

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15530

研究課題名（和文）転移性乳癌における転移と免疫細胞を標的としたZeb-1制御による抗転移薬の開発

研究課題名（英文）Zeb-1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer

研究代表者

武田 朋也（Takeda, Tomoya）

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：20734031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌の予後不良となる最大の原因として、転移が挙げられる。転移には、乳癌(上皮細胞)が間葉系の乳がん細胞に変化し、浸潤・運動を亢進する上皮間葉転換(EMT)が重要な役割を担う。本研究では乳癌におけるEMTの分子メカニズムについて検討した。その結果、Zeb-1が乳癌のEMT誘導に関与し、Zeb-1を阻害することで、乳癌の転移が抑制された。このことから、乳癌の転移におけるZeb-1の重要性が明らかとなり、乳癌の転移を抑制する新たな治療標的分子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は女性で最も死亡数が高いがんで、その原因として転移が挙げられる。つまり、乳癌の転移を抑制することが、乳癌患者の予後を改善する有効な治療法であるが、現在のところ乳癌の転移を抑制する治療法は国内外において開発されていない。本研究結果において、Zeb-1が乳癌の転移に関与することを明らかにし、Zeb-1を阻害することで乳癌の転移を抑制できることを見出した。これらの成果は乳癌の転移を抑制する治療法開発につながり、乳癌患者の予後改善に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Metastasis of breast cancer is the major cause of treatment failure and cancer deaths. During epithelial-mesenchymal transition (EMT), the epithelial cells assume a mesenchymal cell phenotype. EMT is a key regulator of aggressive invasion and metastasis in tumorigenesis. In this study, we investigated the molecular mechanism of EMT in breast cancer. Our results showed that Zeb-1 knockdown inhibited the EMT characteristics, migration, invasion and metastasis of breast cancer. Zeb-1 may have potential therapeutic targets in metastasis of breast cancer.

研究分野：医療系薬学

キーワード：乳癌 転移 上皮間葉転換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は、ステージ 期までの 5 年生存率は約 90%以上と予後良好であるが、病期が進行すると 5 年生存率は低下し、ステージ 期では約 30%と非常に予後が悪くなる。乳癌の予後不良となる最大の原因として、転移が挙げられる。そのため、乳癌の転移を抑制することが、乳癌患者の予後を改善する有効な治療法であるが、現在のところ乳癌の転移を抑制する治療法は国内外において開発されていない。

癌の転移には、血管内や転移組織への浸潤、血管内を移動するための細胞運動及び浸潤が重要で、この運動能・浸潤能獲得には、上皮間葉転換(EMT; Epithelial-Mesenchymal Transition) が深く関与することが知られている。EMT とは、上皮細胞が間葉系の細胞に変化する現象で、細胞間接着の低下及び細胞の形態変化を引き起こし、細胞が遊離することで、がん細胞の運動能及び浸潤能を亢進する。しかし、EMT の分子メカニズムが未だ十分に解明されておらず、乳癌の転移を抑制する治療標的分子も同定されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は上皮間葉転換(EMT)を起こした乳癌細胞の分子メカニズムを解明し、乳癌の転移を抑制する治療標的分子を同定し、乳癌患者の予後改善につながる基礎研究が目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用細胞株

マウス由来乳癌細胞株である 4T1 を用い、HEPES、L-グルタミン、ペニシリン・ストレプトマイシン、炭酸水素ナトリウム、10% FBS を含む RPMI1640 培養液にて、37、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

#### (2) real time PCR

各種条件下で培養した 4T1 細胞の RNA は TRIZOL Reagent により抽出した後、PrimeScript™ Reverse Transcriptase を用いて cDNA の合成を行った。目的遺伝子の特異的なプライマー及び TB Green Premix Ex Taq™ を用いて解析した。

#### (3) 運動能の測定

Falcon cell culture inserts の上層に 4T1 細胞を懸濁させた溶液を添加し、37、5% CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベート後、上層に残っている細胞を取り除き、下層に移動した 4T1 細胞をディフクイック染色により固定、染色し、算定することで評価した。

