

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17701  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2012～2012  
 課題番号：24701033  
 研究課題名（和文） 次世代シーケンサーを活用した内分泌療法耐性乳がんの新規診断・治療法の開発  
 研究課題名（英文） Identification of novel diagnostic and therapeutic factors for endocrine therapy-resistant breast cancer by next-generation sequencing strategy  
 研究代表者  
 伊地知 暢広（IJICHI NOBUHIRO）  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：80380624

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、内分泌療法耐性乳がんの新規診断・治療分子標的の同定を目的とし、クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを活用してフォークヘッド転写因子 FOXP1 のゲノムワイドな結合領域の網羅的同定を行った。  
 エストロゲン刺激後の ER $\alpha$ 陽性乳がん細胞株 MCF-7 細胞において、約 4000 カ所超の結合領域を同定し、FOXP1 が ER $\alpha$ /FOXA1 転写調節ネットワークに対し重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、タモキシフェン治療乳がん臨床検体を用いた免疫組織学的検討から、FOXP1 が FOXA1 と共にタモキシフェン治療乳がんの予後良好性を規定する因子であることを解明した。

## 研究成果の概要（英文）：

To identify the novel diagnostic and therapeutic factors for endocrine therapy-resistant breast cancer, we focused on FOXP1, one of a forkhead transcription factor family, as a candidate, and its genome-wide distribution in ER $\alpha$ -positive breast cancer MCF-7 cells was examined by next-generation sequencing strategy. We demonstrated that majority of binding regions of FOXP1 in MCF-7 cells stimulated with estrogen were overlapped with those of both ER $\alpha$  and FOXA1. We also demonstrated that the double-positive immunoreactivities of FOXP1 and FOXA1 are significantly associated with a favorable prognosis for survival of breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. In this study, we revealed that, similar to FOXA1, FOXP1 is assumed to be a critical transcription factor for ER $\alpha$  signaling, and both forkhead transcription factors can serve as predictive factors for acquired endocrine resistance in breast cancer.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、臨床腫瘍学

 キーワード：内分泌療法、乳がん、エストロゲン、FOXP1、次世代シーケンサー、FOXA1、ER $\alpha$ 、タモキシフェン耐性

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんの発生・増殖にはエストロゲンシグナルが密接に関与している。乳がんの多くはエストロゲン受容体 (ER) を発現しており、エストロゲン依存性の増殖を示す。臨床においては、ER に対する拮抗阻害薬である抗エストロゲン製剤タモキシフェン (TAM) が乳がんの内分泌療法として用いられており、エストロゲン依存性乳がんの治療に奏功している。しかしながら、TAM の長期投与により耐性を獲得するがんが生じることが大きな問題となっており、有効な治療法が未だ確立されていない。このような乳がんのエストロゲン依存性から非依存性を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムとして、エストロゲンにより正に制御される遺伝子とその制御から逸脱することにより、エストロゲン非存在下でも発現し、内分泌療法耐性を付与している可能性が考えられる。したがって、乳がんにおけるエストロゲンシグナルのさらなる解明を基盤とした、内分泌療法耐性乳がんの新たな診断・治療法確立のための新規分子標的の探索が急務とされている。ER はリガンド依存性の転写因子で、エストロゲンの結合により活性化され、ゲノム中のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合し、その近傍の標的遺伝子の転写を直接調節することで、エストロゲン作用を媒介している。ER の ERE を介した転写調節には様々な coregulator や cofactor が関わっており、クロマチンレベルでのダイナミックな制御メカニズムが考えられている。中でも近年、フォークヘッド転写因子 (FOX) ファミリーの一つである FOXA1 は乳がんにおける ER のパイオニア因子と考えられており、クロマチンのリモデリングを介してエストロゲン標的遺伝子の転写調節に関わることが注目されている。近年では、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) と DNA chip 法を組み合わせた ChIP-on-chip 解析や、ChIP assay と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq 解析など、網羅的な解析手法を応用し、FOXA1 や GATA-4、AP-2 $\gamma$ 、TLE1 などの転写因子による ER 転写の調節メカニズムがゲノムワイドに検討されつつある。

申請者らの研究グループでは、乳がん・子宮内膜がんなどのホルモン依存性がんにおけるエストロゲンの作用メカニズムを明らかにする目的で新規エストロゲン応答遺伝子を同定し、それらの機能を解明してきた。興味深いことに、FOX 転写因子ファミリーに属する FOXP1 がアンドロゲン受容体 (AR) との相互作用を介して AR の転写抑制に関わることを

