

高悪性化乳がん細胞株におけるNIKの異常発現機構と機能解析

Aberrant expression mechanisms and functional analysis of
NIK in a highly malignant breast cancer cell line

2023年6月

林 祐介
Yusuke HAYASHI

高悪性化乳がん細胞株におけるNIKの異常発現機構と機能解析

Aberrant expression mechanisms and functional analysis of
NIK in a highly malignant breast cancer cell line

2023年6月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 細胞情報学研究

林 祐介
Yusuke HAYASHI

目次

第1章 序論	5
1.1.がん転移の学術的パラダイム.....	5
1.2.がん転移の分子機構.....	9
1.3.NF- κ B シグナル経路	13
1.4.NIK の発現制御機構と疾患における機能	16
1.5.乳がんにおける非古典的 NF- κ B 経路の役割	21
1.5.本研究の目的	23
第2章 材料と方法	26
2.1. 細胞培養	26
2.2. 過剰発現ベクターと shRNA 発現ベクターの作製.....	26
2.3. レトロウイルスの作製と安定発現株の樹立	29
2.4. ウェスタンブロットティング	30
2.5. 免疫沈降	32
2.6. Click 反応による翻訳後タンパク質の精製	33
2.7. Soft agar assay	35
2.8. Flow cytometry	35
2.9. Mammosphere assay	36
2.10. Transwell assay	36
2.11. 線維芽細胞との共培養	37
2.12. 動物実験	38
2.13. 原発巣、転移巣の組織学的解析	39
2.14. RNA 回収とリアルタイム PCR	41
2.15. RNA シークエンス(RNA-seq)解析	41
2.16. 統計処理	42
第3章 結果	43

3.1.	同所性株における非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進.....	43
3.2.	cIAP1 の翻訳低下に伴う NIK のタンパク質レベルの増加	47
3.3.	LM05 における NIK の機能解析	54
3.4.	NIK KD による炎症関連遺伝子の発現低下と線維芽細胞の誘引能低下.....	60
3.5.	ヒト乳がん検体における NIK の発現増加と cIAP1 との発現相関の検討	67
第4章	考察.....	70
4-1.	cIAP1 と NIK の翻訳・翻訳後修飾異常に伴う非古典的 NF- κ B 経路の活性化....	70
4-2.	乳がん悪性化における NIK の機能.....	74
4-3.	NIK の治療標的としての可能性.....	80
第5章	結論.....	81
第6章	参考文献.....	83
第7章	補足図と表.....	99
	謝辞.....	116

第 1 章 序論

1.1.がん転移の学術的パラダイム

がん転移(Metastasis)は、1829年に Recamier らが、腫瘍が原発巣から原発巣に隣接していない臓器に観察される病態として命名した(Talmadge and Fidler, 2010)。その後、がん転移の機序解明を目指し、現在に至るまで様々な転移研究が展開されてきた。1889年の Paget による研究では、乳がん患者 735 検体の死体解剖報告書をもとに、乳がんにおける転移巣を調べることで、高頻度で肺や肝臓の遠隔臓器に転移巣が形成されることが明らかになり、この発見から”Seed and Soil”仮説が新たに提唱された(Fidler, 2003; Paget, 1889)。“Seed and Soil”仮説は、植物の種子を様々な場所に蒔いたとき、適した土壌のみ成長できるという様子を、がん細胞(Seed)と転移巣(Soil)になぞらえた仮説である。つまり、血管やリンパ管の循環系を経て、体内へ蒔かれたがん細胞は、適した微小環境でのみ転移巣を形成することができるという仮説である。実際に、乳がん転移は肺や骨、肝臓、脳への臓器指向性があるのに対し、胃がんや大腸がん転移は肺や肝臓への臓器指向性を示すことから、それぞれのがん種において転移の起こりやすい臓器が異なっている(Valastyan and Weinberg, 2011)。現在の転移研究においても、この”Seed and Soil”仮説は転移の臓器指向性機構を考えるうえで重要な仮説となっている。また、Ewing が提唱した、Anatomical-Mechanical 仮説も転移の臓器指向性を考えるうえで重要な仮説となっている。これは、Seed and Soil 仮説の Seed にあたるがん細胞の移動は体内のリンパ液や血液循環を介するため、転移の臓器指向性は循環系・リンパ系の解剖学的位置関係に依存しているという考え方である(Langley and Fidler, 2011)。したがって、実際の転移は、どちらか一方の仮説だけで成り立つのではなく、これらの二つの仮説に基づく転移機構が複雑に絡み合っていると考えられている。

このような複雑な転移機構や臓器指向性機構を研究するためには、動物実験等によって実験的に転移を再現する必要がある。この実験的な転移モデル技術の始まりとなった先駆研究として 1915 年の Takahashi の研究が挙げられる。Takahashi は皮下移植や尾静脈移植を用いて肉腫や肺がん細胞を移植することで、実験的にマウスモデルでがん転移を初めて再現することに成功し、がん種や細胞株によって転移能が異なることが示された(Takahashi, 1915)。その後、1973 年の Fidler による研究では、尾静脈移植によって肺転移したがん細胞株を回収し、再び移植することで肺転移能が亢進することを初めて確認した。この研究結果より、がん転移は、血管内のがん細胞による塞栓といった物理的要因だけではなく、がん細胞自体の特性にも影響を受けることが示唆された(Fidler, 1973)。この Fidler の発見から、遠隔臓器へのがん転移を模倣した移植手法の確立が行われ、この移植の繰り返しによって転移能が亢進した高転移株の樹立が行われてきた。例えば、骨転移においては、1988 年に Arguello が確立した左心室移植手法を用いて(Arguello et al., 1988)、Kang や Yoneda が骨高転移株の樹立を行った(Kang et al., 2003; Yoneda et al., 2001)。

これらの移植手法を用いた高転移株の樹立が行われた後に、それぞれの高転移株の遺伝子発現解析を中心に転移機構の解明が行われてきた。1988 年の Steeg らの研究では、尾静脈移植を用いた肺高転移株と親株のノーザンブロットによる遺伝子発現比較を行うことで、特定の遺伝子の発現低下が確認され、転移機構は遺伝子によって制御されることを初めて見出した(Steeg et al., 1988)。この研究から転移機構を制御する転移制御遺伝子の探索・同定が行われてきた。2000 年代からは DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析技術の発達で転移制御遺伝子の同定を加速した。たとえば、Massagué らはヒト乳がん細胞株である MDA-MB-231 を免疫不全マウスに血中移植することで、骨、

肺、脳などの各遠隔臓器への転移能が亢進した高転移株を樹立し、高転移株の遺伝子発現解析を行った(Bos et al., 2009; Kang et al., 2003; Minn et al., 2005)。その結果、各遠隔臓器に転移する際に重要な転移制御遺伝子が同定され、それらが乳がん患者の予後不良と関連していることを報告した(Oskarsson et al., 2011; Valiente et al., 2014; Zhuang et al., 2017)。

近年、次世代シーケンサーの発達に伴い、膨大なゲノムデータやシングルセルレベルでのゲノム解析が可能となったことで、原発巣と転移巣を構成するがん細胞の比較を行い、転移巣を構成するがん細胞の由来となる原発巣のがん細胞を特定することで、転移性がん細胞の特徴を明らかにする研究が行われている(Berthelet et al., 2021; Davis et al., 2020; Hu et al., 2020; Simeonov et al., 2021)。例えば、乳がんにおいては、原発巣と転移巣におけるがん細胞の遺伝子変異のプロファイルが異なり、変異によって駆動される転移機構の存在が懸念される(Hu et al., 2020)。また、臓器ごとに単一細胞および多細胞によって形成される転移巣が存在するが(Berthelet et al., 2021)、微小転移巣において、がん細胞の発現プロファイルが原発巣と異なることから(Davis et al., 2020)、転移巣での遺伝子発現の複雑性を獲得することが、転移巣の発達に重要であるとされている(Esposito et al., 2021)。つまり、がん転移の重要な要因として、原発巣や転移巣における遺伝的多様性の拡大や、柔軟な epigenetic・phenotypic 可塑性の獲得が重要であると考えられており、これらの獲得機構を標的とすることが、新たな治療戦略に繋がると考えられている(Esposito et al., 2021)。

腫瘍・転移組織内はがん細胞のみならず、免疫細胞や血管・リンパ管内皮細胞、線維芽細胞の多彩な細胞種によって構成されている。そして、がん細胞とその周囲の実質細胞や間質細胞の細胞間相互作用が、がんの悪性化や抑制に寄与している(Celià-Terrassa and Kang, 2018; Liu and Cao, 2016)。これまで、特定の

細胞種との相互作用が主な研究対象であったが、一細胞レベルでの発現解析技術の発展に伴い、腫瘍組織内の多様な細胞種のプロファイリングが盛んに行われている(Longo et al., 2021; Wu et al., 2021)。これらの研究により、腫瘍組織内の間質細胞に対する包括的な理解に留まらず、間質細胞の細分化・機能解明、超局所部位における細胞間現象の解明を可能としている(Lavie et al., 2022; Longo et al., 2021)。また、疾患に特異的なサブポピレーションの特定によって、悪性化機構の解明や新たな治療標的の探索に繋がっている(Longo et al., 2021; Wu et al., 2021)。一方で、具体的な機能評価や経時変化は十分に行われておらず、今後の研究展開が期待されている(Ding et al., 2022; Jia et al., 2022)。

1.2.がん転移の分子機構

がん転移は、遺伝子変異などによって生じたがん細胞が原発巣から、血管やリンパ管の循環系・リンパ系を介して遠隔臓器に移動し、そこで増殖する過程を指す。この多段階にわたる過程は、原発巣の形成、血管内浸潤、循環系での生存維持、血管外浸潤、転移巣の形成に分類されている(図 1.1)。多くの先行研究から、各ステップにおいて重要な転移制御遺伝子が同定され、分子生物学的観点から、がん転移機構の分子メカニズムが明らかになりつつある(Lambert et al., 2017; Suhail et al., 2019; Valastyan and Weinberg, 2011) (図 1.1)。

がん細胞の異常増殖によって原発巣が増加すると、がん細胞が上皮細胞層と間質細胞層を区切る基底膜に接触する。基底膜はラミニンやIV型コラーゲンなどによって構成されており、がん細胞は、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を発現することで基底膜を構成しているタンパク質を分解し、基底膜を突破する(図 1.1)。また、がん細胞が間質組織を浸潤する際も、周囲に存在する細胞外マトリクスを MMP によって分解することで、転移を促進している (Gupta et al., 2007)。また、がん細胞は TGF- β /SMAD シグナルの活性化等によって、SNAI1/2 や ZEB1 などの転写因子による遺伝子の発現誘導を行うことで、上皮様の細胞形態から間葉様へと形質転換する上皮間葉転換 (EMT)を行う。EMT によって E-cadherin 発現低下に基づく細胞間接着の低下や、アクチン骨格の再構成が起きることで、がん細胞の遊走・浸潤能が亢進することが明らかになっている(Nieto et al., 2016)。さらに、遠隔臓器に転移したがん細胞は、EMT とは逆の間葉上皮転換(MET)を行うことで、細胞増殖能を回復させ、転移巣の形成を行う(Lambert et al., 2017; Nieto et al., 2016)。その一方で、EMT を誘導する SNAI1 または TWIST1 遺伝子のノックアウト(KO)や EMT 様のがん細胞の転移能が変化しないことも確認されており(Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015)、

がん転移における EMT 意義は物議が醸されている。近年、背反的な形態変化と考えられてきた上皮間葉変化には中間体が存在し、連続的な形態変化であることが示されている(McFaline-Figueroa et al., 2019)。なかでも、間葉系に近い中間形態が他の状態に比べ転移能が高いことが示唆されており(Simeonov et al., 2021)、*in vivo* 内におけるがん細胞の可塑的表現型の理解や、その機構のさらなる解明が求められている(Esposito et al., 2021)。

次に、がん細胞は、血管内皮増殖因子 (VEGF) やシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の分泌を介して、血管内皮細胞を誘引し、血管新生を亢進させることで、がん細胞の循環系への浸潤や液性因子や酸素の供給を促進している(Gupta et al., 2007; Valastyan and Weinberg, 2011)。がん細胞によって誘引された毛細血管は、血管内皮細胞同士の結合が弱く、周皮細胞による保護機能も低下していることから、がん細胞が透過しやすい構造となっている(Carmeliet and Jain, 2011)。

血管内浸潤したがん細胞は、好中球やナチュラルキラー細胞を含む免疫細胞から逃れるため、がん細胞は P/L-selectin を細胞膜上に発現させ、血小板を周りに接着させることで、免疫細胞による除去を回避している(Joyce and Pollard, 2009) (図 1.1)。

次に、循環系に存在するがん細胞が血管外浸潤を行うために、乳がん細胞は LICAM を介して血管内皮細胞に接着し、ANGPTL4 によって内皮細胞同士の接着を抑制し、血管透過性を亢進することで、血管外浸潤を促すことが明らかとなっている(Padua et al., 2008; Zhang et al., 2012)(図 1.1)。

転移巣の形成では、転移したがん細胞が生着し増殖しやすい転移ニッチ形成が重要であると考えられている(Kaplan et al., 2005; Psaila and Lyden, 2009)。たとえば、早期にがん細胞は遠位組織に転移したとしても、その組織において、がん

細胞が増殖し転移巣が形成できる環境でないと休眠状態になることが知られている(Lambert et al., 2017)。したがって、転移巣ニッチの形成はがん細胞の転移巣形成において非常に重要視されており、がん細胞から分泌されるエクソソームや多様な液性因子が、様々な細胞種と相互作用することで、がん細胞にとって生存しやすい環境を形成している(Celià-Terrassa and Kang, 2018; Lambert et al., 2017; Liu and Cao, 2016) (図 1.1)。また、がん転移の臓器指向性の分子メカニズムに着目した先行研究として、乳がん細胞から放出されるエクソソームが臓器指向性を決めているという報告がある(Hoshino et al., 2015)。エクソソームに含まれる細胞接着分子インテグリンの種類によって、エクソソーム輸送先の臓器指向性が生まれることが明らかになっており(Hoshino et al., 2015)、がん細胞由来のエクソソームは、転移したがん細胞が生存・増殖しやすい転移ニッチの形成を行うことで転移巣の形成を促進する。したがって、がん細胞から放出されるエクソソームのインテグリンパターンによって、がん転移の臓器指向性が制御されている(図 1.1)。

