

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

芳香族炭化水素受容体 (AhR) の乳がんにおける機能の解析

分子病態解析学講座

山下 直哉 印

【序論】 芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) は、環境化学物質であるダイオキシン類や芳香族炭化水素類をリガンドとし、それらリガンドの毒性発現に中心的な役割を果たす受容体型転写因子として知られている。通常 AhR は細胞質に局在しているが、リガンドが結合すると細胞質から核内に移行し、AhR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成する。その後、その複合体は、標的遺伝子の転写調節領域に存在する AhR 結合配列である異物応答配列 (XRE) に結合し、cytochrome P450 (CYP) 1A1 等の標的遺伝子 mRNA 発現を誘導する。

AhR は、リガンドにより活性化することで、受容体型転写因子であるエストロゲン受容体 (ER) による転写調節等をおこなうこと (いわゆる内分泌かく乱作用) が報告されており、乳がんを含むホルモン依存的な疾患の病態との関与が疑われる。また、AhR は、受容体型転写因子としての特性上、リガンド (低分子化合物) により活性調節が容易になされることから、AhR が関与する疾患治療のための創薬標的に十分なりうる。そこで、所属教室 (公衆衛生学教室) の菅野らは、AhR と乳がんの関係に着目し、これまでに、リガンドで活性化した AhR がヒト乳がん幹細胞由来腫瘍様塊の形成を抑制することを明らかにしている (参考文献 1)。このことから、AhR リガンドの乳がん治療への活用が強く期待される。

一方で、菅野らは、東邦大学医療センター佐倉病院との共同研究から、正常乳腺組織と比較し、乳がんでの AhR の発現が高いことを見出した。このことは、AhR が乳がんの悪性化や生存等に重要な役割を果たすことを示唆するものであり、その実証は、AhR が乳がんの治療標的になることの証明につながるものと思われる。そこで本研究では、「乳がんにおいて AhR の発現が高くなっていることの生理的意義・役割」を明らかにすることを目的とした。具体的には、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) 過剰発現による乳がん悪性化への AhR の関与 (第 1 章) と抗がん剤に対する AhR 発現や活性化の影響 (第 2 章) を精査することで、乳がんにおける AhR の生理的意義・役割を考察した。

第 1 章 Heregulin-HER2/HER3 シグナルによる HER2 過剰発現乳がんの悪性化における AhR の役割

【背景・目的】 HER2 過剰発現乳がんでは、HER2 を介した細胞内シグナル伝達経路 (HER2 シグナル) の活性化が悪性化の原因として考えられている。菅野らは、この HER2 シグナルによる乳がんの悪性化には、AhR の発現増加やその活性化が関与していることを報告した (参考論文 2)。したがって、HER2 過剰発現による乳がんの悪性化に

における AhR の作用機序の解明が次の課題となる。

HER3 にそのリガンドである heregulin (HRG) が結合すると、HER2/HER3 のヘテロダイマーが形成され、HER2 過剰発現乳がんの悪性化に関わる細胞内シグナル伝達経路 (HRG-HER2/HER3 シグナル) が活性化する。そこで本研究では、HRG-HER2/HER3 シグナル活性化による乳がんの悪性化に対する AhR の役割を検討することとした。

【方法】 菅野らによって、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 に HER2 発現プラスミドを導入し HER2 を恒常的に発現させた細胞株 (HER2-5) が樹立されている。この細胞株から、CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集により AhR 遺伝子をノックアウトした HER2-5 AhR KO 細胞株を樹立した。種々 mRNA 発現量およびタンパク質発現量は、リアルタイム RT-PCR 法及びウエスタンブロット法により測定した。AhR の細胞内局在性は、ウエスタンブロット法および蛍光タンパク質 (YFP) 融合 AhR 発現プラスミド導入により評価した。がんの悪性化の指標の一つである細胞遊走は、wound healing assay で評価した。

【結果および考察】 まず、The Cancer Genome Atlas プロジェクトのマイクロアレイデータを用いて、乳がんにおける AhR と HRG の mRNA 発現量の相関性を解析したところ、両者に正の相関が認められた。このことより、HRG-HER2/HER3 シグナルによって AhR の発現・活性が制御されている可能性が考えられた。実際に、HER2-5 細胞に HRG を処理したところ、AhR タンパク質の発現増加が認められ、その可能性が実証された。

次に、AhR の機能発現 (活性化) に重要なステップである核移行に対する HRG 処理の影響を検討した。その結果、HRG 処理により、AhR の核画分への蓄積と YFP 融合 AhR タンパク質の経時的核移行が観察された。このことから、リガンドの結合を介さずに、HRG-HER2/HER3 シグナルによっても AhR が活性化されることが示唆された。