報告した (Biochem Biophys Res Commun 374, 388-393, 2008) が、FOXP1 は ER 陽性乳がん細胞におけるエストロゲン応答遺伝子でもあり、ER の ERE を介した転写活性を AR とは逆に増強し、エストロゲン依存性の増殖を促進することを明らかにした。また、乳がん臨床検体において、FOXP1 の発現が ER や FOXA1 の発現と正に相関し、リンパ節転移などの悪性度とは負の相関を示し、乳がんの予後良好に関わる因子である可能性を見出している (Horm Cancer, 2, 286-297, 2011)。FOXP1 に加えてエストロゲン応答遺伝子として同定した Efp の発現が、乳がん組織において上昇しており、予後と相関することを明らかにした (Clin Cancer Res 11, 6148-6154, 2005)。さらに、Efp は細胞周期のブレーキ役 14-3-3 $\sigma$  の破壊を担うユビキチンリガーゼであることを解明し、細胞周期制御ならびにがん耐性獲得の新しいメカニズムを解明した (Nature 417, 871-875, 2002)。エストロゲン応答 ER 陽性乳がん細胞に Efp を過剰発現させたところエストロゲン依存性増殖を促進し、逆に Efp の発現を抑えると増殖が抑えられたことから、Efp は新しいがん治療の分子標的であること、創薬への応用が可能であることを示した (Cancer Gene Ther 17, 624-632, 2010)。また Efp 以外のエストロゲン応答遺伝子の探索として EBAG9、COX7RP を含む複数の標的遺伝子を同定した (Mol Cell Biol 18, 442-449, 1998; Mol Brain Res 63, 375-379, 1999)。EBAG9 は腫瘍免疫に関わる腫瘍マーカーであることを明らかにし (Cancer Res 65, 3700-3706, 2005)、前立腺がんの予後の独立した予測因子であることを示した (Int J Cancer 106, 310-315, 2003)。また、申請者はエストロゲン関連受容体 ERR $\gamma$  がエストロゲン標的遺伝子であり、乳がんのリンパ節転移と正に相関することを示した (J Steroid Biochem Mol Biol 123, 1-7, 2011)。これらのエストロゲン応答遺伝子の解析を通じて、FOXP1 の乳がんにおける標的遺伝子と ER $\alpha$ /FOXA1 転写調節ネットワークとの機能的関連、ER 転写に対する促進作用分子メカニズムを明らかにすることで、乳がんの新規診断・治療法の開発へつなぐとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、内分泌療法耐性乳がんにおける新規診断・治療法の開発を目的として、FOXP1 を介した転写調節ネットワークに着目し、MCF-7 細胞ならびに TAM 耐性 MCF-7 細胞 (TAM-R) を対象に、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) による解析と次世代シーケンサーを活用し、FOXP1 のクロマチン結合領域の網羅的探索を行う。これら解析により同定されたクロマチン結合領域近傍に位置する標的遺伝子のマッピングを行う。また、ER $\alpha$ 、FOXA1 ならびに GATA-3 を介した転写調節ネットワークとのクロストークについて検討を行い、クロマチン結合領域・標的遺伝子の共通性ならびに独自性について解析する。さらに、特異的 siRNA を用いたノックダウンを行い、FOXP1 に加え、ER $\alpha$ 、FOXA1 のクロマチンへのリクルートの変化と標的遺伝子の転写調節に及ぼす影響を解析する。さらに、同定した新規 FOXP1 標的遺伝子のエストロゲンや TAM による発現調節、増殖能、浸潤能に対する作用、ER-ERE 転写活性に対する影響などの機能解析を行う。さらに、乳がん臨床検体を用いた免疫組織学的検討ならびに RNA レベルでの発現解析により、これら因子の発現と臨床パラメーターおよび予後との相関を検討し、エストロゲンシグナル、TAM 耐性化ならびにタモキシフェン治療効果予測における相関関係とバイオマーカーとしての意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ER $\alpha$ 陽性乳がん細胞株 MCF-7 細胞を、100 nM Estradiol にて 15 分間刺激後、ホルマリン固定、ソニケーション処理し、ER $\alpha$ 、FOXA1、FOXP1 それぞれの特異抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。その後、抗体結合 DNA を定法に従い精製した。得られた DNA サンプルは、次世代シーケンサー Illumina GAIIX により解析を行い、全ゲノム中における ER $\alpha$ 、FOXA1 ならびに FOXP1 結合部位を同定した。