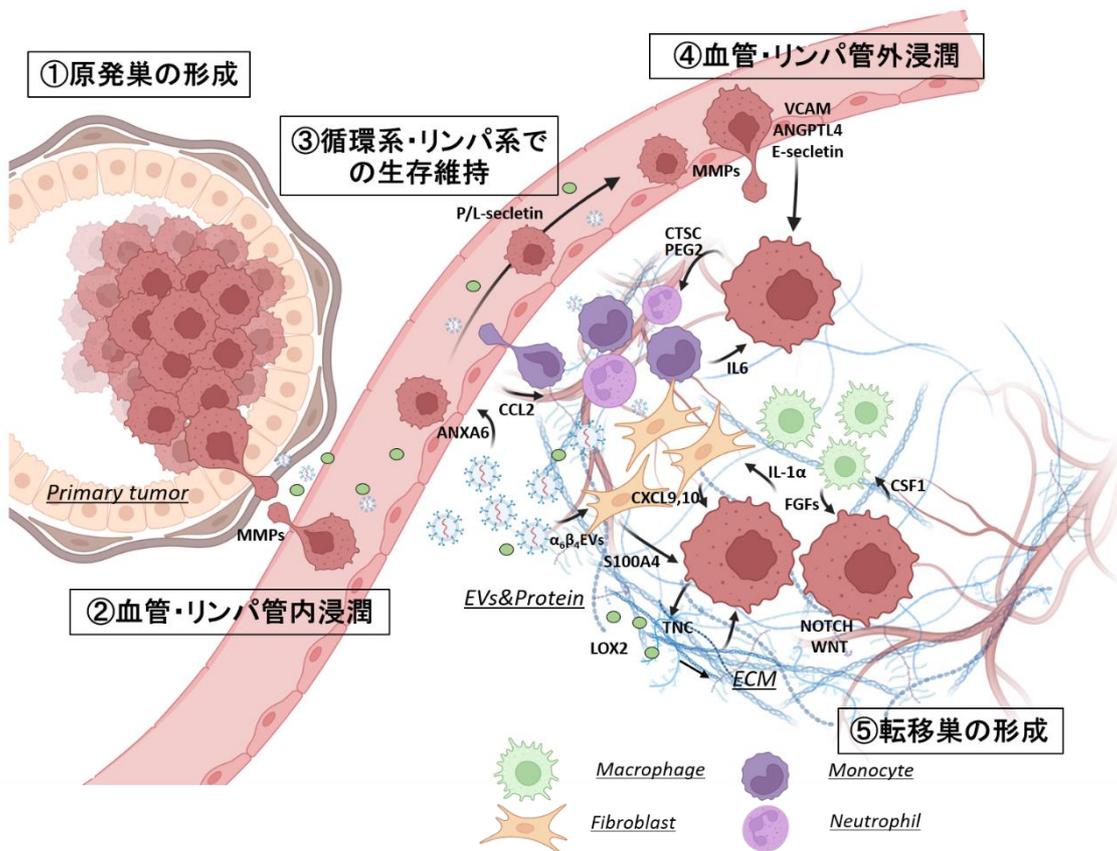


図 1.1 多段階に渡るがん転移機構と転移微小環境

がん細胞の転移過程は多段階に分かれている。遺伝子変異などによって生じたがん細胞は、無秩序な細胞増殖によって原発巣を形成し、間質組織に浸潤していくことで、血管やリンパ管を介して、循環系やリンパ系に侵入する。その後、遠隔臓器の近接する血管やリンパ管からがん細胞が浸潤し、その臓器でがん細胞が増殖することで、転移巣を形成する。この転移巣を形成する過程で、がん細胞が様々な細胞種との相互作用を通して、がん細胞が生存・増殖し易い環境を構築する。がん細胞から分泌される細胞外小胞や分泌タンパク質等が、遠近に位置する細胞に届くことで、抗腫瘍性の細胞除去や、がん細胞の増殖・生存を促進する。

1.3.NF- κ B シグナル経路

NF- κ B 経路は、NF- κ B ファミリーと呼ばれる 5 つのタンパク質 p105/p50(NF- κ B1)、p100/p52(NF- κ B2)、RelA(p65)、RelB、cRel を中心としたシグナル経路である。1986 年に、活性化 B cell の immunoglobulin κ light chain 遺伝子のエンハンサー領域に含まれる 5' GGGACTTCC 3' の塩基配列に結合するタンパク質として p50 や RelA が同定され(Sen, Baltimore, 1986)、その後、NF- κ B ファミリーはホモまたは、ヘテロ二量体を形成し、転写因子として標的遺伝子の発現を誘導することで、免疫応答や炎症、細胞死や細胞分化といった生命現象を制御する重要なシグナル経路であることが明らかになっている(Huxford, Ghosh, 2009)。NF- κ B 経路は、活性化を受けるリガンドの違いやシグナル伝達因子の違いから、古典的と非古典的の二種類の経路に分類される(Hoesel, Schmid, 2013; Huxford, Ghosh, 2009; Shostak, Chariot, 2011)(図 1.2)。

古典的経路(canonical signal)では、LPS などの細菌・微生物由来抗原、UV 刺激、TNF α などのサイトカインによって活性化され、p105/p50 と RelA を主としたシグナル経路である(Hoesel, Schmid, 2013; Huxford, Ghosh, 2009; Shostak, Chariot, 2011)。これらの刺激によって IKK α 、IKK β 、IKK γ を含む IKK 複合体が活性化することで、IKK β によって I κ B α がリン酸化され、プロテアソームによって分解される。定常状態では、I κ B ファミリーである I κ B α が p50-RelA 複合体に結合し、p50 の核内移行シグナル(NLS)をふさぐことでシグナルを不活化している。しかし、細胞に刺激が入ると、I κ B α の分解が起きることで、p50 の NLS が露出し、p50-RelA 複合体の核内移行が起きる。その後、標的遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域に存在する特定の領域に結合し、遺伝子発現を調節する(図 1.2)。

一方で、非古典的経路(non-canonical signal)は、特定の TNFSF に含まれる CD40L(TNFSF5)や RANKL(TNFSF11)、TWEAK(TNFSF12)などのリガンドによって活性化され、p100/52 と RelB を主としたシグナル経路である(Sun, 2011; Tegowski, Baldwin, 2018)。定常状態では、NF- κ B inducing kinase(NIK:MAP3K14)が、TRAF2-TRAF3-cIAP1/2 と複合体を形成しており、E3 リガーゼである cIAP1/2 によってユビキチン化修飾を受けることで、プロテアソームによって分解される(Zarnegar et al., 2008)。そのため、NIK タンパク質量や非古典経路の活性は非常に低い状態に維持されている。しかし、リガンド刺激によって、TRAF3-TRAF2-cIAP1/2 が受容体にリクルートされ、cIAP1/2 による TRAF3 の分解が起きることで、NIK が蓄積される(Vallabhapurapu et al., 2008)。リガンド依存的に cIAP1/2 の分解標的が変化する機構については明らかになっていない。そして、NIK が IKK α のリン酸化によるホモダイマーの形成を誘導し、IKK α による p100 のリン酸化を引き起こす。その後、p100 は部分分解によって p52 になり、RelB と共に核内へ移行し、標的遺伝子の発現を誘導する(図 1.2)。

それぞれの経路は完全に独立しているわけではなく、互いのシグナル伝達因子が相互作用することで、シグナルの調節を行っている。非古典的経路のメインファクターである RelB は古典的経路の標的遺伝子であることから(Bren et al., 2001)、非古典的経路の活性化には古典的経路の活性化が必要になっている。一方で、RelB は RelA とヘテロダイマーを形成することで、RelA の DNA 結合能を抑制し、双方のシグナル経路の調節を行っている(Marienfeld et al., 2003)。また、それぞれの経路の標的遺伝子には、それぞれの経路において促進的もしくは抑制的に働くシグナル構成因子が含まれるため、正や負のフィードバック機構による複雑な調節が行われていると考えられている(Tegowski, Baldwin, 2018)。

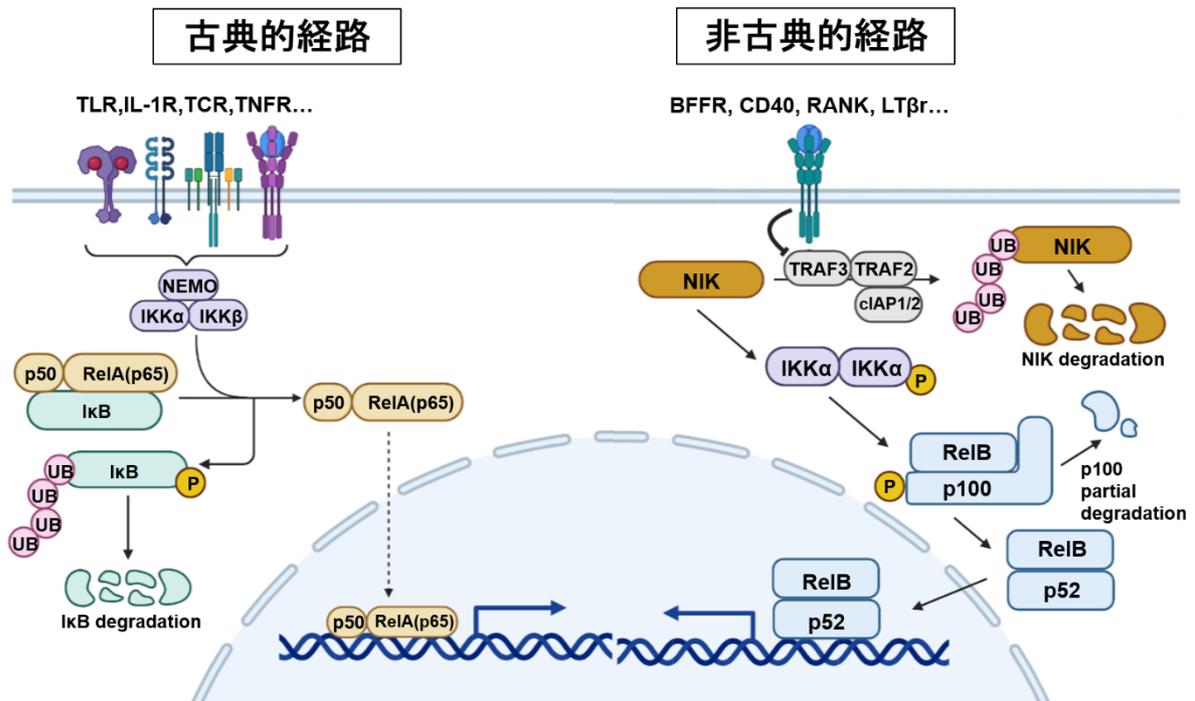


図 1.2 古典的・非古典的 NF-κB 経路の概要図

NF-κB 経路はリガンドやシグナル伝達因子の違いから、古典的・非古典的経路の二種類に分類されている。古典的経路は主に TNFα や IL-1β などの刺激による NF-κB1(p50)や RelA を介したシグナル伝達であるのに対し、非古典的経路は RANKL や TWEAK などの刺激による、NF-κB2(p52)や RelB を介したシグナル伝達である。

1.4.NIK の発現制御機構と疾患における機能

NIK は、yeast-two-hybrid 法を用いたスクリーニングによって、TRAF2 に結合する NF- κ B の転写活性化遺伝子として同定された(Malinin et al., 1997)。その後、非古典的経路の活性化に重要な kinase であること(Xiao et al., 2001)、TRAF2-TRAF3-cIAP1/2 複合体による分解機構の存在が明らかになっている(Zarnegar et al., 2008)。

NIK の発現制御機構は、前述の分解機構に加え、異なる制御機構・因子の存在が近年明らかになりつつある(Valiño-Rivas et al., 2019)。

翻訳後修飾に伴う NIK の発現制御機構として、NIK の新たな E3 リガーゼとして CHIP, DCAF2, PELI1 が同定され、これらの因子が Non-canonical NF- κ B 経路を抑制していることが示された(図 1.3)(Huang et al., 2018; Jiang et al., 2015; Liu et al., 2018)。また、NIK が Rab5⁺エンドソーム上で AKT/IKK α と複合体を形成しており、エンドソームを足場とした新たな NIK 安定化機構が、血管内皮細胞における Non-canonical NF- κ B 経路の活性化を担っていることが示された(図 1.3)(Jane-wit et al., 2015)。さらに NIK は Caspase8 による切断を受けることが明らかになった(Gehlhausen et al., 2019)。この切断によって、分解因子 (TRAF2/3,cIAP1/2) との結合部位がなくなる一方で、Kinase ドメインを保持した切断タンパク質が形成されるため、Caspase8 による切断は NIK の新たな活性化機構になると考えられている(図 1.3)(Valiño-Rivas et al., 2019)。

NIK の分子機能としては、Non-canonical NF- κ B 経路の活性化のトリガーとなる IKK α のリン酸化を引き起こすことが知られている。これに加え、NF- κ B 非依存的な NIK の機能も明らかになっている。エピジェネティック修飾に関する機能として、NIK が間接的に Histon3K9 のアセチル化や Hisotn3 のリン酸化を誘導することが示され、炎症関連遺伝子の発現亢進に寄与することが示唆され

ている(図 1.3)(Chung et al., 2011; Gye et al., 2006)。さらに、NIK の基質タンパク質について IKK α のリン酸化だけではなく、STAT3 や CREB のリン酸化を起こすことで、転写活性を促進する(図 1.3)(Nadiminty et al., 2007; Sheng et al., 2012)。また、NIK が Drp1 のリン酸化することで、ミトコンドリアへの誘引を促し、ミトコンドリアの分裂を促すと伴に、遊走能の亢進を引き起こす(図 1.3)(Jung et al., 2016)。

NIK の生理学的機能の解析は、機能欠損型変異マウスを用いた検証が、先行して行われてきた(Shinkura et al., 1999)。このマウスでは、リンパ形成不全、B 細胞や NK T 細胞の分化・機能不全等の免疫不全を示す表現型が観察され、NIK が免疫機能の恒常性維持に重要な遺伝子であることが示されている(図 1.3)(Brightbill et al., 2015; Noma et al., 2015; Shinkura et al., 1999)。また、近年、NIK の分解誘導遺伝子の KO マウスが作製され、NIK の過剰発現によって自己免疫様の表現型が観察されている(Huang et al., 2018; Liu et al., 2018)。これらの結果から、NIK の発現バランス制御が免疫機能において重要であると考えられている。

これまで免疫細胞における NIK の生理学的機能が研究されてきた一方で、近年、NIK の異常な発現変動が、腎臓・肝臓・膵臓・筋・骨組織における機能不全を引き起こすことが報告されている。

急性腎障害においては、尿細管上皮細胞自身による TWEAK 分泌によって尿細管上皮細胞の NIK タンパク質の発現上昇が確認されている(Ortiz et al., 2017; Sanz et al., 2010)。そして、この NIK 増加が非古典的 NF- κ B 経路の活性化を通して、T 細胞や線維芽細胞の誘引による尿細管間質性線維症を引き起こす(Sanz et al., 2008)。また、NIK の機能欠損型変異マウスにおいて、TWEAK 刺激によ