HRG-HER2/HER3 シグナルは、乳がんの転移等に関与する細胞遊走の促進などを介して悪性化に関与する。そこで、HRG 処理による細胞遊走の促進における AhR の関与を明らかとするため、AhR 遺伝子をノックアウトした HER2-5 AhR KO 細胞株を樹立し、細胞遊走能の検討を行った。

その結果、HER2-5 細胞と比較し、HER2-5 AhR KO 細胞では HRG 処理による細胞遊走促進の度合いが減弱していた (図 1)。また、HRG 処理による細胞遊走促進因子である炎症性サイトカイン interleukin (IL) -6、IL-8 mRNA の発現誘導は、HER2-5 細胞では認められたが、HER2-5 AhR KO 細胞では認められなかった。以上のことから、HRG 処理による細胞遊走の促進には、AhR の活性化を介した炎症性サイトカインの発現誘導が重要であることが明らかとなった。

【小括 1】 HRG-HER2/HER3 シグナルによる HER2 過剰発現乳がんの悪性化には、そのシグナルによる AhR の発現誘導と活性化を介した細胞遊走促進作用が関与する。

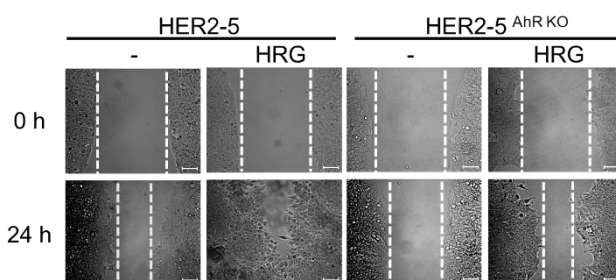


図1. HRGの細胞遊走促進作用に対するAhRの影響

第2章 乳がんのドキソルビシンに対する感受性における AhR の役割

【背景・目的】第1章で AhR の発現増加と活性化が乳がんの悪性化に深く関わることを示唆されたことから、著者らは様々なヒト乳がん細胞株における AhR タンパク質の発現量と AhR 活性化の指標である細胞内局在性を評価した。その結果、トリプルネガティブ乳がん (TNBC ; ER、プロゲステロン受容体および HER2 発現が陰性) 細胞株では、他のサブタイプと比べて AhR の発現が高く、また、恒常的な AhR の核移行 (活性化) が認められることを見出した。

TNBC は、乳がん全体の約 15% を占めているが、抗エストロゲン薬や抗 HER2 薬等の適切な治療薬が存在しないため、治療が困難なサブタイプとされている。このことから、TNBC 治療のために効果的なシード化合物の探索や治療薬の開発が世界中で盛んに行われており、菅野らもまた生薬学教室との共同研究により有効な生薬成分由来シード化合物を報告している (参考論文 3)。

現在、TNBC に対する薬物治療は、トポイソメラーゼ II 阻害薬であるドキソルビシン (DOX) を用いた化学療法が主体である。一般的に、TNBC は化学療法に対する感受性が高いとされるが、化学療法に抵抗性を示す患者も多いため、全体的に予後が悪いとされている。したがって、その治療抵抗性のメカニズム解明とそれに基づく治療抵抗性改善法を開発することは必要不可欠な課題である。TNBC 細胞株では他のサブタイプと比較し、AhR の発現が高く、恒常的な AhR の活性化が認められることから、AhR が化学療法に対する抵抗性にも関与することが十分に予想される。そこで、第2章では、TNBC 治療に用いられる DOX の感受性に対する AhR の役割を検討することとした。

【方法】TNBC である MDA-MB 231 細胞株から、CRISPR/Cas9 法を用いて、AhR KO 細胞株を樹立した。細胞生存率、mRNA 発現量およびタンパク質発現量はそれぞれ、MTS アッセイ、リアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法により測定した。

【結果および考察】MDA-MB 231 細胞の野生型 (WT) と比較し、AhR KO 細胞では 48 時間の DOX 処理により細胞生存率が有意に減少した (図 2A)。次に、DOX の代謝に関わる aldo-keto reductase (AKR) 1C3、AKR1A1、carbonyl reductase 1 (CBR1) の mRNA 発現量を WT と AhR KO 細胞とで比較した。その結果、WT と比較し、AhR KO 細胞では、AKR1C3 mRNA 発現量が有意でかつ顕著に低くなっていた (図 2B)。同様に、AKR1C3 タンパク質発現量も WT 細胞と比較し、AhR KO 細胞で低いことが認められた。このことから、恒常的に活性化している AhR が