#### (4) 浸潤能の測定

Falcon cell culture inserts の上層に Matrigel と 4T1 細胞を懸濁させた溶液を添加し、37、5% CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベート後、上層に残っている細胞を取り除き、下層に移動した細胞をディフクイック染色により固定、染色し、算定することで評価した。

#### (5) Zeb-1 siRNA による転移抑制効果の検討

使用動物は 6~8 週齢の Balb/c 系雌性マウスを用いた。各種条件下で培養した 4T1 細胞を BALB/c マウスに尾静脈注射した。In Vivo Imaging System により肺転移を確認後、肺を摘出し、肺転移結節数を測定した。

#### (6) 統計学的解析

上記の方法により得られた結果は平均値 ± 標準偏差で示した。各群間の検定には ANOVA with Dunnett を用い、p<0.05 のとき有意差があったとした。

### 4. 研究成果

#### (1) Zeb-1 siRNA 処理による EMT 抑制効果の検討

Zeb-1 が乳癌の EMT 誘導に関与するのか検討した。Zeb-1 siRNA 処理した乳癌細胞では E-cadherin の発現増加及び N-cadherin の発現低下を認めた (図 1)。このことから、Zeb-1 が乳癌での EMT 誘導に関与することが示唆された。

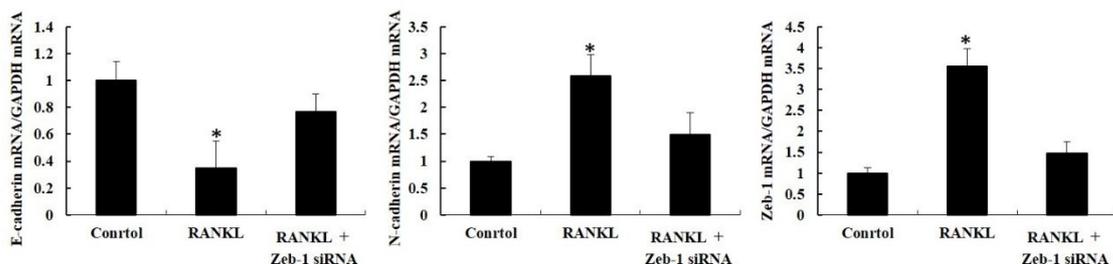


図 1 Zeb-1 siRNA 処理による EMT 抑制効果の検討

## (2) Zeb-1 siRNA 処理による運動能及び浸潤能の検討

EMT が誘導されるとがん細胞の運動能及び浸潤能が亢進することが示されている。そこで、Zeb-1 siRNA 処理により、運動能及び浸潤能が抑制されるか検討した。Zeb-1 siRNA 処理した乳がん細胞では運動能及び浸潤能の低下を認めた (図 2)。