る腎障害症状が緩和され、死亡率の低下に繋がることが観察されている(Ortiz et al., 2017; Valino-Rivas et al., 2016) (図 1.3)。

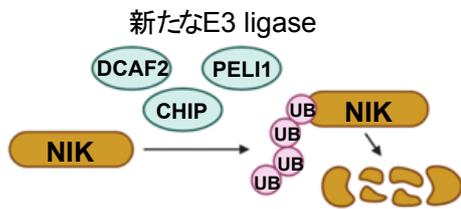
肝疾患モデルマウスや臨床検体において、肝細胞における NIK の mRNA レベルの発現上昇が観察されている(Shen et al., 2014)。この NIK の増加によって非古典的 NF- κ B 経路を介したサイトカインの発現が促進され、過度な炎症反応や酸化ストレス、マクロファージ由来の肝細胞死を引き起こす(図 1.3)(Jiang et al., 2015; Shen et al., 2014)。一方で肝細胞における NIK KO によって、肝炎や脂質合成が低下することで、高脂肪食誘導性の脂肪肝形成が抑制される(Liu et al., 2017)。また、CCl₄ 誘導性の劇性肝障害時も肝細胞において NIK が増加しており、NIK 阻害剤によって、障害性の表現型を緩和することが確認されている(Ren et al., 2017)。

糖尿病に伴う NIK の発現異常が多臓器(膵臓・肝臓・筋細胞)において生じており、協調しながら悪性を助長していることが示唆されている(図 1.3)(Valiño-Rivas et al., 2019)。遺伝性・食事性の肥満を誘導した際に膵島での NIK の上昇や非古典的 NF- κ B 経路の活性化が観察されている。そして、この活性化が β 細胞におけるインスリン分泌の機能不全を誘導する(図 1.3)(Malle et al., 2015)。また、肝細胞において NIK を過剰発現させるとグルカゴンに対する応答性が上がり、糖新生が亢進することが確認されている(図 1.3)。一方で、NIK を KO した肥満マウスにおいて、血糖値上昇や耐糖能異常を抑制できることから、肝細胞における NIK の過剰発現が糖尿病の悪性に寄与することが示唆されている(Sheng et al., 2012)。さらに、肥満患者の筋細胞において NIK の発現が上昇しており、インスリン応答によるグルコース取り込み量が低下するため、インスリン抵抗性に寄与している(図 1.3)(Choudhary et al., 2011)。

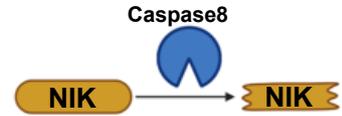
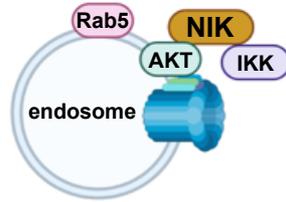
骨組織においても NIK は重要な役割を担っている。骨組織における RANKL を介した NIK・非古典的 NF- κ B 経路の活性化は破骨細胞の分化に重要である。それゆえ、NIK の機能欠損型変異マウスは大理石骨病様の表現型を促す (Zeng et al., 2015)。また、NIK の異常な発現上昇は破骨細胞の増加、骨量の低下、骨粗鬆症様の表現型を呈する (Yang et al., 2010)。したがって、NIK の発現レベル制御が骨組織の恒常性の維持に重要であると考えられている(図 1.3)(Valiño-Rivas et al., 2019)。

したがって、NIK の発現量は様々な機構を介して厳密に制御されており、特定の条件化における NIK の発現上昇が組織の恒常性維持に寄与していることが示唆されている。

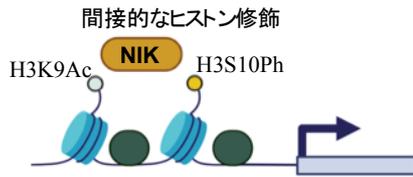
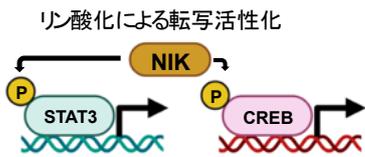
発現制御機構



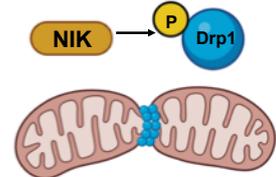
新たな安定化機構



分子機能

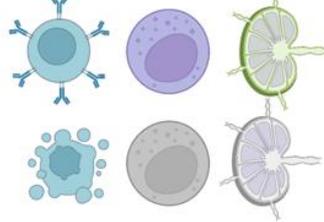


リン酸化によるミトコンドリア分解促進



生理学的機能

異常発現による免疫細胞の機能不全



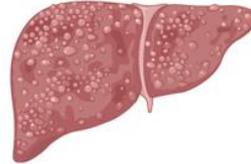
過剰発現による腎障害



過剰発現による破骨細胞の増加と骨組織の破綻



過剰発現による肝炎と線維化



発現異常による多臓器に渡るインスリン抵抗性・糖新生亢進

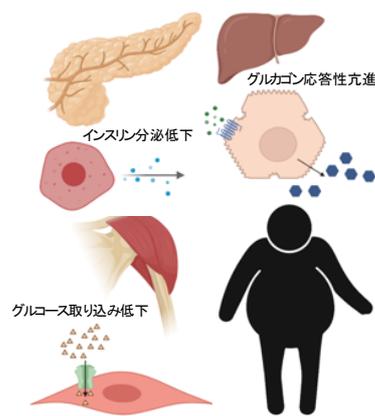


図 1.3 NIK の新規発現制御機構と機能

従来の E3 ligase である cIAP1/2 に加え、新たな E3 ligase の存在や、Rab5 陽性エンドソームや Caspase8 の部分分解による翻訳後の発現制御機構が存在する。

分子生物学的機能としては、NIK が、STAT3 や CREB のリン酸化による転写機能の活性化や、間接的にヒストンの翻訳後修飾を誘導することで免疫関連遺伝子の発現促進に寄与する。また、NIK がミトコンドリア分裂を仲介する Drp1 をリン酸化することで、Drp1 のミトコンドリアへの収束を促進し、ミトコンドリア分裂を促す。

生理機能として、NIK は免疫細胞の機能維持をはじめ、様々な臓器における機能的恒常性の維持に働いている。骨、腎臓、肝臓、膵臓、骨格筋においては NIK の過剰な発現増加に伴い糖代謝の機能不全や炎症を引き起こすことで、疾患に繋がる。免疫細胞においては、NIK の欠損によって免疫機能の低下、過剰発現によって自己免疫疾患様の症状を呈することから、発現量のバランスを取ることが重要と考えられている。

1.5.乳がんにおける非古典的 NF- κ B 経路の役割

がんと NF- κ B 経路の関係を示した発端は、1960年代の研究に遡る。カンザス州において、リンパ腫様症状を示す七面鳥から、実験的に他の鳥類に対しても同様の腫瘍病変を引き起こすウイルスが見つかり (Robinson and Twiehaus, 1974)、細網内皮系細胞における異常増殖が観察されることから、細網内皮症ウイルス (Rev-T) と名付けられた (Theilen et al., 1966)。そして、このウイルスに特徴的かつ形質転換をもたらす oncogene として v-Rel が同定された (Barth et al., 1990; Beug et al., 1981; Lewis et al., 1981)。さらに、この v-Rel が、哺乳類のイムノグロブリン遺伝子の κ B 配列に結合することが判明していた p50 を含む NF- κ B 複合体と幅広い配列類似性を有していることが示された (Ghosh et al., 1990; Kieran et al., 1990; Nolan et al., 1991; Ruben et al., 1991)。これらの研究を皮切りに NF- κ B のがんにおける機能的意義の研究が現代に渡り行われてきた (Gilmore, 1999)。

正常な乳腺上皮細胞における、NIK・非古典的 NF- κ B 経路の活性化も、前項に述べたように、厳密な制御機構によって調節されている (Fomicheva and Macara, 2020; Yamamoto et al., 2019)。また、この活性化が、乳腺小葉の形成や乳汁分泌といった、乳腺発達・機能において重要な役割を担っていることが報告されている (Cao et al., 2001; Yamamoto et al., 2019; Zhang et al., 2013)。一方で、様々ながん種において非古典的 NF- κ B 経路が恒常的に活性化することで、がん悪性化に寄与していることが報告されている (Sun, 2011; Tegowski, Baldwin, 2018)。乳がんにおいては、Luminal 乳がん細胞株に比べ、トリプルネガティブ乳がん細胞株は NIK mRNA の発現が亢進していることで、非古典的経路の恒常的活性化が誘導されており、この活性化がトリプルネガティブ乳がん細胞株の細胞増殖に寄与していることが報告されている (Yamaguchi et al., 2009;

Yamamoto et al., 2010)。そして、kinase 活性を不活化した IKK α 変異体マウスや、NIK KO マウスと、ErbB2 乳がん発症モデルの MMTV-neu マウスを交配させたトランスジェニックマウスでは、原発巣の形成遅延や縮小が確認されており(Zhang et al., 2013)、乳がんの原発巣形成においても非古典的経路の活性化が重要だと考えられる。また、乳がんにおける NIK の発現増加は、非古典的 NF- κ B 経路活性化を通して、NOTCH のリガンドである JAG1 の発現を誘導し、がん幹細胞に対して NOTCH 経路の活性化を誘導することで、がん幹細胞性の維持に働くことが報告されている(Yamamoto et al., 2013)。さらに、乳がん細胞の染色体不安定性によって生成される細胞内 DNA 断片が、cGAS-STING 経路を介して非古典的経路の活性化を誘導し、転移能を亢進していることが明らかになっている(Bakhoun et al., 2018)。以上のことから、乳がんにおける非古典的経路の活性化は、腫瘍能や転移能の亢進に寄与している。

1.5.本研究の目的

従来の転移研究における転移制御遺伝子の探索は、血中移植手法を用いた高転移株の樹立とその遺伝子発現解析から多くの転移制御遺伝子が同定されてきた。しかし、この高転移株は、がん細胞をマウスの血管内に移植する血中移植手法を用いて樹立されているため(Bos et al., 2009; Fidler, 1973; Kang et al., 2003; Minn et al., 2005)、血管内浸潤以降の転移ステップを模倣したモデルと考えられる(図 1.4)。そのため従来の転移研究では、原発巣の形成や、血管内やリンパ管内浸潤、原発巣の形成段階から行われる転移微小環境の調節に関与する転移制御遺伝子を取りこぼしている可能性が考えられた。そこで当研究室では、ヒト乳がん細胞(MDA-MB-231)をマウスの乳房部位に移植することで、より自然発生的な転移を模倣できる同所性移植手法によって新たに乳がん肺転移株を樹立した(Nakayama et al., 2017)。MDA-MB-231 が属するトリプルネガティブ乳がんでは、他の乳がんのサブタイプと比べ、肺転移の割合が高いことが報告されている(Gong et al., 2017)。それを踏まえ、本研究では、同所性移植による肺転移株を研究対象としている。この同所性乳がん肺転移株は、乳房に移植したがん細胞が原発巣を形成した後に、肺転移したものを薬剤選択によって回収し、再び移植して回収する操作を繰り返した乳がん細胞株である(図 1.4)。この細胞株は、移植する前の親株や従来の血中移植高転移株と比べ、造腫瘍能及び、転移能の亢進が確認されており、高い悪性度を示す乳がん細胞株である。また、遺伝子発現プロファイルが他の細胞株と比べ大きく異なることが明らかになっている(Nakayama et al., 2017)。しかし、これらの樹立された乳がん肺転移株の詳細な表現型や、それに寄与するシグナル経路の解析は行われていなかった。また、従来の転移制御遺伝子の探索は、樹立した高転移株の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、mRNA レベルで変化が確認された遺伝子

について着目していた(Bos et al. 2009; Kang et al. 2003; Minn et al. 2005; Nakayama et al. 2017)。そのため、mRNA レベルでは発現変化が確認できなかった遺伝子が、翻訳後修飾などによりタンパク質レベルで発現変化を受けることで、転移機構を制御する可能性が十分に検討されていなかった。

以上の問題点を踏まえ、私は、同所性肺転移株を用いて、ウェスタンブロットによるシグナル解析を行うことで、従来の実験系の性質上加味されていなかった、悪性化に寄与する遺伝子の探索および同定を行うことを目的とした(図 1.4)。

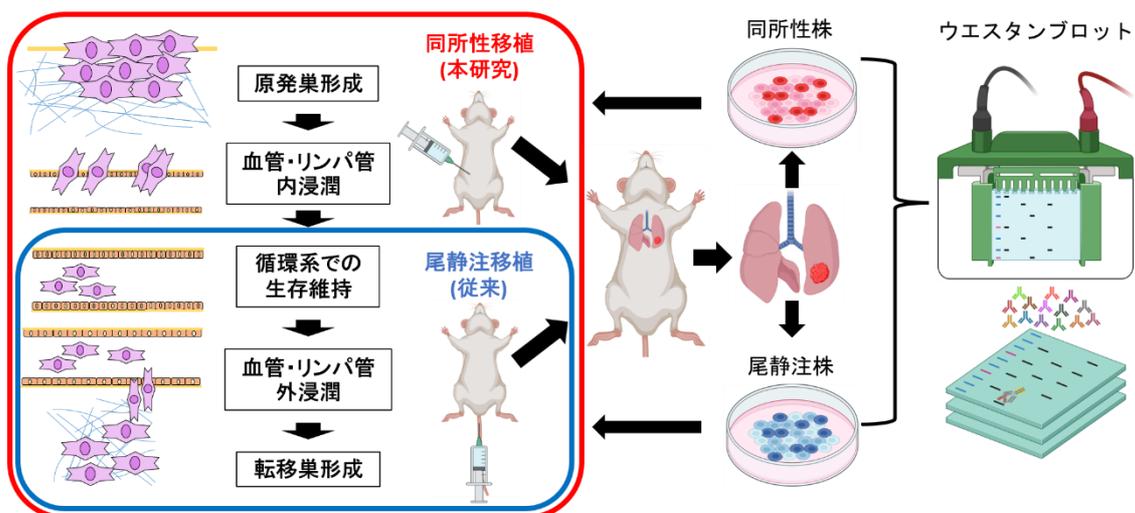


図 1.4 がんの多段階転移機構における各移植手法の関係性と本研究の実験概要

図

がんの多段階転移機構と各移植手法における模倣ステップ(左図)。血中移植は循環系での生存維持以降のステップを含むのに対し、同所性移植は原発巣形成段階から、より自然発生に近い転移機構を模倣していると考えられる。本研究では、同所性移植(Orthotopic Xenograft)と尾静脈移植(Tail Vein Injection)を用いた肺転移モデルを作成し、乳がん細胞の回収と各移植手法を繰り返す行うことで肺高転移株を作製した。そしてウェスタンブロットを用いて、各移植手法で樹立した肺高転移株と親株(MDA-MB-231)のシグナル解析を行った。

