

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19070

研究課題名(和文) がん進展におけるMafK-Gpnmb経路の機能と分子標的治療

研究課題名(英文) Roles of MafK-Gpnmb axis in malignant progression of cancer and molecular targeted therapy

研究代表者

沖田 結花里 (OKITA, Yukari)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30743710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに乳がんの腫瘍形成や転移形成に関わる分子として、転写因子MafKおよびMafKによって誘導される膜タンパク質GPNMBを同定した。MafKおよびGPNMBは上皮間葉転換(EMT)を誘導し、腫瘍形成や浸潤・転移に関与することを示した。

今回EMTおよび腫瘍形成誘導におけるMafK-GPNMB経路の役割について解析を進めると、MafKの翻訳後修飾が、MafKの機能調節に関わることを示す新規知見を得ることができた。またGPNMBにおいて、EMTや腫瘍形成誘導に重要なドメインおよびモチーフを同定することができた。今後より詳細なメカニズムを検討することで、乳がん治療の標的となり得る分子を見出す。

研究成果の概要(英文)：Previously we showed that the transcription factor MafK is involved in induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and malignant progression of breast cancer cells. Furthermore, we identified glycoprotein nmb (GPNMB) as a target of MafK, which also has the functions as an inducer of EMT and tumorigenesis.

In this project, we further investigated the molecular mechanisms how MafK-GPNMB axis contributes to EMT induction and tumorigenesis. Then, we found post-translational modification of MafK is important for functional regulation of MafK in EMT induction and tumorigenesis. Moreover, we identified some domains or motifs which are essential for GPNMB-mediated EMT induction and tumorigenesis. We are going to investigate further detail mechanisms in order to find new target for breast cancer treatment.

研究分野：腫瘍学

キーワード：MafK GPNMB 腫瘍形成 EMT 転移形成 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

1981年以降日本人の死因の第1位はがんであり、その罹患率、死亡率はいまだに漸増傾向にある。がんの発生、進展には多くの分子異常が関与し、がん種によって多岐にわたる。その中でがんの成立に特に強く寄与する変化を知ることは、がんの分子メカニズムを明らかに出来るだけでなく、分子標的治療の有力な標的になり得ると考えられる。

私たちは以前、がんの発生初期から発現が亢進している Transforming growth factor- (TGF-) が、転写因子 Nrf2 の機能を抑制することを示した(Okita *et al*, *J Biol Chem* 288(28):20658-20667, 2013)。この研究で TGF- の標的遺伝子として転写因子 MafK を同定し、乳腺上皮 NMuMG 細胞を用いて MafK 発現細胞株を樹立した。その細胞の性質を解析する過程で、MafK は上皮間葉転換 (EMT) を誘導する新規転写因子であることを見出した。EMT はがん細胞の浸潤、転移および幹細胞様性質の獲得に關与する現象である。MafK 発現細胞では EMT の特徴である E-cadherin の発現低下、運動および浸潤の亢進、さらに幹細胞の性質の1つである足場非依存性増殖能の亢進(図1A)、マウスへの移植実験で造腫瘍性を獲得していることも示された。次に DNA マイクロアレイ解析により、MafK によって誘導される遺伝子として Glycoprotein nmb (GPNMB) という膜タンパク質を同定した。興味深いことに、GPNMB 単独でも EMT 誘導、造腫瘍性の亢進が起こることを示した(図1、B、C)。また乳がん細胞で MafK や GPNMB をノックダウンすることで、細胞の浸潤、転移および造腫瘍性が抑制された。以上のことから、MafK-GPNMB 経路は強力な作用を示す乳がんの新規発がん因子であることが明らかになった。

2. 研究の目的

乳がんの発生および進展に関わる新規因子として、私たちは独自に MafK-GPNMB 経路を見出した。この経路ががんの発生や進展にどのように関わるのかについてより詳細に調べることで、発がんの分子メカニズムを明らかに出来るだけでなく、がんの分子標的治療の有力な標的になり得ると考えられる。

EMT は、がんの浸潤、転移および幹細胞様性質の獲得にも寄与していることが報告されており、その制御機構の解明はがんの発生および進展について理解する鍵になる可能性がある。本研究では、MafK-GPNMB 経路による EMT 誘導と造腫瘍性獲得の分子メカニズムを明らかにし、これを標的とした分子標的治療薬の開発を目指す。