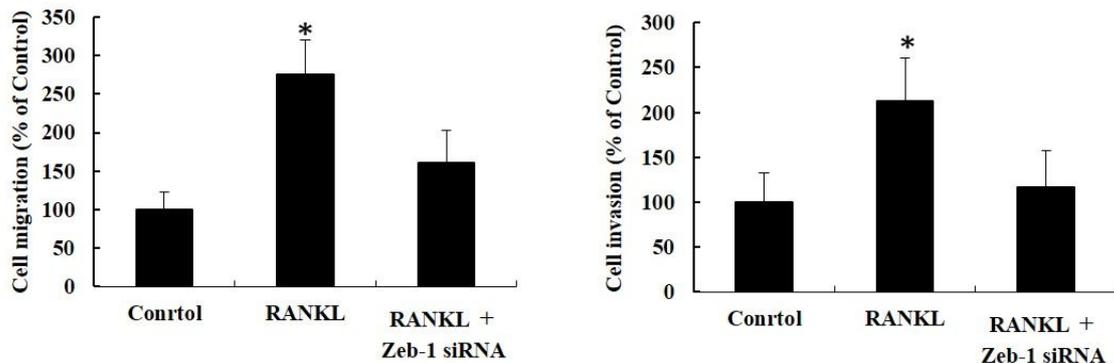


図 2 Zeb-1 siRNA 処理による運動能及び浸潤能の検討

## (3) EMT 誘導による免疫チェックポイント分子の発現解析

近年、EMT と腫瘍免疫逃避機構に関連することが報告されている。そこで、乳癌での EMT 誘導時に発現変動する免疫チェックポイント分子について検討した。EMT を誘導した乳癌細胞では、免疫チェックポイント分子のリガンドである PD-L1 の発現増加を認めた (図 3)。さらに、Zeb-1 が PD-L1 の発現誘導にも関与するのかが検討した。Zeb-1 siRNA 処理した乳癌細胞では PD-L1 の発現低下を認めた。このことから、Zeb-1 は PD-L1 の発現に関与することが明らかとなった。

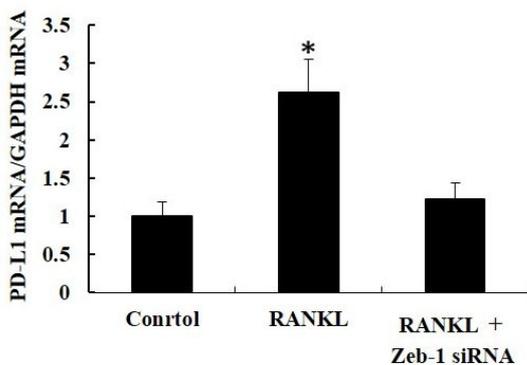


図 3 EMT 誘導による免疫チェックポイント分子の発現解析

## (4) Zeb-1 siRNA 処理による転移抑制効果の検討

Zeb-1 siRNA 処理により、転移が抑制されるか *in vivo* で検討した。EMT を誘導した乳癌細胞と比較し、Zeb-1 siRNA 処理した乳癌細胞では肺転移結節数の減少を認めた (図 4)。

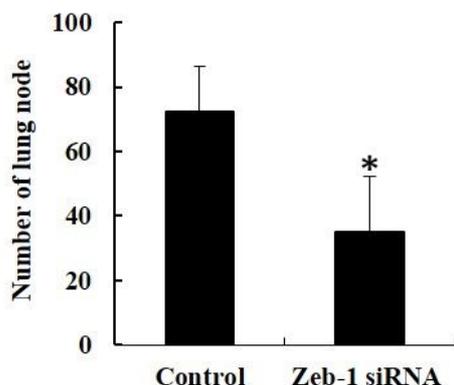


図 4 Zeb-1 siRNA 処理による転移抑制効果の検討

以上のことから、Zeb-1 が乳癌の EMT 誘導に関与し、Zeb-1 を阻害することで、乳癌の転移が抑制された。また、Zeb-1 は免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現に関与することで、腫瘍免疫回避機構に関与している可能性が考えられる。このことから、乳癌の転移における Zeb-1 の重要性が明らかとなり、乳癌の転移を抑制する新たな治療標的分子となり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda T, Tsubaki M, Tomonari Y, Kawashima K, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S.	4. 巻 100
2. 論文標題 Bavachin induces the apoptosis of multiple myeloma cell lines by inhibiting the activation of nuclear factor kappa B and signal transducer and activator of transcription 3.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother.	6. 最初と最後の頁 486-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2018.02.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田朋也、椿正寛、地主みなみ、源野秀次、西田升三.
2. 発表標題 Sorafenib suppresses the tumor growth and metastasis of melanoma through suppression of receptor tyrosine kinase pathway.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 源野秀次、椿正寛、武田朋也、田畑光希、西田升三.
2. 発表標題 Rho/YAP経路活性化によるRHAMM及びCXCR4発現亢進を介した転移亢進機構.
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田朋也、椿正寛、浅野良太、川島啓司、田畑光希、西田升三.
2. 発表標題 Dimethyl fumarate suppresses the tumor growth and metastasis through suppression of NF-kappaB.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----