第2章 材料と方法

2.1. 細胞培養

Plat-E は、東京大学医科学研究所 北村俊雄博士より分与いただいた。また、TIG-3 細胞は、国立がん研究センター ゲノムストレス応答ユニット 塩谷文章博士より分与いただいた。これらの細胞は、10%非働化 FBS(10270106,Gibco™)、Antibiotic-Antimycotic (15240096,Gibco™)を含む DMEM(4.5g/l Glucose) with L-Gln, without Sodium Pyruvate, liquid (08459-35,ナカライテスク)を用いて、5%CO₂、37°Cの環境下にて培養した。また、MDA-MB-231- mSlc7a1-Hygromycin^R-PEF1-luc2-IRES-Blastcidin^R (以下 Parent) (Nakayama et al., 2017)や、この Parent をマウスに同所性移植したのち肺転移した同所性乳がん細胞株(以下 LM05,06,07)、Parent を尾静脈移植によって肺転移させた尾静注乳がん肺転移株 (以下 LM1-2-1) は、10%非働化 FBS、Antibiotic-Antimycotic を含む RPMI 1640 with L-Gln, liquid (30264-85,ナカライテスク)を用いて、5%CO₂、37°Cの環境下にて培養した。

2.2. 過剰発現ベクターと shRNA 発現ベクターの作製

NIK 発現ベクターとして、東京大学医科学研究所 井上純一郎教授、山本瑞生博士より分与いただいた pMXs-TAP-NIK-IRES-Puromycin(puro)^R(Yamaguchi et al., 2013)と、pmCherryC1(CLN632524,Clontech)を用いて、TAP tag を取り除き、薬剤耐性遺伝子を Neomycin に変えた pMXs-NIK-SV40^P-Neomycin(neo)^R を作製した。TAP tag を取り除くために、pMXs-TAP-NIK-IRES-puro^R を template として、表 1 に示すプライマーと Q5 High-Fidelity DNA Polymerase(M0491L,NEW ENGLAND Biolabs)を用いて Inverse PCR を行った。この PCR 産物で DH5α を形質転換させたのち、Self-ligation により pMXs-NIK-IRES-puro^R を作製した。さ

らに Puromycin 耐性遺伝子から Neomycin 耐性遺伝子に変えるため、pMXs-NIK-IRES-puro^R を Sal I (1080,TAKARA)による制限酵素処理を 37°C、3 時間行ったのち、アガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを QIAGEXII Gel Extraction kit(20021,Qiagen)を用いて回収した。pmCherryC1 を template として、表 1 に示すプライマーと Q5 High-Fidelity DNA Polymerase を用いて、SV40^P-Neomycin^R 配列を PCR により増幅した。その後、PCR 産物を Sal I による制限酵素処理を 37°C、3 時間行ったのち、アガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを QIAGEXII Gel Extraction kit によって回収した。pMXs-NIK-IRES-puro^R の Sal I 処理産物と SV40^P-neo^R 配列の Sal I 処理産物を Ligation high(LGK-101, TOYOBO) を用いて、16°C、一晩 Ligation 反応させたのち、DH5 α を形質転換させることで、pMXs-NIK- SV40^P-neo^R を作製した。この NIK の配列は Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 14 (MAP3K14)(NCBI Reference Sequence: NM_003954.5)由来である。

HA tag Ubiquitin(HA-UB)発現ベクターを作製するにあたり、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 東山繁樹教授、前川大志博士より分与いただいた pcDNA3.1-HA-UB を template として、表 1 に示すプライマーを用いて、HA-UB 領域を Q5 High-Fidelity DNA Polymerase による PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを QIAGEXII Gel Extraction kit によって回収した。その後、pMXs-Venus-IRES-puro^R の BamH I と Xho I 処理産物と HA-UB 配列を In-Fusion HD Cloning Kit(639648,Clontech)を用いて、50°C、15 分 In-fusion 反応させたのち、DH5 α を形質転換させることで、pMXs-HA-UB-IRES-puro^R を作製した。cIAP1 発現ベクター(pMMLV-BIRC2-IRES-Puro^R)は、VectorBuilder 社から購入したもの(VB211123-1472ash,VectorBuilder)を使用し、pMXs-Venus-IRES-puro^R は当研究室で所有しているものを使用した。IGF2BP1 発現ベクターは、

表 1 に示したプライマーを用いて、293T 細胞の cDNA ライブラリーから、IGF2BP1 の CDS 配列を Q5 High-Fidelity DNA Polymerase による PCR で増幅した。その後、アガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを QIAGEN Gel Extraction kit によって回収し、HA-UB 発現ベクターと同様に、pMXs-Venus-IRES-puro^R の BamH I と Xho I 処理産物と In-Fusion HD Cloning Kit を用いて In-fusion 反応させた。そして、DH5 α を形質転換させることで、pMXs-IGF2BP1-IRES-puro^R を作製した。

NIK を標的とした shRNA 発現ベクターは、東京大学医科学研究所 井上純一郎教授より供与していただいた pSUPER-shNIK-SV40^P-puro^R を用いた(Yamamoto et al., 2013)。NIK に対する shRNA の配列情報は表 2 に示す。cIAP1 を標的とした shRNA 発現ベクター作製するにあたり、pSUPER-shNIK-SV40^P-puro^R を template として、表 2.1 に示すプライマーと Q5 High-Fidelity DNA Polymerase を用いた Inverse PCR によって、shRNA を挿入する両端に Mlu I と Bgl II の制限酵素サイトを付加した pSUPER-Mlu I -Bgl II -SV40^P-puro^R を作製した。そして、この pSUPER-Mlu I -Bgl II -SV40^P-puro^R を Mlu I (1071A,TAKARA)と Bgl II (1021B,TAKARA)による制限酵素処理を 37°C、一晩行ったのち、アガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを QIAGEN Gel Extraction kit によって回収した。また、cIAP1 を標的とした shRNA 配列を決定するため siDirect(<http://sidirect2.rnai.jp/>)を用いて、cIAP1 の CDS および 3'UTR を標的としたオリゴヌクレオチドを 3 組設計した。cIAP1 に対する shRNA の配列情報は表 2.2 に示す。設計したオリゴヌクレオチドを T4 polynucleotide kinase(2021A,TAKARA)を用いて、37°C、1 時間 30 分リン酸化反応させたのち、アニーリングを行うため、99°Cから 15°Cまで 10 秒で 1°Cずつ低下させた。そして、pSUPER-Mlu I -Bgl II -SV40^P-puro^R の Mlu I と Bgl II 処理産物とアニー

リングさせた cIAP1 の shRNA 配列の二本鎖オリゴヌクレオチドを Ligation high を用いて、16°C、一晩 Ligation 反応させたのち、DH5 α を形質転換させることで、pSUPER-shcIAP1- SV40^P-puro^R を作製した。

2.3. レトロウイルスの作製と安定発現株の樹立

6well plate に Plat-E 細胞を 4×10^5 cells/well 播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養したのち、Polyethyleneimine (24765-2, Polysciences) 8 μ g と 各ベクター 2 μ g、エンベロープ発現ベクターである VSV-G(G glycoprotein of vesicular stomatitis virus) ベクター(LV500A1, System Biosciences) 0.132 μ g を血清および抗生物質不含の DMEM 200 μ l に懸濁し、各ウェルに添加しトランスフェクションを行った。5%CO₂、37°Cにて 24 時間培養したのち、通常培養で使用する DMEM 培地に交換した。そして、5%CO₂、37°Cにて 30~36 時間培養したのち、培地上清を回収し、4°C、3000rpm、5 分間遠心し、上清をウイルス溶液として-80°Cで保存した。

12 well plate にレトロウイルスを感染させる宿主細胞を 1.5×10^5 cells/well 播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養した。その後、培地を取り除き、宿主細胞の培地 245 μ L とウイルス溶液 250 μ L、800 μ g/mL Polybrene 溶液(H9268, Sigma-Aldrich)5 μ L の混合溶液を添加した。さらに、5%CO₂、37°Cにて 24 時間培養後、培地を取り除き、PBS(166-23555,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)で wash を行い、通常培養で使用する RPIM-1640 培地に交換した。その後 90%コンフルエント程度になった時点で、6well plate にスケールアップした。薬剤選択は 3 μ g/mL Puromycin(166-23153,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)を含む培地で 3 日間の培養、もしくは、1mg/mL G418(070-05183,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)を含む培地で 6 日間の培養を行った。

2.4. ウェスタンブロッティング

6 well plate に RPMI-1640 培地を 2mL/well 加え、その後、各細胞株 3.0×10^5 cells を播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養した。もしくは、12 well plate に RPMI-1640 培地を 1mL/well 加え、その後、各細胞株 2.0×10^5 cells を 6 well plate に播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養した。その後、氷上静置したうえで 4°Cの D-PBS(-)(166-23555,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)で 2 回 wash をおこない、D-PBS(-)除去後に Sampling Buffer (50mM Tris-HCl (pH6.8)(35434-34,ナカライ) 、2%SDS(586-84576,SERVA)、0.4M 2-Mercaptoethanol(138-14342,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、0.1%Bromophenol Blue(021-02911,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、10% Glycerol(17045-65,ナカライ)、5%β-メルカプトエタノール(138-14342,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation))を 180μL/well 添加することで細胞を溶解し、1.5mL チューブに集めた。その後、密閉式超音波細胞破碎装置(Bioruptor,UCD-250)を用いて、30 秒間ソニケーションと 30 秒のインターバルを計 3 分間行ったのち、95°Cで 5 分間ヒートブロック(TAITEC,DTU-N)をおこない、これを全画分 lysate とした。

細胞質や核画分 lysate を作製する際は、上記の条件と同様に細胞を播種し、wash 後に D-PBS (-)を 1mL/well 加え、セルスクレーパー(MS-93100,住友ベークライト)で細胞をはがし、1.5mL チューブに集めた。そして、4°C、4000rpm、3 分遠心後、上清を除去した後で 180μL Hypotonic Buffer (10mM HEPES-KOH(pH7.9)、1.5mM MgCl₂(133-15051,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、10mM KCl(163-03545,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail、0.15mM DTT(045-08974,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)を加え、ピペッティングをおこない、5 分おきにタッ

ピングを行い、計 15 分間水中で静置した。そして 4°C、15000rpm、3 分遠心後、120 μ L の上清と 60 μ L の 3 \times Sampling Buffer と混ぜ計 3 分間ソニケーションしたのち、95°C で 5 分間ヒートブロックをおこない、これを細胞質画分 lysate とした。さらに、残ったペレットは、もう一度 400 μ L Hypotonic Buffer でピペッティングを行い、4°C、15000rpm、3 分間遠心を行った。その後、上清を取り除き Sampling Buffer を 180 μ L 加え、vortex かけた後、計 3 分間ソニケーションおこない、95°C、5 分間ヒートブロックで加熱して、これを核画分 lysate とした。

Proteasome inhibitor を添加した lysate を回収する際には、上記の条件と同様に細胞を播種し、10 μ M MG132 (C2211-5MG, Sigma-Aldrich) を含む RPMI-1640 培地で 4 時間培養したのち、全画分 lysate と同様の方法でサンプルを回収した。また、シクロヘキシミドを添加した lysate を回収する際は、上記の条件と同様に細胞を播種し、10 μ g/mL cycloheximide (033-20993, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を含む RPMI-1640 培地で各時間培養したのち、全画分 lysate と同様の方法でサンプルを回収した。

各細胞を同所性移植したのちに形成した、腫瘍を用いた lysate を作成する際には、腫瘍を切除後、素早く冷やした D-PBS(-) に浸け、付着した体毛や血液を簡便に取り除いた。その後、ハサミを用いて細断し、ホモジェナイザー (KT8855100022, Avantar) に入れ、M-PER(78501, Thermo Fisher Scientific) を使用した腫瘍重量(mg) の 2 倍量(μ L) 加え、氷上で破砕した。その lysate を 4°C、15000rpm、5 分間遠心を行い、上清を回収後、3 \times Sampling Buffer と混合し、95°C、5 分間ヒートブロックで加熱して、これを腫瘍 lysate とした。

SDS-PAGE においては、各 lysate を 4–15% ミニプロティアン TGX™ プレキャストゲル(#4561086, BIO-RAD) を用いて、100V、1 時間 15 分電気泳動を行っ

た。トランスファーにおいては、PVDFメンブレン(IPVH00010,Millipore)をあらかじめ、メタノールで振盪5分間、MQで振盪5分間により親水化処理を行い、100V、1時間トランスファーを行った。ブロッキングにおいては、Blocking-ONE(03953-95,ナカライテスク)を用いて1時間振盪した。表3に示した希釈倍率で一次抗体を10% Blocking-ONE/0.05%TBSTに希釈して、4°C、一晩振盪させた。その後、0.05%TBSTで5分、三回washしたのち、二次抗体(Anti-mouse or Rabbit IgG, HRP-linked Antibody,NA934-1LM,NA931-1LM,Cytiva)を、0.05%TBSTを用いて1:5000希釈し、室温にて1時間振盪した。そして0.05%TBSTで5分、三回washしたのち、Western Lightning Plus-ECL(NEL105001EA,Perkin Elmer)に数分浸した後、ヨウポリ袋にメンブレンを挟み、Fusion Solo7S(SOLO.7S.EDGE,Vilber-Lourmat)で発光を検出した。撮影後、画像データを機器に付属されているアプリケーションを用いて、定量的な評価を行った。

2.5. 免疫沈降

10 cm dishにRPMI-1640培地を8mL/dish加え、その後、HA-UBを発現させた各細胞株を播種し、70%~80%コンフルエントになるまで5%CO₂、37°Cにて培養した。そして、10μM MG132を含む培地で4時間5%CO₂、37°Cにて刺激を加えた。その後、氷上静置したうえで4°CのD-PBS(-)で2回washをおこない、D-PBS(-)除去後に、TNE Buffer(20mM Tris-HCl(pH8.0)、150mM NaCl、1%NP-40(25223-75, ナカライテスク)、2mM EDTA、25mM NaF(194-01971,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、17.5mM β-glycerophosph(191-02042,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、1mM Na₃VO₄(198-09752,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail)を500μL/dish添加