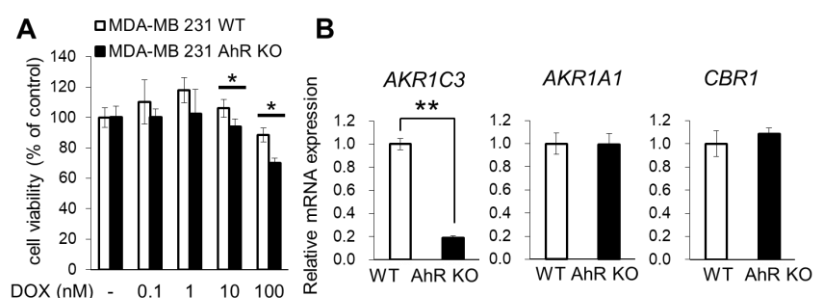


図2. ドキソルビシン (DOX) の感受性に対する AhR の影響

A. MTSアッセイによる細胞生存率の評価

B. DOX代謝酵素のmRNA発現量の比較

Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

AKR1C3 の発現を制御し、DOX の抵抗性に関与していることが考えられた。

実際に、AKR1C3 発現の DOX の感受性に対する影響を評価するために、siRNA を用いた AKR1C3 の発現減弱化を MDA-MB 231 細胞で実施した。その結果、AKR1C3 の発現抑制により MDA-MB 231 細胞の DOX に対する感受性が増強した。以上のことから、AhR KO 細胞では、DOX の感受性が WT より増強していること、そして、この要因の一つとして AKR1C3 の発現減少が関与している可能性が考えられた。

【小括 2】 TNBC における AhR の発現量の亢進と恒常的な AhR の活性化は、AKR1C3 の発現を誘導することで、DOX の感受性を減弱させる。

【総括】 第 1 章、第 2 章では、AhR の発現増加と細胞内シグナルによる AhR の活性化は、乳がんの悪性化および DOX の抵抗性に関与することを示した。これらの結果より、乳がんでの AhR の高い発現は、悪性化と治療薬剤（化学療法）抵抗性の獲得という乳がんにとって有利に働いていることが考えられた。しかし一方で、序論で記述したように、所属教室の菅野らが報告している、リガンドにより活性化した AhR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を考慮に入れると、AhR の細胞内シグナルによる活性化とリガンドによる活性化は、乳がんにおいて異なる役割を担っていることが想定される。したがって、その AhR の二面的な機能を適切にコントロールし、活用することで、AhR は乳がんの新規分子標的として乳がん治療薬開発に有用であると考えられる。

【対象論文】

Yamashita N, Saito N, Zhao S, Terai K, Hiruta N, Park Y, Bujo H, Nemoto K, Kanno Y.

Heregulin-induced cell migration is promoted by aryl hydrocarbon receptor in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Exp. Cell Res.*, **366**, 34–40 (2018).

【参考論文】

1. Zhao S, Kanno Y, Nakayama M, Makimura M, Ohara S, Inouye Y.
Activation of the aryl hydrocarbon receptor represses mammosphere formation in MCF-7 cells. *Cancer Lett.*, **317**, 192–198 (2012).
2. Zhao S, Ohara S, Kanno Y, Midorikawa Y, Nakayama M, Makimura M, Park Y, Inouye Y.
HER2 overexpression-mediated inflammatory signaling enhances mammosphere formation through up-regulation of aryl hydrocarbon receptor transcription. *Cancer Lett.*, **330**, 41–48 (2013).
3. **Yamashita N**, Kondo M, Zhao S, Li W, Koike K, Nemoto K, Kanno Y.
Picrasidine G decreases viability of MDA-MB 468 EGFR-overexpressing triple-negative breast cancer cells through inhibition of EGFR/STAT3 signaling pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 2608–2612 (2017).

論文審査結果の要旨

論文提出者：山下 直哉 論文審査委員（主査）：根本 清光（公衆衛生学教室）

論文題目：芳香族炭化水素受容体（AhR）の乳がんにおける機能の解析

わが国の女性が罹患する悪性腫瘍の中で乳がんの罹患者数は最多であり、死亡率、罹患率は横ばいあるいは増加傾向を示していることから、より有効な乳がんの診断・治療法の開発は重要かつ急務な課題である。