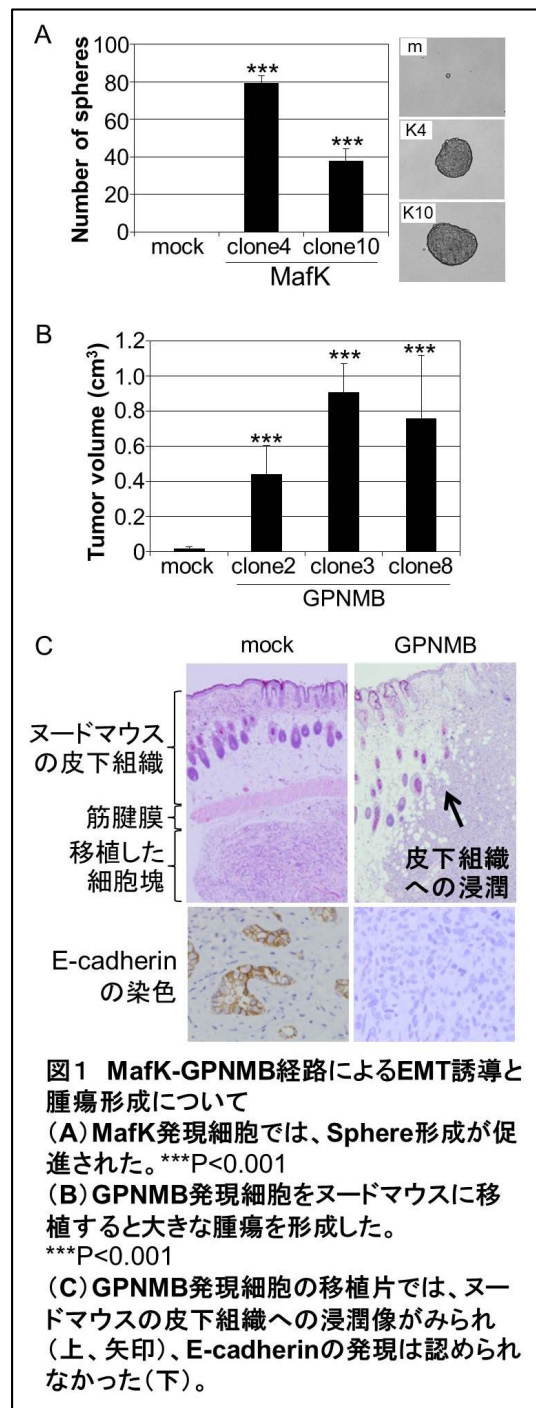


図1 MafK-GPNMB経路によるEMT誘導と腫瘍形成について

(A) MafK発現細胞では、Sphere形成が促進された。***P<0.001

(B) GPNMB発現細胞をヌードマウスに移植すると大きな腫瘍を形成した。***P<0.001

(C) GPNMB発現細胞の移植片では、ヌードマウスの皮下組織への浸潤像がみられ(上、矢印)、E-cadherinの発現は認められなかった(下)。

3. 研究の方法

(1) MafK-GPNMB 経路による EMT 誘導と腫瘍形成能獲得機構の解明

MafK による E-cadherin 制御におけるエピジェネティック関連因子の関与について免疫沈降-ウェスタンブロット法、レポーターアッセイ、DNA アフィニティー沈降 (DNAP) 法などにより検討した。

GPNMB チロシン残基から伝わるシグナル伝達経路の同定: GPNMB のリン酸化チロシンに結合するタンパク質を質量分析法にて解析した。

GPNMB による EMT および腫瘍形成能誘導に関わるドメインの同定: PCR 法を用いて GPNMB

の変異体を数種類作製し、その機能について、ウェスタンブロット法、Sphere 形成実験、マウスへの移植実験などにより検討した。

(2) MafK-GPNMB 経路の腫瘍形成や転移への役割解明

腫瘍形成能を調べる実験系（細胞レベル、個体レベル）また転移能を調べる実験系（細胞レベル、個体レベル）の確立を試みた。

(3) GPNMB を標的とした環状ペプチドのスクリーニングと応用

(2) で確立した実験系を用いて、GPNMB による EMT もしくは腫瘍形成誘導能を減弱させる環状ペプチドをスクリーニングした。

GPNMB 結合環状ペプチドの応用について検討した。

4. 研究成果

(1) MafK-GPNMB 経路による EMT 誘導と腫瘍形成能獲得機構の解明

MafK による E-cadherin 制御については、MafK との結合が報告されているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 3 (*Biochim Biophys Acta* 1783(5):713-727, 2008) との結合を免疫沈降法-ウェスタンブロット法により確認できた。また、MafK と共発現させることで協調的に E-cadherin プロモーター活性を抑制することが、レポーターアッセイにより明らかになった。さらに、MafK の翻訳後修飾が MafK により E-cadherin 抑制や腫瘍形成に重要であるという新規知見を得ることができた。現在さらなる検討を進めている。

GPNMB チロシン残基から伝わるシグナル伝達経路の同定については、リン酸化チロシンを含むペプチドプローブと非リン酸化チロシンを含むペプチドプローブを作製し、免疫沈降により結合タンパク質の同定を試みた。残念ながら、期間内にリン酸化チロシンに特異的に結合するタンパク質の同定には至らなかった。しかし、他のグループにより Breast tumor kinase (BRK) が GPNMB のリン酸化チロシンに結合することが報告された (*Nat Cell Biol* 18:213-224, 2016)。現在 BRK が私たちの系にも関与しているのかについて検討している。

GPNMB による EMT および腫瘍形成能誘導に関わるドメインの同定については、GPNMB の構造を基に既知のドメインやモチーフを欠損させた変異体を PCR 法を用いて作製し、その後恒常発現細胞を樹立した。変異体のいくつかは、Sphere 形成、マウスでの腫瘍形成能を有していないことが明らかになった。また E-cadherin など EMT マーカーの発現について、ウェスタンブロット法および RT-PCR 法により解析した。それらの結果より、EMT および腫瘍形成能誘導に重要な領域をいくつか同