することで細胞を溶解し、1.5mL チューブに集めた。その後、vortex を行い、5 分間氷中に静置した。さらに、ソニケーションを計 3 分間行ったのち、4°C、15000rpm、10 分遠心を行った。上清を新しい 1.5mL チューブに移し、その一部を 3×Sampling Buffer と混ぜたのちに、95°C で 5 分間ヒートブロックをおこない、これを Input lysate とした。残りのライセートは、BCA Protein Assay Kit(23225, Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク定量を行い、タンパク量が等量(1mg)になるように計算した lysate 量を新しい 1.5mL チューブに加えた。その後、免疫沈降を行う Sepharose ビーズに対し非特異的に結合するタンパク質を除去するため、lysate に対し 15μL ProteinA Sepharose 4 FF(17-5280-04, GE Healthcare)を加え、4°C、1 時間回転混和させたのち、4°C、5000rpm、2 分遠心を行った。そして、上清を新しい 1.5mL チューブに移し、約 140ng の NIK 抗体(#4994,CST)、もしくは、Rabbit IgG(12-370, Millipore)を加え、4°C、一晩回転混和させた。その後、20μL ProteinA Sepharose 4 FF を加え、4°C、3 時間回転混和させたのち、4°C、5000rpm、2 分遠心を行った。上清を取り除き、500μL の TNE Buffer で 5 回 wash を行った後に、50μL Sampling Buffer を加え、95°C で 5 分間ヒートブロックをおこない、4°C、5000rpm、2 分遠心を行った。最後に上清を新しい 1.5mL チューブに移し、これを IP lysate とし、ウェスタンブロットに用いた。

2.6. Click 反応による翻訳後タンパク質の精製

6 cm dish に RPMI-1640 培地を 5mL 加え、その後、各細胞株 5.0×10^5 cells を播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養した。その後、D-PBS(-)で 1 回 wash をおこない、D-PBS(-)除去後に、10%非働化 FBS、Antibiotic-Antimycotic、GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)、55 μg/mL L-cystine (039-05291, Fujifilm Wako Pure

Chemical Corporation)を含む methionine-free RPMI 1640(R7513, Sigma-Aldrich Co.)を加え、5%CO₂、37°Cにて4時間培養した。その後、この培地に 50 μmol/L L-homopropargyl glycine (L-HPG) (11785, Cayman Chemical)を加えた状態で、5%CO₂、37°Cにて24時間培養した。コントロールの細胞は、この24時間における培養を通常培養時に使用する培地にて培養した。その後、氷上静置したうえで4°CのD-PBS(-)で2回 wash をおこない、D-PBS(-)除去後に、Lysis buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.3), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail)を 300μL/dish 加えることで細胞を溶解し、1.5mL チューブに集めた。その後、vortex を行い、5分間氷中に静置した。さらに、ソニケーションを計1分間行ったのち、4°C、15000rpm、10分遠心を行った。その後、BCA Protein Assay Kit(23225, Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク定量を行い、500μg 分の各 lysate を Click-iT™ Protein Reaction Buffer Kit を用いて、4°C、一晩 click 反応を行った。その後、600μL のメタノールと 150μL のクロロホルム、400μL の MQ を加えることで、タンパク質沈殿を行い、200μL の TNE buffer を用いて再溶解した。さらに、Click 反応によってビオチン化された新生タンパク質を精製するため、20μL の Dynabeads™ M-280 Streptavidin(DB11206, VERITAS)を加え、4°C、一晩、回転攪拌した。その後、マグネットスタンドを用いて、ビーズを吸着させることで、上清を除去した。そこに新しい TNE buffer を加え、vortex と吸着による wash 操作を5回行った。最後に 50μL Sampling Buffer を加え、95°Cで5分間ヒートブロックをおこない、マグネットスタンドを用いて、ビーズを吸着させることで、lysate を回収した。これを Click reaction lysate として、ウェスタンブロットに用いた。

2.7. Soft agar assay

9.5mg/mL RPMI 粉末 (05918, 日水製薬)、10%非働化 FBS、Antibiotic-Antimycotic、GlutaMAX、0.75%炭酸水素ナトリウム (199-01301, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を含む 1×RPMI、及び 2×RPMI と、SeaPlaque GTG Agarose (50110, Lonza) を用いて 1.6% アガロース溶液を作成した。そして、アガロースの終濃度 0.6%になるように各培地とアガロース溶液を混合し、Bottom medium を作成した。また、アガロースの終濃度が 0.3%になるように、各培地とアガロース溶液を混合し、Upper medium を作製した。まず、6well plate に 1.5mL/well の Bottom medium を添加し、アガロースが固まるまで室温で静置した。その後、 4.0×10^4 cells/mL の細胞を含む Upper medium を上から 1mL/well 添加し、アガロースが固まるまで室温で静置した。5%CO₂、37°Cにて 3 週間培養したのち、4%PFA (163-20145, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を 1mL/well 添加し、室温で 1 時間固定処理を行った。そして、4%PFA を除去し、0.005%Crystal violet 染色液(V5265, Sigma-Aldrich)を 1mL/well 添加し、室温で 30 分静置した。その後、0.005%Crystal violet 染色液を除去し、MQ で一日おきに三日間、脱色処理を行った。脱色後、デジタルカメラ (D5100, Nikon) を用いて撮影を行い、Image Jを用いることで、コロニー数を計測した。

2.8. Flow cytometry

10cm dish に播種した各細胞を 0.25%Trypsin(15090-061, Gibco™)を用いて剥がしたのち、2 倍量の培地を加え、15mL チューブに回収後、1000rpm、3min 遠心した。その後、上清を除去し、PBS を加え細胞懸濁液を作成した。 1×10^6 cells になるように FACS 用チューブに分与したのち、1000rpm、3min 遠心した。その後、FACS buffer(D-PBS(-), 5%FBS, 500μM EDTA)を用いて再懸濁し、APC-CD24 抗体(311118, BioLegend)、FITC-CD44 抗体(338803, BioLegend)、コントロール

ール抗体(APC-mouse IgG(400122,BioLegend),FITC-mouse IgG(400109, BioLegend))を添加した。軽くタッピングしたのち、4°C、30分静置し、1000rpm、3min遠心処理を行った。その後、FACS bufferを用いて三回washを行い、1mLのFACS bufferでピペッティングを行った。その後、細胞懸濁液を35 μ mメッシュつきセルストレーナー(352235, CORING)に通過させた後に、S3e Cell Sorter (#1451008J1, Bio-Rad Laboratories)および、FlowJo software (v10.8, Becton Dickinson and Company)を用いて解析を行った。

2.9. Mammosphere assay

MammoCult medium (MammoCult Basal Medium, MammoCult Proliferation Supplements, 4 μ g/mL heparin(H3149, Sigma-Aldrich), 0.48 μ g/mL hydrocortisone(H0396, Sigma-Aldrich), 0.5% methylcellulose(M7027, Sigma-Aldrich)) (ST-05620, VERITAS)を作成し、そこに 1.5×10^4 cells/mLになるように、各細胞の懸濁液を混合した。その後、低吸着性24 well plateに1mLずつ添加し、5%CO₂、37°Cにて1週間培養した。その後、顕微鏡撮影(BZ-X700, Keyence)を行い、Image Jを用いて、sphere数を計測した。

2.10. Transwell assay

24well plateに培地を1mL/well加え、その後、各細胞株 1.5×10^4 cellsを播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養した。その後、Advanced RPMI1640 medium (12633012, Thermo Fisher Scientific)に培地交換を行い、5%CO₂、37°Cにて二日間培養した。その後、上部から、8 μ m トランズウェル インサート (353097, CORING)を設置し、インサート内に 1×10^4 cellsのTIG-3細胞を含む無血清培地を添加した。5%CO₂、37°Cにて12時間インキュベーションした後、インサートを4%PFA溶液に15分間漬け、固定処理を行った。さらに、

0.005%Crystal violet 染色液に 5 分間漬けることで、染色を行った。その後、インサートの上部側に付着している非遊走細胞を、綿棒を用いて擦り取った。そして、顕微鏡撮影を行い、Image J を用いて、インサートの下部へ遊走している細胞数を計測した。

2.11. 線維芽細胞との共培養

6well plate に培地を 2mL/well 加え、その後、TIG-3 細胞を 5×10^3 cells/well 播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養した。その後、上部から、0.8μm トランズウェル インサート(353090,CORING)を設置し、インサート内に 1×10^4 cells の各細胞を含む培地を添加した。5%CO₂、37°Cにて 7 日間培養した後、インサートを取り除き、ウェスタンブロットの項目に記載した方法によって lysate を回収し、ウェスタンブロットに用いた。免疫染色を行う際は、インサート除去後に D-PBS(-)で 2 回 wash をおこない、D-PBS(-)除去後に、4%PFA を 1mL/well 添加し、室温で 30 分固定処理を行った。4%PFA を除去した後、0.1% Triton X-100-PBS を 1mL/well 添加し、室温で 15 分間透過処理を行った。さらに、0.1% Triton X-100-PBS を除去した後、Blocking-ONE を 1mL/well 添加し、室温で 1 時間ブロックキング処理を行った。その後、各一次抗体(α -SMA (#19245, Cell Signaling Technology), Vimentin (V2258, Sigma-Aldrich Co.))を 0.1% Triton X-100-PBS に 1:200 の希釈倍率で希釈し、各ウェルに添加した。4°Cにて一晩静置した後、0.05%TBST で 5 分、三回 wash 処理を行った。そして、二次抗体(Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (NA931,Cytiva), Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey(NA934,Cytiva))を、0.05%TBST を用いて 1:500 希釈し、室温にて 1 時間振盪した。そして 0.05%TBST で 5 分、三回 wash したの

ち、Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen)を含む PBS を 1mL/well 添加し、室温で 30 分静置した。そして、PBS に置換後、顕微鏡撮影を行った。

2.12. 動物実験

造腫瘍能や転移能を評価するため、NOD/SCID マウス(NOD. CB-17-Prkdc^{scid}/J mice, Charles River)雌マウス(5~6 週齢)を用いて同所性異種移植を行った。具体的な手順として、各がん細胞株を D-PBS(-)で 1×10^6 cells/10 μ L に調整した後、NOD/SCID マウスをイソフルラン (099-06571, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) による呼気麻酔下にて、マウスの腹部を切開し、第 4 乳腺に各がん細胞株をマイクロシリンジ (MS-N25, 伊藤製作所) で 10 μ L 移植した。移植後、1 週間ごとにノギスを用いて原発巣の縦、横、幅の大きさを計測し、楕円体として原発巣の体積を算出した。また、*in vivo* imaging system (IVIS)(PerkinElmer)と D-Luciferin(LUCK-1G, Gold Biotechnology)を用いることで、移植したがん細胞株の発現する Luciferase による発光を非侵襲的に測定した。測定する際は、200 μ L の 15mg/mL D-Luciferin を腹腔内投与し、5 分ごとに計 20 分間特定の条件で測定を行った。そして、原発巣の体積が 300mm³ 以上になった時点で、イソフルランによる吸入麻酔下にて、原発巣を切除した。さらに、原発巣切除から 2 週間後において、*ex vivo* imaging にて肺転移巣の確認および測定を行った。肺転移巣を取り出す前に、あらかじめ D-Luciferin を腹腔内投与し、マウス体内での発光反応をさせた。その後、肺転移巣を 900 μ L D-PBS(-)の入った 12well plate に移し入れ、100 μ L D-Luciferin を添加し、発光を IVIS によって測定した。

2.13. 原発巣、転移巣の組織学的解析

切除した原発巣、肺転移巣は D-PBS (-) で wash 後、PBS を溶媒とした 4%PFA によって 4°C、2 日間固定を行った。パラフィンブロック及び切片の作成は江東微生物研究所(株)に依頼した。Tissue microarray は Biomax 社より購入した組織切片(BC081116d and BC081116e)を用いた。

HE 染色を行う場合、切片をキシレンで 5 分 2 回、100%、90%、80%、70%、50%エタノール(057-00451,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)でそれぞれ 5 分間振盪させることで、脱パラフィン処理を行った。さらに水道水に 5 分間振盪させることで、親水化処理を行った。次に、マイヤー・ヘマトキシリン (1mg/mL ヘマトキシリン(17539-92,ナカライテスク)、0.2mg/mL ヨウ素酸ナトリウム(31521-62,ナカライテスク)、50mg/mL 硫酸カリウムアルミニウム・十二水和物(010-02005,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、1mg/mL クエン酸(038-06925,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、50mg/mL 抱水クロラル(038-02162,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)) で 10 分間染色を行った。その後、水道水で一度 wash したのち、37°Cの 0.1%飽和炭酸リチウム(124-01131,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)溶液にて 5 分間振盪させることで、色出しを行った。さらに、水道水で一度 wash したのち、エオジン Y 溶液(1% eosin (056-06722,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) 、0.02% glacial acetic acid(017-00251,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation))にて 10 分間染色した。その後、素早く 90%、100%エタノールでエオジンの脱色分別を行ったのち、キシレンで 5 分 2 回、脱水処理を行った。最後に MGK-S (FK00500, 松浪硝子) とカバーガラス (C024551,松浪硝子) を用いて封入を行い、顕微鏡を用いて観察を行った。

免疫組織化学染色(IHC)を行う場合、HE 染色と同様に脱パラフィン、親水化処理を行った後、pH6.0、10mM クエン酸バッファー(クエン酸、クエン酸三ナトリウム二水和物(191-01785,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation))を用いて、抗原賦活化処理(オートクレーブで 121°C、20 分間加熱)を行った。そして、室温で 30 分以上冷ましたのちに、水道水で一度 wash した。その後、3%過酸化水素・H₂O に 30 分間振盪させ、内在性のペルオキシダーゼの不活化処理を行った。次に PBS で 5 分間の wash を 2 回行ったのち、Vector Laboratories ABC kit(PK-6200, Vector Laboratories)の Blocking 溶液を切片の上に滴下し、室温で 20 分間静置させた。その後、一次抗体反応を下記の表 4 の希釈倍率に従い、Blocking 溶液で希釈したものを切片の上に滴下し、4°Cで一晩もしくは、室温で 1 時間反応させた。その後、TBST による wash を 5 分間 3 回行った。次に、Vector Laboratories ABC kit に含まれる二次抗体溶液を用いて、室温で 30 分間二次抗体反応を行った。その後、TBST による wash を 5 分間 3 回行い、Vector Laboratories ABC kit に含まれる ABC 反応溶液を用いて、室温で 20 分間静置した。さらに、TBST による wash を 5 分間 3 回行った後、DAB Peroxidase Substrate Kit(SK-4100,Vector Laboratories)を用いた発色反応を行った。適度な発色反応が起こるまで 30 秒から 5 分間室温で静置した。その後 TBST による wash を 5 分間 1 回行い、ギル・ヘマトキシリン(25%エチレングリコール(055-00996,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)、8mg/ml ヘマトキシリン、0.2mg/mL ヨウ素酸ナトリウム、17.6mg/mL 硫酸カリウムアルミニウム・十四水和物、2%酢酸(017-00251,Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)による染色を 30 秒間行った。そして、水道水による wash を 5 分間行った。さらに、50%、70%、80%、90%、100%エタノールでそれぞれ 5 分間浸透させた後、キシレ