著者である山下氏が所属する公衆衛生学教室では、受容体型転写因子である芳香族炭化水素受容体（AhR）の乳がん治療への活用を目指しており、既に、正常乳腺部位よりも乳がん組織部位で AhR の発現量が高いことを東邦大学医療センター佐倉病院との共同研究により見出している。本研究では乳がんにおける AhR の発現増加の意義を明らかとすべく、ヒト上皮成長因子受容体（HER）2 過剰発現乳がん細胞の悪性化や乳がん治療に用いられる抗がん剤ドキシソルビシン（DOX）の感受性に対する AhR 発現の重要性を評価し、以下の二章として論文にまとめている。

第 1 章では、HER3 に結合することで HER2/HER3 ヘテロダイマーを形成し、下流のシグナル伝達経路を介して HER2 過剰発現乳がんの悪性化を促進するとされる HER3 リガンド heregulin（HRG）を用いて、その悪性化機構に対する AhR 発現の意義を調査した。まず、The Cancer Genome Atlas プロジェクトの公開データ（TCGA）を解析し、ヒト乳がん組織での HRG と AhR mRNA 発現量に正の相関性を見いだした。次に、HER2 過剰発現乳がん細胞株への HRG 処理が、転写依存的に AhR タンパク質発現を誘導すること、AhR の活性化を意味する AhR の核移行を引き起こすことを明らかとした。さらに、これら HRG の AhR に対する作用の乳がん悪性化への重要性を評価するために、HER2 過剰発現乳がん細胞株（HER2-5）と、ゲノム編集技術を用いてその細胞株の AhR 遺伝子をノックアウト（KO）させて樹立した AhR KO 細胞株について、がん悪性化の指標の 1 つである細胞遊走能を比較検討した。その結果、AhR KO 細胞では HRG の細胞遊走促進作用が減弱していた。細胞遊走促進因子である炎症性サイトカイン interleukin（IL）-6、IL-8 mRNA 発現誘導は、HRG 処理 HER2-5 細胞で認められるのに対し AhR KO 細胞では認められなかった。したがって、HER2 過剰発現乳がん細胞の HRG による HER2/HER3 を介した悪性化には、AhR の発現誘導と活性化を介した炎症性サイトカインの発現誘導による細胞遊走能の促進作用が関与するものと推定した。

第 2 章では、乳がんの DOX 感受性における AhR の役割を評価した。エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体および HER2 発現が陰性であるトリプルネガティブ乳がん（TNBC）の薬物治療は、抗 ER 薬や抗 HER2 薬ではなく、トポイソメラーゼ II 阻害薬 DOX 等の抗がん剤が用いられる。しかし、それら抗がん剤に抵抗性を示す場合は治療成績が非常に悪くなる。TNBC 細胞株は他のタイプの乳がん由来細胞株と比べて AhR の発現が高いことに加え、恒常的な AhR の活性化（核移行）を認めたことから、TNBC 細胞株での DOX 感受性における AhR の役割を精査することとした。TNBC である MDA-MB 231 細胞の AhR KO 細胞を樹立し、その DOX に対する感受性を親株と比較したところ、AhR KO 細胞で非常に高くなっていることを見いだした。さらに、DOX の主たる代謝酵素である aldo-keto reductase（AKR）1C3、AKR1A1、carbonyl reductase 1（CBR1）のうち、AKR1C3 のみが AhR KO 細胞でその mRNA 発現量が顕著に少なくなっていること、AhR アゴニスト処理は親株で AKR1C3 mRNA の発現を誘導するのにに対し、AhR KO 細胞ではその発現に影響を与えないこと、AKR1C3 遺伝子上流を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより AhR が転写依存的に

AKR1C3 mRNA の発現を誘導することを明らかとした。加えて、乳がん組織検体の評価からも AhR と AKR1C3 の発現が正に相関していることが確認された。これらの研究結果は、DOX 代謝の酵素である AKR1C3 の遺伝子は AhR の標的遺伝子であること、TNBC における AhR の発現増加と恒常的な活性化は、AKR1C3 の発現を増加させ DOX の代謝を亢進することで DOX 感受性を減弱させる、すなわち DOX 抵抗性に関わる可能性を新たに提示した。

本論文で示した乳がんの悪性化と抗がん剤 DOX の抵抗性に対する AhR の発現増加と活性化の重要性は、アンタゴニストやインバースアゴニスト、あるいは阻害剤を用いて AhR の受容体型転写因子としての機能を負に制御することが乳がん治療の 1 つの戦略になることを示唆するものである。したがって、この研究成果は乳がん治療開発の基盤になり得るものとして今後薬学上大きく貢献するものと考えられ、本研究の業績は高く評価できる。また、本論文の内容は、国際的学術雑誌に学術論文として既に掲載されており、国内外からも評価を受けている。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文に相応しいものと判断する。