発現に緊密に依存しており、乳癌患者の約 90% は ER α 及び HER2 のいずれかを発現している。そのため、ER α 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 α 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 α 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。

【方法】

YB-1/Tet-On システムによる YB-1 発現誘導系: MCF-7, T-47D, SKBr-3, MDA-MB453 に対し、Lipofectamine LTX を用い、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 μ g/mL の hygromycin B を培地に添加し、一晚培養後 Doxycycline (Dox, 1 μ g/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 (T-47D/mock, T-47D/Tet YB-1) は、200 μ g/mL の 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。

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 β -エストラジオール (E2) pellet (0.72mg) を移植。E2 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 (5.0×10^6 cells) を 50% Matrigel に混合し移植。移植後 7 日目より 3 日おきに腫瘍径を測定。

腫瘍体積 (mm³) が 100-150 mm³ になった時点で Dox (1mg/mouse、連日強制経口投与) 又は tamoxifen (500µg/mouse、連日皮下投与) を投与。投与開始後 14 日目に、麻酔下で腫瘍を回収した。腫瘍体積 (mm³) は、長径×短径²×0.5 として近似した。

【結果】

第 1 部 乳癌細胞における YB-1 による ERα 及び HER2 発現制御

【1】 HER2 及び ERα 発現に対する YB-1 の影響

ERα 陽性乳癌細胞で、核内 YB-1 発現誘導は HER2 発現を亢進させ、ERα 発現を低下させた (Fig. 1A)。一方、ERα 陰性乳癌細胞では核内 YB-1 発現誘導による HER2 及び ERα 発現に変化は観察されなかった (Fig. 1B)。

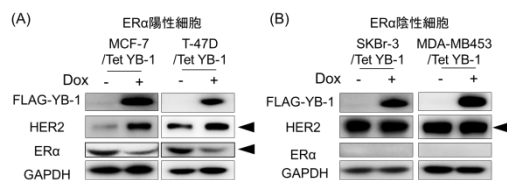


Fig.1 YB-1 Tet-Onシステムを用いた核内YB-1誘導時のHER2発現とERα発現 ERα陽性乳癌細胞株(A)、ERα陰性乳癌細胞株(B)に対し、YB-1 Tet-Onシステムを導入し、Dox (1µg/ml) 72時間処理後のFLAG-YB-1、HER2、ERα発現を Western-Blot法で検討。

【2】 HER2 発現に対する ERα siRNA による ERα 発現抑制の効果検討

ERα siRNA による ERα 発現抑制は ERα siRNA の濃度及び時間依存的に HER2 タンパク及び mRNA 発現量を上昇させた。この結果より、ERα 陽性乳癌細胞における ERα 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。

【3】 HER2 発現に対するエストラジオール (E2) の効果検討

ERα の活性が HER2 発現に関与するか否かを検討するため、ERα の agonist である E2 による HER2 発現効果を検討した。E2 は HER2 タンパク及び mRNA 発現量を減少させた。さらに、E2 と ERα 標的薬 (tamoxifen、fulvestrant) は濃度依存的に HER2 タンパク及び mRNA 発現量を上昇させた (Fig. 2)。

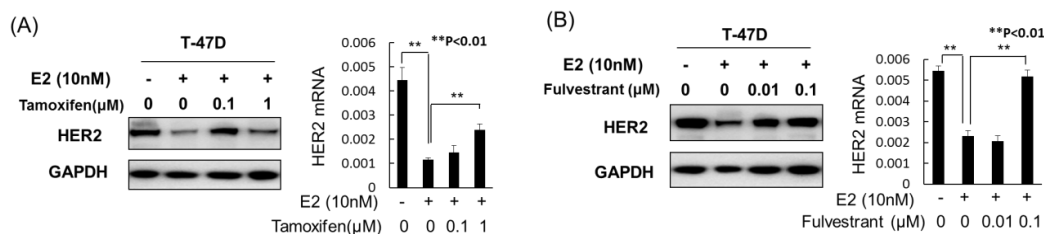


Fig.2 乳癌細胞株における、HER2発現に対するE2及びERα標的薬の影響 T-47Dをチャコール処理血清含有培地で24時間培養し、E2 (10nM)とtamoxifen (A) 又はfulvestrant (B)を72時間処理後のHER2タンパク発現と48時間処理後のHER2 mRNA発現をそれぞれWestern-Blot法とreal-time RT-PCR法で検討した。Mean±S.D., n=3. **P<0.01