ンで5分2回振盪させることで、脱水化処理を行い、MGK-S とカバーガラスを用いて封入を行った。プレパラートは顕微鏡を用いて観察を行った。

2.14. RNA 回収とリアルタイム PCR

RNA を回収するため、6 well plate に 8.0×10^5 cells/well を播種し、5%CO₂、37°Cにて一晩培養したのち、QIAzol (79306,QIAGEN)を用いて細胞を溶解後、QIAzol 推奨プロトコルに従い、total RNA を抽出した。さらに、5µg total RNA と SuperScript III First-strand Synthesis System(18080085, Life Technologies)を用いて、oligo dT プライマーによる逆転写反応を行い、cDNA 製した。ΔΔCt 法によるリアルタイム PCR を行うため、cDNA 溶液を 10 倍希釈したテンプレート溶液と THUNDERBIRD SYBR qPCR mix(QPS201,TOYOBO)を用いることで、Step One Plus(Applied Biosystems)による測定を行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーは下記の表 5 に示す。

2.15. RNA シークエンス(RNA-seq)解析

前項の RNA 回収方法を用いて、各細胞の RNA を回収した後、DNBSEQ-G400 (MGI tech)を用いた RNA-seq 解析を Azenta Life Science に依頼した。シーケンスによって得られた、データ(fastq ファイル)は、Trim-Galore (v0.6.4)を用いてアダプター配列及び、低クオリティのリードを除去した。その後、HISAT2 (v2.2.0)を用いて、リード配列をリファレンス配列 GRCh38/hg38 (GENCODE)に対してマッピングし、StringTie (v2.1.2)を利用して、各遺伝子あたりのリードカウントを算出した。その後、R (v3.6.2)上において、低発現遺伝子の除去、及び edgeR を用いることで、有意な発現変動を示す遺伝子の抽出を行った。さらに、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; <https://www.gseamsigdb.org/gsea/index.jsp>) と Ingenuity Pathway Analysis (IPA;

<https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-ipa/>)を用いることで、この遺伝子群の機能的特徴を調べた。

2.16. 統計処理

本研究における Student t-test、Mann–Whitney U test、one-way ANOVA による統計処理は、Graph pad prism 7 (GraphPad Software) を用いた。

第3章 結果

3.1. 同所性株における非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進

所属研究室の中山は、ヒト乳がん細胞株である MDA-MB-231 を用いて、同所性移植、尾静脈移植のそれぞれの移植手法による肺転移株を樹立した(図 3.1A)。同所性移植によって樹立した肺転移株(以下、同所性株 : LM05)は、尾静注移植によって樹立した肺転移株(以下、尾静注株 : LM1-2-1)や親株に比べて、乳房部位における顕著な造腫瘍能の亢進が確認されている(図 3.1B)。本研究では、この表現型に寄与する遺伝子、そして、先行研究で十分な検討がなされていなかった翻訳以降の過程で発現変動を受ける遺伝子を探索するため、がん悪性化において主要なシグナル構成因子に対する、ウェスタンブロットを行った。結果より、マウスに移植する前の親株(MDA-MB-231)と比べて、NF- κ B2 (p100)の部分分解を受けた、活性型 NF- κ B2 (p52)のタンパク質量が、LM05 において、増加していた(|Log₂(Fold change)|>1) (図 1C, 表 6)。NF- κ B 経路はシグナルの活性化に伴い NF- κ B ファミリーの p50(NF- κ B1)、p52(NF- κ B2)、RelA(p65)、RelB が核内移行することが知られている(Hoesel and Schmid, 2013; Huxford and Ghosh, 2009)。そこで、NF- κ B 経路の活性評価を行うために、これらの核内移行量をウェスタンブロットによって確認した。その結果、古典的経路を構成する p50 や RelA の核内移行量に変化は観察されない一方で、非古典的経路の構成する p52 や RelB の核内移行量が同所性株において増加していた(図 1D)。また、Whole cell lysate における RelB のタンパク質量も同所性株で増加していた(図 1D)。RelB に関しては、p52 と RelB によって転写誘導されるポジティブフィードバック機構が知られており(Bren et al., 2001)、p52 の核内移行量の増加によって、同所性株における RelB の全体量が増加したと考えられる。また、RelB 自体は NLS を保持しているが、対となる NF- κ B2(p100)によつ

て核内移行が抑制されており、p100 が部分分解を受けて p52 になることで、RelB と p52 の NLS が露出し、複合体が核内移行することが報告されている (Sun, 2011)。そのため、RelB の核内移行量が増えているという結果は、p100 から p52 のプロセッシングの亢進に起因すると考えられる。以上の結果から、同所性株において、p100 から p52 への翻訳後の部分分解が促進し、非古典的 NF- κ B 経路の活性が亢進していた。

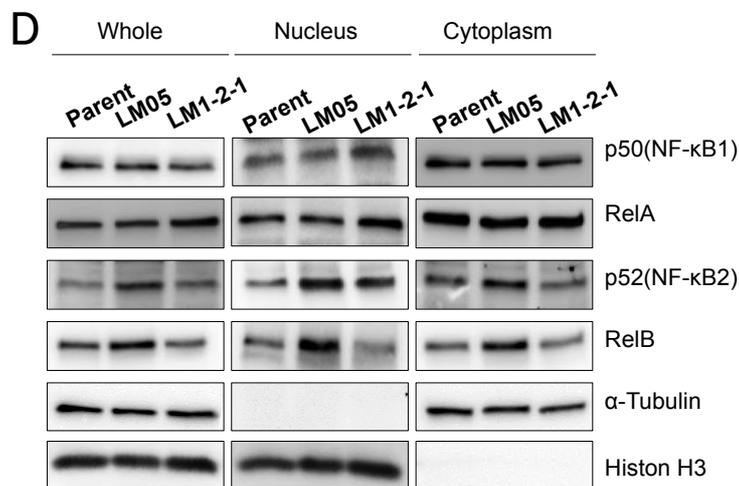
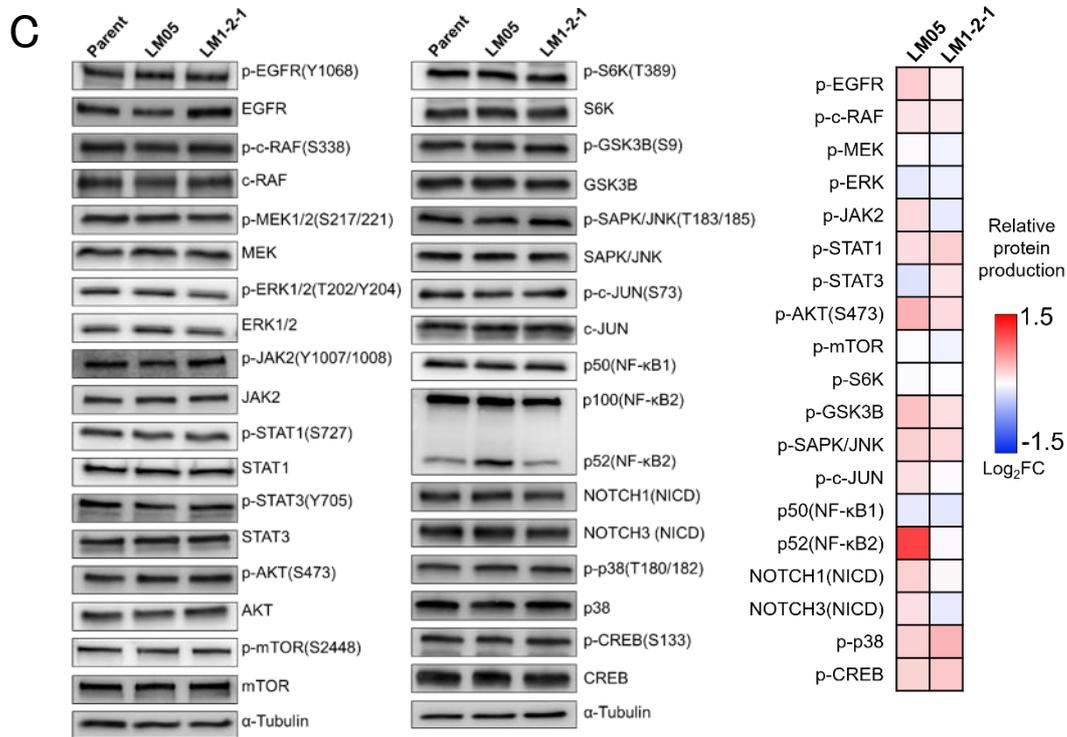
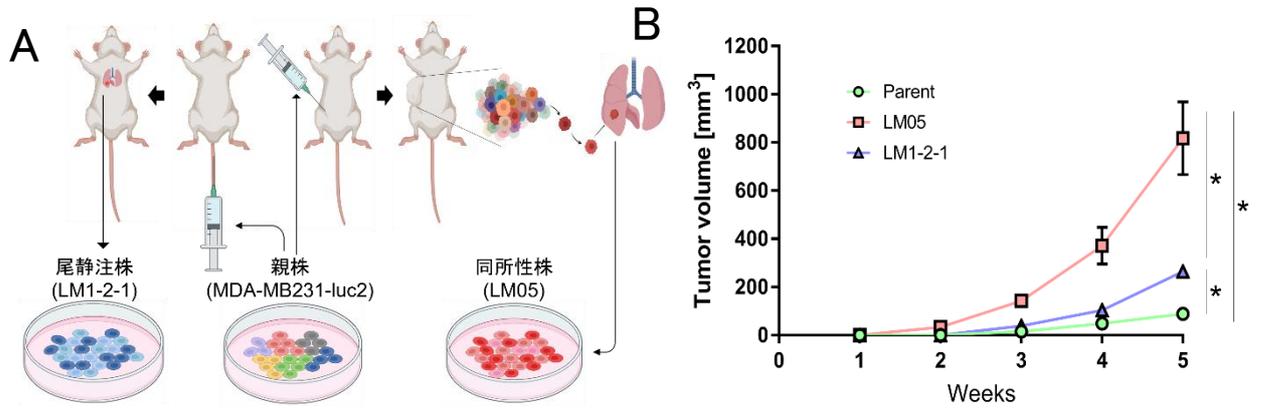


図 3.1 LM05 における非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進

A. 同所性移植と尾静脈移植を用いた *in vivo* selection 法の模式図

ルシフェラーゼを発現する MDA-MB-231 (親株) 細胞を、同所性移植または尾静脈移植により NOD-SCID マウスに移植した。その後、肺転移巣からがん細胞を回収した。これらの細胞を同じ異種移植モデルを用いて NOD-SCID マウスに再移植し、より高い転移能を持つ細胞を樹立した。

B. 同所性移植時における各細胞株の造腫瘍曲線

同所性株である LM05 の造腫瘍能が、親株や LM1-2-1 に比べ、顕著に亢進していた。

(lower, n=4 per group, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

C. 本研究で対象としたシグナル経路の構成遺伝子におけるウェスタンブロット図と定量後のヒートマップ図

各遺伝子の活性型タンパク質量を、全タンパク質(非修飾)量とコントロール遺伝子(α -tubulin)のタンパク量でノーマライズした後、親株のタンパク質量との比を Log_2 に変換した値を、ヒートマップして示した(数値データ:表 6)。LM05 において、活性型 NF- κ B2(p52) が顕著な増加($|\text{Log}_2(\text{FC})|>1$)を示した。

D. 各細胞株の全画分、核画分、細胞質画分 lysate を用いた、NF- κ B ファミリー遺伝子のウェスタンブロット図

古典的経路を構成する NF- κ B1 (p50)や RelA の核内移行量に変化がない一方で、非古典的経路を構成する活性型 NF- κ B2 (p52)や RelB の核内移行量が、LM05 細胞株において増加していた。

Hayashi et al.の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

3.2. cIAP1 の翻訳低下に伴う NIK のタンパク質レベルの増加

次に、この非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進機構を明らかにするため、上流の重要な制御因子である NF-kappa- β -inducing kinase (NIK)の発現量を評価した。通常状態では NIK は TRAF2-TRAF3-cIAP1/2 を介したプロテアソームによる非常に迅速な分解を受けるため、内在性レベルではウェスタンブロッティングによる検出はできない(図 3.2A 上)。そのため、プロテアソームインヒビターである MG132 を添加したうえで、NIK の発現量を比較した。ウェスタンブロッティングによる結果から、MG132 を添加時における NIK のタンパク質量が LM05 で増加していることが確認された(図 3.2A 上)。一方で、NIK の mRNA 量をリアルタイム PCR によって確認したところ、Parent と LM05 における NIK の mRNA 量には変化がなかった(図 3.2A 下)。したがって、NIK の翻訳後における安定性の向上が、NIK のタンパク質レベルの増加に寄与していると考えられる。さらに、腫瘍内における p52(NF- κ B2)と NIK タンパク量を評価するため、親株と同所性株を同所性移植することで形成した腫瘍から lysate を作成し、ウェスタンブロットを行った。その結果、*in vitro* の結果と同様に、同所性株において、NIK および p52(NF- κ B2)の増加が確認された(図 3.2B)。腫瘍 lysate では、プロテアソーム阻害剤を投与しない条件で、NIK のバンドが検出されているが、マウスの乳腺組織や腫瘍微小環境を構成する周辺細胞が、非古典的経路のリガンド(RNAKL,TWEAK)を発現していることから(Dwyer et al., 2021; Fata et al., 2000; Michaelson et al., 2005; Schramek et al., 2010; Yin et al., 2013)、これらの細胞からの供給によって、NIK が安定化したと考えている。

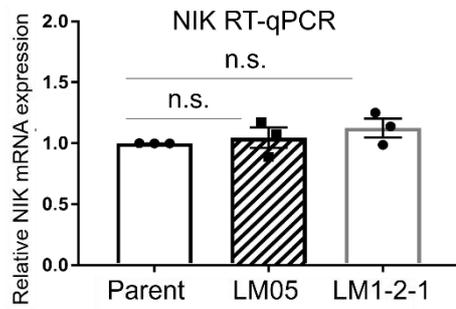
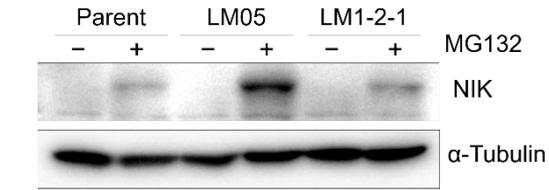
次に、免疫沈降による NIK のユビキチン修飾を評価した。HA タグ付きユビキチンを過剰発現させた細胞株を用いて実験を行った結果、LM05 における NIK のユビキチン修飾が低下していた(図 3.2C)。さらに、この NIK の分解を担