乳がん臨床検体を用いた解析は、埼玉医科大学国際医療センター乳腺腫瘍科との共同研究として行った。埼玉医科大学国際医療センター乳腺腫瘍科に加え、四国がんセンター、国立がんセンターならびに東京都立駒込病院にて集積された乳がん組織切片を対象とした。パラフィン包埋した乳がん組織を薄切後、定法に従って脱パラフィン処理と親水化処理を行った後、121°C で 15 分間の抗原賦活化処理を行った。その後、抗 FOXP1 抗体、抗 FOXA1 抗体を用い、ポリマー試薬法 (Envision, Dako 社) と 3,3'-diaminobenzidine (DAB)

substrate kit (Vector 社) により免疫染色を行った。病理評価は 2 名の病理医により Allred score 法を用いて行った。FOXP1、FOXA1 の免疫反応性と各種臨床パラメーターならびに再発・予後との相関について、カイ 2 乗検定、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定、ロジスティック回帰分析を用いて解析した。

## 4. 研究成果

本研究では、内分泌療法耐性乳がんにおける耐性獲得機序の分子生物学的解明と、診断・治療に向けた新たな分子標的の同定を目的とし、特に、エストロゲン応答遺伝子であり、乳がんの予後・内分泌療法効果予測に関わることを独自に明らかにしつつあるフォークヘッド転写因子 FOXP1 に着目し、クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを活用したゲノムワイドな結合領域の網羅的同定を行い、FOXP1 の乳がんにおける標的遺伝子と ER $\alpha$ /FOXA1 転写調節ネットワークとの機能的関連、ER の転写に対する促進作用分子メカニズムの解明を行った。

ER $\alpha$ 陽性乳がん細胞株 MCF-7 細胞を対象に、エストロゲン刺激後のゲノムワイドな FOXP1 結合領域を次世代シーケンサーにより網羅的に探索した結果、約 4000 カ所超の結合領域を同定した。これら FOXP1 結合領域の大部分は FOXA1 ならびに ER $\alpha$ 結合領域とオーバーラップしており、3 者複合体が形成されていることが明らかになった。加えて、siRNA による FOXP1 のノックダウンにより、GREB1 などのエストロゲン応答遺伝子の発現レベルが減弱し、FOXP1 が ER $\alpha$ /FOXA1 転写調節ネットワークに対し重要な役割を担っていることを明らかにした。また、FOXP1 により核内受容体ファミリーに属する SHP、LRH-1 の転写が制御されていることを見出し、ER $\alpha$ 陽性乳がんにおける FOXP1 標的遺伝子であることが示された。さらに、タモキシフェン治療乳がん臨床検体を用いた免疫組織学的検討から、FOXP1 免疫反応性が ER $\alpha$ ならびに FOXA1 免疫反応性と正の相関を示し、FOXP1・FOXA1 の共陽性と無再発生存期間ならびに全生存期間との間に有意な正の相関関係があることを明らかにした。これらの結果から、FOXP1 が FOXA1 と共にタモキシフェン治療乳がんの予後良好性を規定する因子であることを解明した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer*. 2012 Aug;3(4):147-59.  
doi: 10.1007/s12672-012-0111-0. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S: EBAG9 immunoreactivity is a potential prognostic factor for poor outcome of breast cancer patients with adjuvant tamoxifen therapy. (2012. 12. 4-8) 35th San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas, USA

2. 伊地知暢広、堀江公仁子、池田和博、大石貴史、井上聡：フォークヘッド転写因子 FOXP1 の全ゲノムにおける結合部位同定による ER シグナル調節機構の解析 (2012. 11. 18) 第20回日本ステロイドホルモン学会 (石川)

3. 堀江公仁子、高山賢一、伊地知暢広、池田和博、井上聡：ホルモン療法抵抗性前立腺がん細胞におけるエネルギー代謝関連核内受容体作用の検討 (2012. 11. 17-18) 脳心血管抗加齢研究会 2012 (大阪)

[図書] (計1件)

1. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S: FOXP1 and Estrogen Signaling in Breast Cancer: Chapter 6, HORMONES AND BREAST CANCER, Elsevier, in press.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊地知 暢広 (IJICHI NOBUHIRO)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号: 80380624