【4】 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の効果検討

YB-1 発現誘導時の HER2 発現に ERα が関与するか否かを明らかにするため、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の有無と ERα の活性や ERα 標的薬の影響を検討した。ERα 陽性乳癌細胞で E2 は YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合を減少させ、さらに E2 処理条件下で tamoxifen 又は fulvestrant 処理により YB-1 の HER2 プロモーター領域への結合が回復した (Fig. 3)。

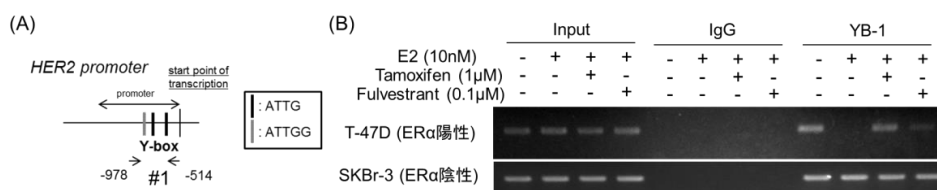


Fig.3 YB-1のHER2プロモーター領域への結合に対するE2及びERα標的薬の影響 (A) HER2プロモーター領域のY-box(ATTG, ATTGG)。 (B) T-47D及びSKBr-3を用い、チャコール処理血清含有培地で24時間培養後、E2 (10nM)とtamoxifen (1µM)、fulvestrant (0.1µM)を24時間処理。抗YB-1抗体を用いたChIP assayによりDNA単離後、#1領域のプライマーを用いPCRにより増幅。アガロースゲル電気泳動により検討。

【5】 YB-1 と ER α の結合とその結合ドメインの検討

共免疫沈降法による検討から、細胞内で YB-1 と ER α の結合が観察された。次に、YB-1 と ER α の結合に E2 または tamoxifen が影響するか否かを検討した。その結果、E2 は YB-1 と ER α の結合を増加させ (Fig. 4A)、tamoxifen は YB-1 と ER α の結合を阻害した (Fig. 4B)。このことより、YB-1 は活性化型の ER α への結合能が大きいと考えられる。さらに、Pull down assay による検討から、YB-1 が CSD を介し ER α と結合していることが観察された。そのため、ER α 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。

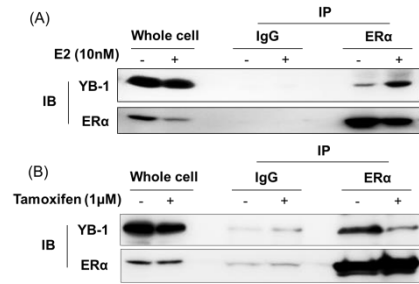


Fig.4 YB-1とER α の結合に対するE2及びER α 標的薬の影響
T-47Dを用い、E2(10nM) (A)又は tamoxifen(1 μ M)(B)を24時間処理し、抗ER α 抗体で免疫沈降後、抗YB-1抗体で結合を検出。

【6】 YB-1 誘導時の ER α タンパクの安定性の検討

YB-1 発現誘導は、ER α のタンパク発現を減少させたが、mRNA 発現に変化は観察されなかった。そのため、YB-1 による ER α 発現制御は翻訳後の制御であると考えられる。そこで、ER α の安定性の検討を行ったところ、YB-1 発現誘導により ER α の分解が亢進した。さらに、YB-1 発現誘導により ER α のユビキチン化が増加し、ER α のプロテアソームでの分解が亢進した。

【7】 マウス皮下移植モデルでの YB-1 誘導時の tamoxifen 感受性の検討

マウス皮下移植モデルにおいて、YB-1 発現誘導により tamoxifen 治療に抵抗性を示す (Fig. 5A) とともに、HER2 発現の上昇と ER α 発現の減少が観察された (Fig. 5B)。