う TRAF2/3、cIAP1/2 のタンパク量を評価したところ、cIAP1 のタンパク質レベルでの低下が確認された(図 3.2D)。つまり、この cIAP1 のタンパク質レベルの減少が、NIK のユビキチン修飾の低下と安定性の上昇に寄与していると示唆される。そこで、親株において cIAP1 のノックダウンした際には、NIK タンパク質の増加が確認され(図 3.2E 左)、LM05 において cIAP1 を過剰発現させた際には、NIK タンパク質の減少が確認された(図 3.2E 右)。したがって、この細胞株においても、cIAP1 による NIK の発現制御機構が働いていることが確認された。cIAP1 をノックダウンした際も、MG132 非添加の場合は NIK が検出されない(図 3.2E 左)。このことに関しては、NIK が、ユビキチンプロテアソーム分解機構に加え、オートファージによる分解も受けるため(Qing et al., 2007)、cIAP1 ノックダウンだけでは、NIK のバンドが検出されなかった可能性や、cIAP1 ノックダウン細胞株において、cIAP1 の発現が欠失した訳ではないため、残存した cIAP1 の作用によって NIK が分解された可能性が考えられる。

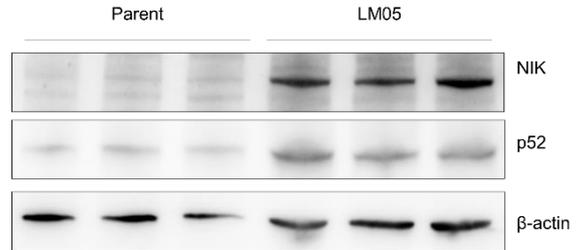
次に、cIAP1 の減少機構を明らかにするため、まず、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)を添加したうえで、タンパク質の安定性を評価した。その結果、cIAP1 の安定性の差異は見られないことから(図 2F)、翻訳量に差異が生じている可能性が考えられた。そこで、メチオニンの類縁体である L-Homopropargylglycine (L-HPG)と Click 反応を用いて、新規合成タンパク質の精製とウェスタンブロットによる cIAP1 の翻訳量を評価した。その結果、全体的な翻訳量やコントロール(α -Tubulin)の翻訳量に差異は見られない一方で(図 3.2F)、LM05 において cIAP1 の翻訳量が低下していた(図 3.2G)。これらの結果から、LM05 において cIAP1 の翻訳量の低下が、NIK の安定性と非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進に寄与していると示唆される。

また、先行研究より、cIAP1 mRNA の 5'UTR には、internal ribosome entry site(IRES)が存在するのに加え、NF45 や IGF2BP1 がこの領域に結合し、cIAP1 の翻訳を亢進することが知られている(Faye et al., 2015; Graber et al., 2010)。そこで、NF45 と IGF2BP1 の発現量を確認したところ、LM05 における IGF2BP1 の発現低下が確認された(図 3.2H)。さらに、同所性株において IGF2BP1 の過剰発現を行い、cIAP1 のタンパク量を評価したところ、cIAP1 タンパク質の微弱な増加が観察された(図 3.2I)。しかし、親株と LM05 程の差異ではないことから、LM05 における IGF2BP1 の発現低下は、cIAP1 の翻訳低下原因の一部であると考えられる。

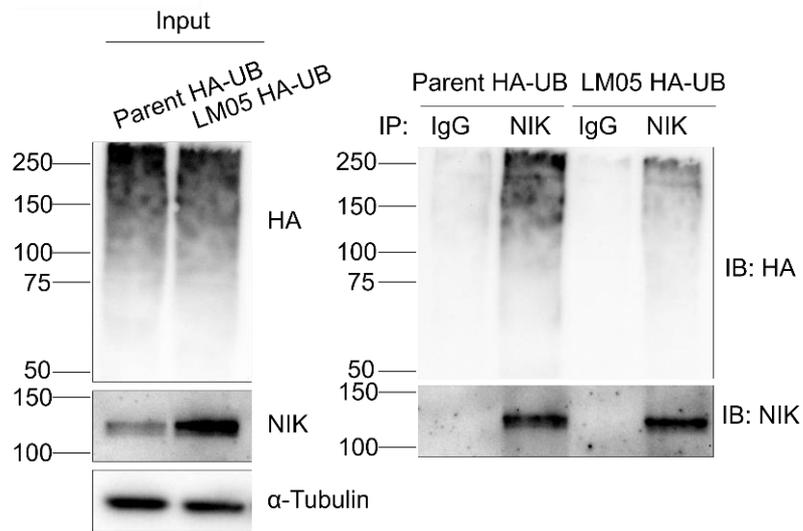
A



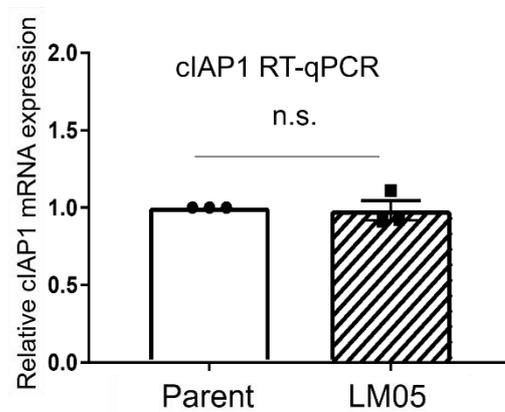
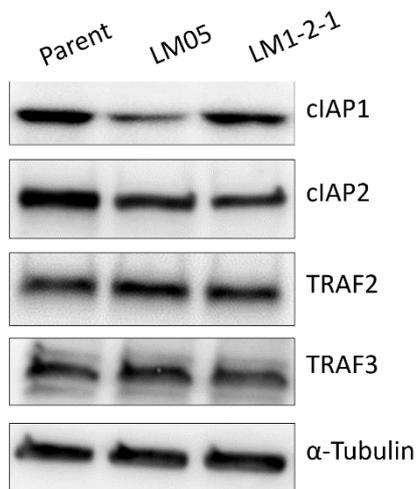
B



C



D



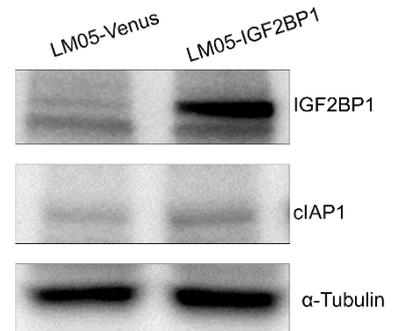
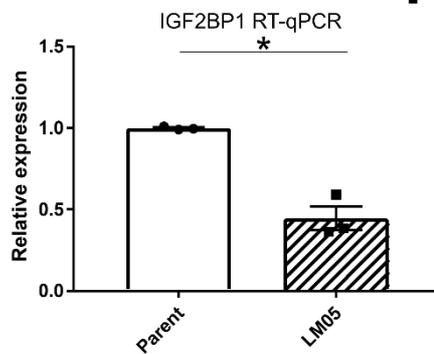
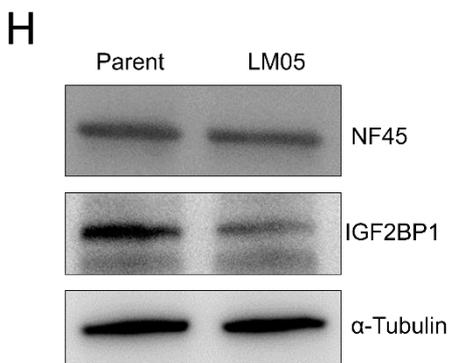
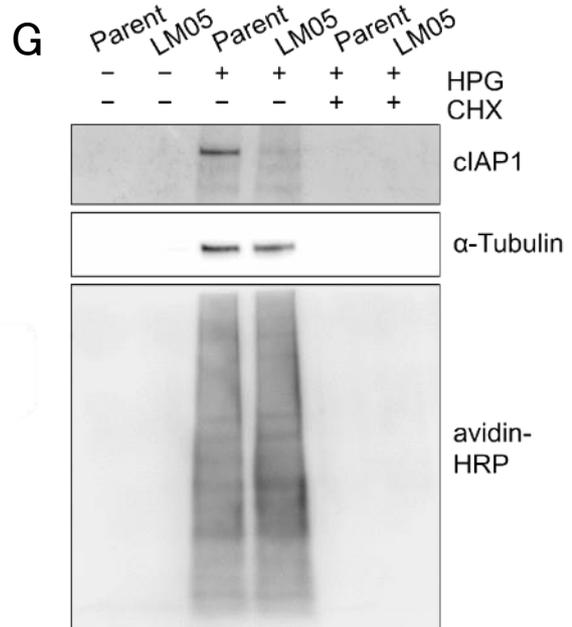
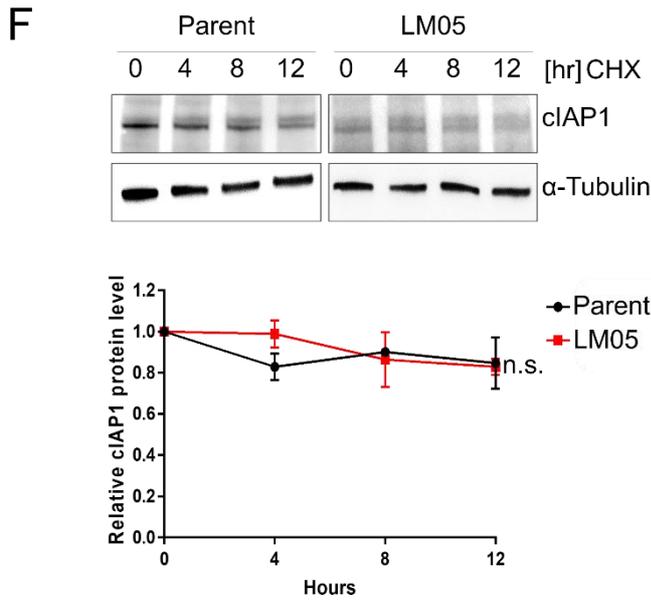
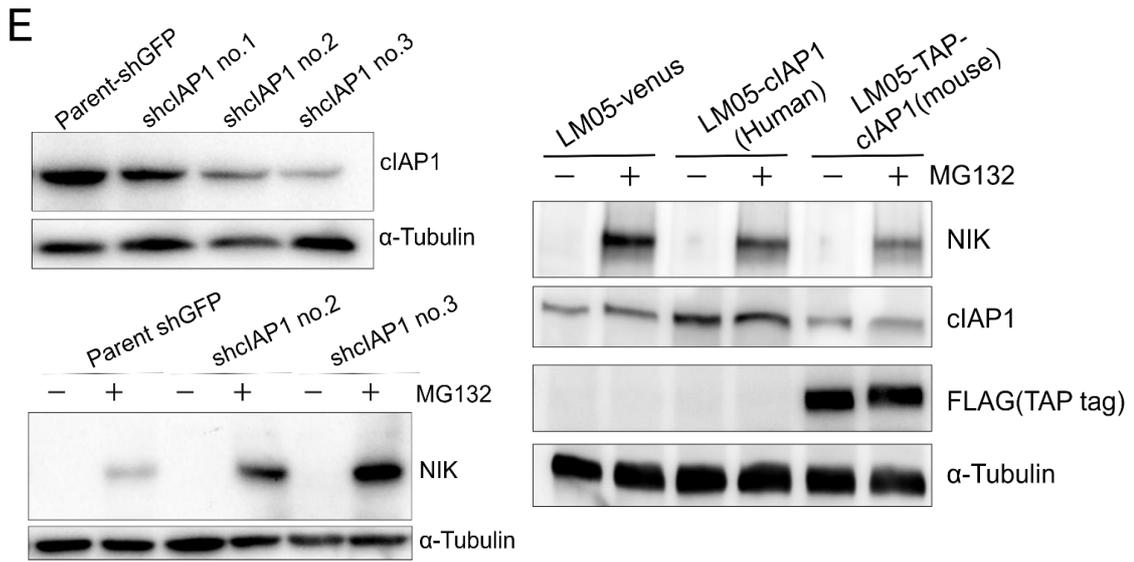


図 3.2 cIAP1 の翻訳低下に伴う NIK のタンパク質レベルの増加

A. 各細胞株における NIK のウェスタンブロット図とリアルタイム PCR による発現評価
プロテアソーム阻害剤(MG132)を添加した際に、NIK のタンパク質が検出され、親株や LM1-2-1 と比べ、LM05 において NIK タンパク質が増加していた(上図)。

その一方で、各細胞間における、NIK の mRNA 発現レベルの差異は確認されなかった(下図)。(n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

B. 親株および同所性株 LM05 の同所性移植によって形成した腫瘍 lysate を用いた、NIK と NF- κ B2 (p52)のウェスタンブロット図

各細胞株を同所性移植し、3 週間後の腫瘍から作成した腫瘍 lysate を用いて、ウェスタンブロットを行った。その結果、腫瘍内においても、LM05 細胞株における NIK の増加および、下流の活性化型 NF- κ B2 (p52)の増加が確認された。

C. HA タグ付きユビキチン(HA-UB)を過剰発現させた親株と LM05 における、NIK の免疫沈降によるユビキチン修飾評価

NIK の免疫沈降した lysate において、ユビキチンを示す HA ブロットのスミアバンドが、親株に比べ、LM05 において薄く、NIK のユビキチン修飾が LM05 において低下していた。同程度の NIK タンパク質量におけるユビキチン修飾を評価するため、実験的にあえて Parent サンプル量を多くロードした。

D. NIK の分解誘導遺伝子である cIAP1/2, TRAF2/3 のウェスタンブロット図と、リアルタイム PCR による cIAP1 発現評価

親株や LM1-2-1 と比べ、LM05 において cIAP1 タンパク質が減少していた(左図)。その一方で、両細胞間における、cIAP1 の mRNA 発現レベルの差異は確認されなかった(右図)。(n=3, Welch's t-test)

E. 親株における shRNA を用いた cIAP1 のノックダウンと、LM05 における cIAP1 の過剰発現時における NIK のウェスタンブロット図

いずれの細胞株においても、cIAP1 のノックダウンによって NIK の増加、cIAP1 の過剰発現によって NIK の発現低下が確認された。この WB で用いている cIAP1 抗体が human 特異的であることから、マウスの cIAP1 を過剰発現させた際には WB 上での発現増加が観察されなかったと考えられる。

F. シクロヘキシミド(CHX)添加時における cIAP1 のウェスタンブロット図と定量評価

各時点における cIAP1 のタンパク量をコントロール遺伝子(α -tubulin)のタンパク量でノーマライズした後、非添加時における cIAP1 のタンパク質量との比をグラフに示した。両細胞株における cIAP1 の減少度合いに差異は見られなかった。(n=3, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test)

G. メチオニンの類縁体である L-homopropargyl glycine(L-HPG)と Click 反応を用いて精製した新合成タンパク質 lysate のウェスタンブロット図

L-HPG 添加時において、click 反応によって新たに翻訳されたタンパク質にビオチンが付加されるため、avidin-HRP によるスメアバンドやコントロール遺伝子の α -Tubulin のバンドが確認でき、両細胞株における差異は見られない。その一方で cIAP1 のバンドが LM05 において減少していた。また、シクロヘキシミド(CHX)の共添加時においては、バンドが確認できないことから、翻訳されたタンパク質が精製できていると判断した。