定することができた。現在、さらにその機能について詳細に検討している。

(2) MafK-GPNMB 経路の腫瘍形成や転移への役割解明

腫瘍形成能を調べる実験系として、Sphere 形成（細胞レベル）、皮下移植モデル（個体レベル）また転移能を調べる実験系として、Trans-well を用いた Migration アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイ（細胞レベル）、肺転移モデル、腹膜播種モデル（個体レベル）を確立することができた。

(3) GPNMB を標的とした環状ペプチドのスクリーニングと応用

GPNMB に結合する環状ペプチドは複数種類得ることができた。そこで、(2) で確立した Sphere 形成、Migration アッセイを用いて、GPNMB による腫瘍形成もしくは EMT 誘導能を減弱させる環状ペプチドをスクリーニングした。しかしながら、どの候補ペプチドも GPNMB の機能を阻害することはできなかった。

GPNMB 結合環状ペプチドの応用について、GPNMB 結合環状ペプチドに蛍光ラベルを付け、細胞表面に発現した GPNMB を検出することに成功した。現在治療薬開発への応用を目指している。

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2件)

1. Yukari Okita, Minori Kimura, Rudy Xie, Chen Chen, Larina Tzu-Wei Shen, Yurika Kojima, Hiroyuki Suzuki, Masafumi Muratani, Masao Saitoh, Kentaro Semba, Carl-Henrik Heldin, Mitsuyasu Kato: The transcription factor MAFK induces EMT and malignant progression of triple-negative breast cancer cells through its target GPNMB. *Science Signaling*, 10(474): eaak9397, 2017. DOI: 10.1126/scisignal.aak9397. (査読有)

2. Ahmed M. Abdellatif, Hisashi Oishi, Takahiro Itagaki, Yunshin Jung, Hossam H. Shawki, Yukari Okita, Yoshikazu Hasegawa, Hiroyuki Suzuki, Salah E. El-Morsy, Mesbah A. El-sayed, Mahmoud B. Shoaib, Fumihiko Sugiyama, Satoru Takahashi: β -Cell-Specific *Mafk* Overexpression Impairs Pancreatic Endocrine Cell Development. *PLoS One*. 11(2):e0150010, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150010. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 沖田結花里 他: 乳がんにおける GPNMB の役割、第 39 回分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日~2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2. 陳 晨、沖田結花里 他: Roles of GPNMB in Breast Cancer Stem Cells、第 39 回分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日~2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
3. 沖田結花里 他: GPNMB の機能解析と医療応用、第 24 回翠嶂会セミナー、2016 年 10 月 29 日~10 月 30 日、ホテル壮観(宮城県・宮城郡松島町)
4. Yukari Okita 他: Roles of GPNMB in breast cancer malignant formation and progression、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日~2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
5. 加藤光保、沖田結花里: 転写因子 MafK は TGF- β によって誘導され、腫瘍形成を促進する、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日~2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
6. Rudy Xie、Yukari Okita 他: Extracellular domain is essential for breast cancer tumorigenicity、Tsukuba Global Science Week (TGSW)2016、2016 年 9 月 17 日~2016 年 9 月 19 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)
7. Yukari Okita 他: Roles of GPNMB in breast cancer initiation and malignant progression、第 41 回内藤カンファレンス、2016 年 7 月 5 日~2016 年 7 月 8 日、シャトレゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道・札幌市)
8. 沖田結花里 他: 乳がんの発生・進展における GPNMB の役割、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日~2016 年 5 月 14 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)
9. 加藤藍、沖田結花里 他: 腎がんにおける Gpmb の発現と腫瘍形成、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日~2016 年 5 月 14 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)
10. Yukari Okita 他: Transcription factor MafK induces epithelial-mesenchymal transition and malignant progression of breast cancer cells、Faseb meeting

TGF- β Superfamily: Signaling in Development and Disease、2015 年 7 月 12 日~2015 年 7 月 17 日、コロラド州(アメリカ合衆国)

11. 沖田結花里 他: 乳がんにおける転写因子 MafK の働き、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日~2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
12. 木村友和、沖田結花里 他: 膀胱癌の浸潤能に対する GPNMB の影響、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日~2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場 愛知県・名古屋市)
13. 木村美範、沖田結花里 他: 乳がん細胞における Gpmb 発現制御機構の解析、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Ulrich Valcourt, Jonathon Carthy, Yukari Okita, Lindsay Alcaraz, Mitsuyasu Kato, Sylvie Thuault, Laurent Bartholin, and Aristidis Moustakas: Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor β . Methods Mol Biol. 2016; 1344: 147-81. DOI: 10.1007/978-1-4939-2966-5_9.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201704120300.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖田 結花里 (OKITA, Yukari)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号: 30743710

(2) 研究協力者

加藤 光保 (KATO, Mitsuyasu)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 20194855