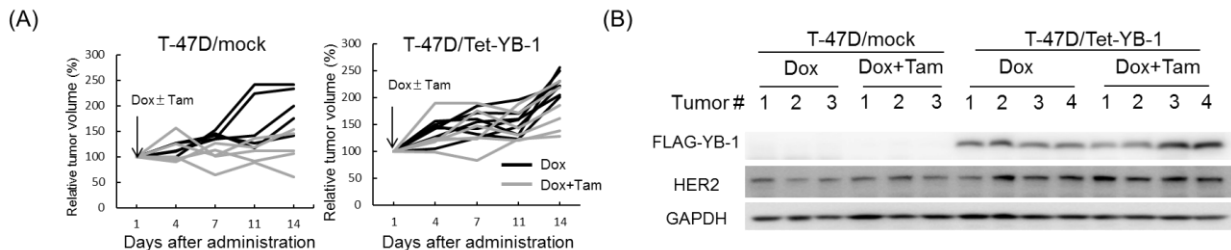


Fig.5 乳癌皮下移植モデルにおける、YB-1発現誘導のtamoxifen(Tam)感受性に与える影響

(A) T-47D/mock及びT-47D/Tet YB-1 (5.0×10^6 cells/mouse) 皮下移植後、腫瘍体積が100-150mm³に達したマウスに対し、Dox (1mg/mouse、1日1回経口投与)とtamoxifen(500 μ g/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タンパク発現量をWestern-Blot法で検討。

第1部では、乳癌において、YB-1 による ER α 及び HER2 発現制御メカニズムを明らかにし、YB-1 がホルモン治療薬の感受性の指標となることを示した。

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

【1】 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

siRNA を用いた YB-1 発現抑制条件下において胃癌細胞の EGFR ファミリータンパクの中で HER2 発現が特異的に低下した。胃癌細胞を用いた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。

【2】 YB-1 発現抑制時の HER2 標的薬感受性の検討

HER2 遺伝子増幅を示す胃癌細胞における 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 の活性化の維持が観察された。

第 2 部では、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。

【考察】

本研究において、乳癌細胞で YB-1 は HER2 発現を転写レベルで制御し、ER α のプロテアソームでの分解を誘導することが明らかになった (Fig. 6)。

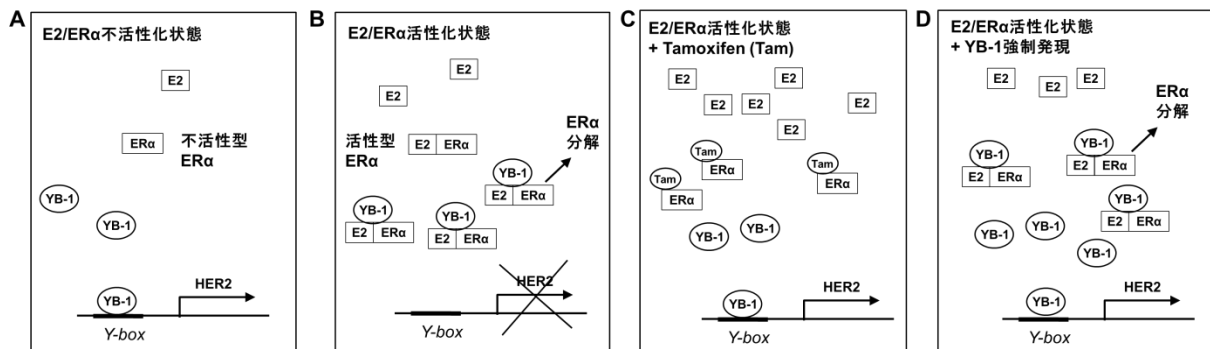


Fig.6 本研究から考えられる乳癌におけるYB-1によるHER2とER α 発現制御機序

(A) E2/ER α 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/ER α の発現が高い状況下では、ER α がYB-1のCSDI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ER α 標的薬はYB-1とER α 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ER α との結合を介しER α の分解を誘導するとともにHER2発現を誘導する。

近年、ER α 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。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 α 陽性/HER2 陰性であった患者が ER α 陰性/HER2 陽性の乳癌に性質が変化することが報告された。このような患者群ではホルモン治療により YB-1 と ER α 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. 6)。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。

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 標的薬やホルモン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。

【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. 1 **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. **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. **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.