H. 各細胞株における NF45 および IGF2BP1 のウェスタンブロット図と IGF2BP1 のリアルタイム PCR による発現評価

親株に比べ、LM05 における IGF2BP1 タンパク質量(左図)および mRNA 発現量(右図)が減少していた。(n=3, Welch's t-test)

I. LM05 における IGF2BP1 の過剰発現時における cIAP1 のウェスタンブロット図

LM05 において、IGF2BP1 を過剰発現した際、微量の cIAP1 タンパク質量の回復が観察された。

Hayashi et al.の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

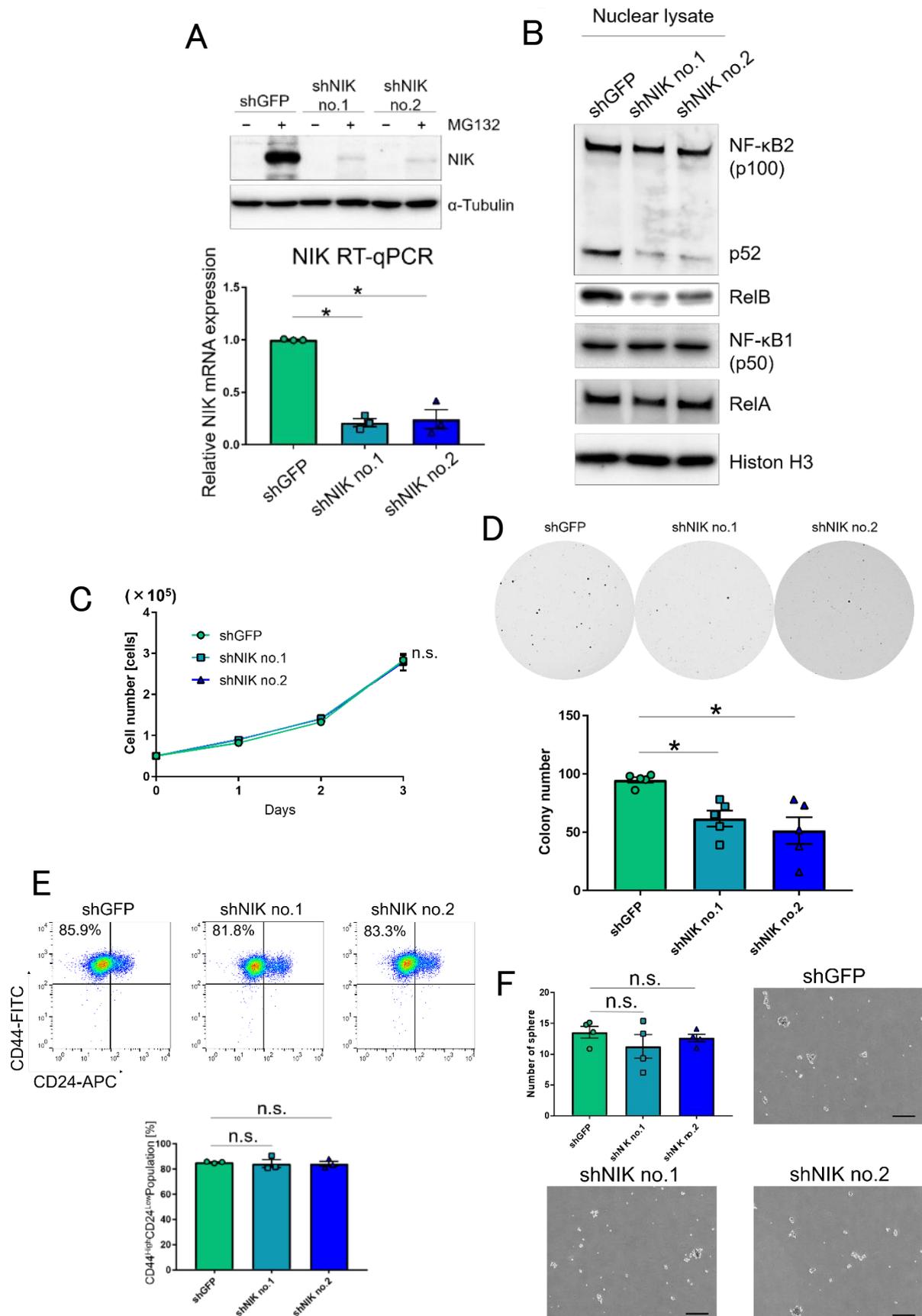
3.3. LM05 における NIK の機能解析

次に、この NIK の増加が、LM05 におけるどのような表現型に寄与しているのか明らかにするため、shRNA を用いて NIK ノックダウン(KD)細胞株(LM05-shNIK)を作製し、*in vitro* における表現型を調べた。まず、NIK ノックダウンによって、NIK の発現低下(図 3.3A)、p52 や RelB の核内移行量の低下が確認された(図 3.3B)。そして、細胞増殖能を培養プレート上及び、ソフトアガー中において評価したところ、平面培養時における細胞増殖には NIK は寄与しない一方で(図 3C)、ソフトアガー中におけるコロニー数が NIK KD によって減少した(図 3.3D)。また、NIK は NOTCH 経路や IKK α による p27/Kip1 のリン酸化を介して、乳がん細胞における幹細胞性の維持や自己複製能に寄与していることから(Yamamoto et al., 2013; Zhang et al., 2013)、Mammosphere assay と FACS を用いて、NIK の幹細胞性に対する寄与を調べた。その結果、コントロール細胞株と NIK KD 細胞株における、がん幹細胞マーカーである CD44^{high}/CD24^{low} を呈する細胞集団の割合や(図 3.3E)、スフィア形成数や(図 3.3F)に大きな差異は観察されなかった。したがって、LM05 における NIK の増加は、先行研究で提唱されているがん幹細胞性に対する機能ではなく、足場非依存的増殖な増殖に寄与していると考えられる。

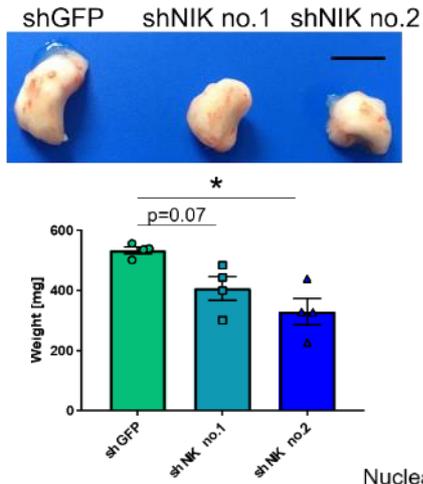
次に、NIK の造腫瘍能や肺転移能に対する影響を評価するため、NIK KD 細胞株を同所性移植し、原発巣の体積と重さ、および肺転移巣におけるがん細胞の発光量と組織切片上の転移巣の面積を評価した。その結果、NIK KD によって原発巣の経時的な腫瘍体積の低下や重さの減少が観察された(図 3.3G,H)。さらに、NIK KD 細胞株に NIK の発現を戻した NIK レスキュー細胞株を作製し(図 3.3I)、同様の評価を行ったところ、コントロールと同等ではないものの、NIK KD 細胞株と比べ、造腫瘍能の部分的な回復が確認された(図 3.3J)。次に、

この NIK KD による造腫瘍能の低下を考慮した上で肺転移能を評価するため、各原発巣の大きさが約 300mm³ の時点で原発巣を切除し、その後 2 週間後の肺転移巣を評価サンプルとした。その結果、NIK KD による肺転移巣におけるがん細胞の発光量や転移巣の面積に大きな変化は観察されなかった(図 3.3K.L)。

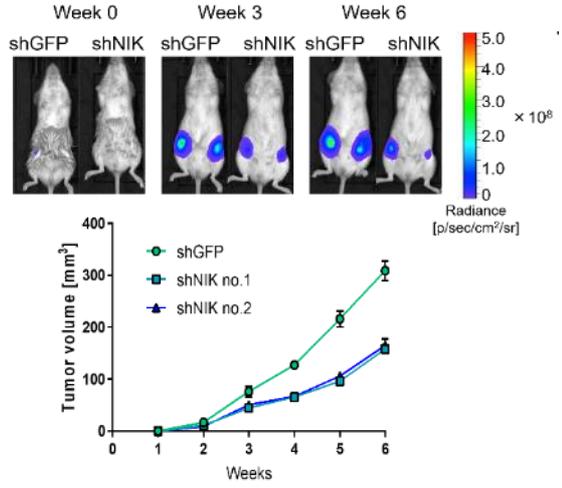
したがって、LM05 における NIK の増加は、転移能には影響せず、造腫瘍能の亢進に寄与していると考えられる。また、先行研究より、LM05 の直接的な肺転移巣形成能を尾静脈移植によって評価したところ、親株との差異は観察されていない。したがって、LM05 で上がっていた NIK が、尾静注によって評価する直接的な肺転移能には寄与していないと考えられる。



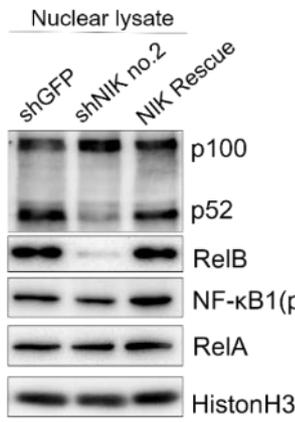
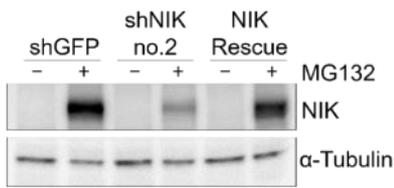
G



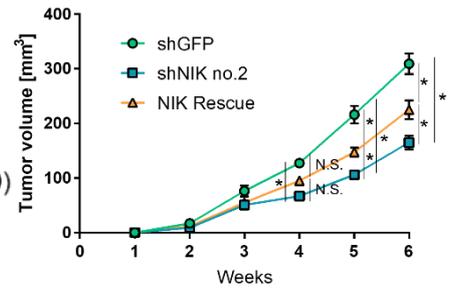
H



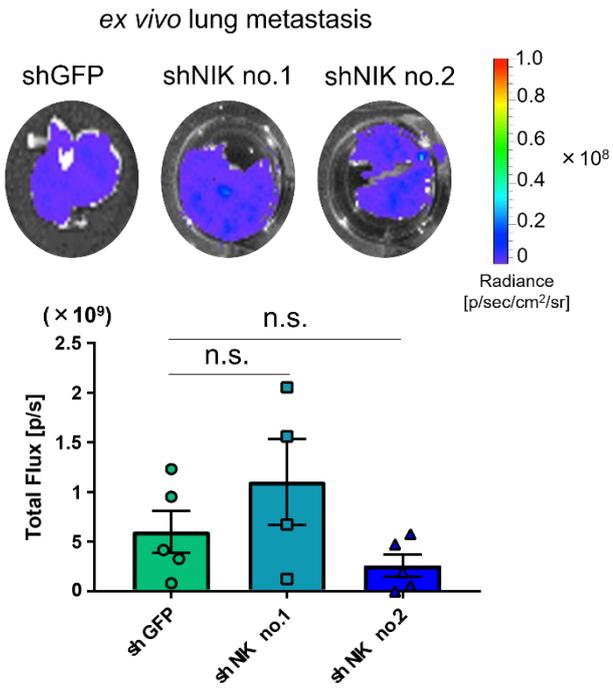
I



J



K



L

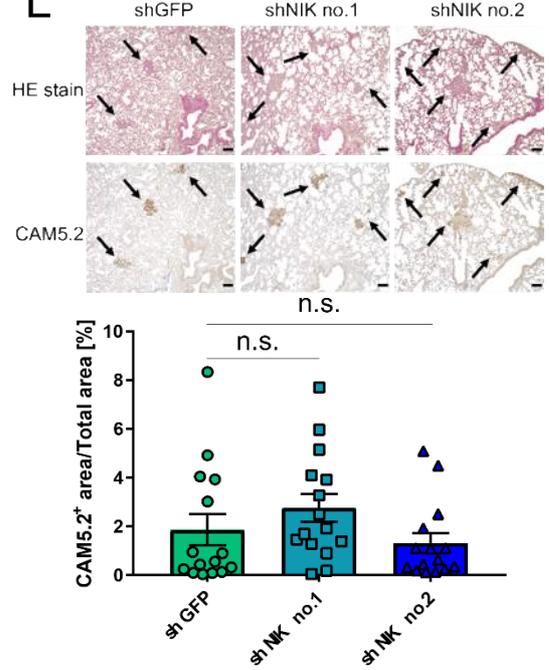


図 3.3 LM05 における NIK の機能解析

A. LM05 における shRNA を用いた NIK のノックダウン時における NIK のウェスタンブロット図とリアルタイム PCR による発現評価

NIK ノックダウン細胞株において、NIK のタンパク質および mRNA の発現が低下していた。(n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

B. NIK ノックダウン細胞株の核画分 lysate における NF-κB ファミリー遺伝子のウェスタンブロット図

NIK ノックダウンによって、非古典的経路を構成する活性型 NF-κB2 (p52)や RelB の核内移行量が低下した。

C. NIK ノックダウン細胞株の平面培養時における細胞増殖曲線

NIK をノックダウンしても通常培養条件かにおける細胞増殖に差異は見られなかった。

(n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

D. Soft agar assay における NIK ノックダウン細胞株のコロニー観察図と定量評価

NIK ノックダウンによって、soft agar 中のコロニー数が減少した。(n=5, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

E. FACS による NIK ノックダウン細胞株の CD44 と CD24 発現分布図とがん幹細胞マーカー(CD44^{high}/CD24^{low})の陽性細胞の割合評価

NIK をノックダウンしても CD44^{high}/CD24^{low} 細胞の割合に差異は見られなかった。(n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

F. Mammosphere culture assay における NIK ノックダウン細胞株の sphere 観察図と定量評価

NIK をノックダウンしても sphere 数に差異は見られなかった。bar = 500μm (n=4, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

G. 同所性移植によって形成した各細胞株の原発巣写真と質量(移植後 3 週間目)

NIK ノックダウンによって原発巣の質量が低下した。bar = 1cm (n=4, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

H. 各細胞株の同所性移植にしたマウスの IVIS イメージ図と原発巣の造腫瘍曲線

NIK ノックダウンによって、原発巣の体積の低下が確認された。(n=6, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

I. NIK ノックダウン細胞株において NIK の発現量を回復させた NIK Rescue 株と各細胞株の NIK と NF-κB ファミリー遺伝子のウェスタンブロット図

NIK 発現回復によって、非古典的経路を構成する活性型 NF-κB2 (p52)や RelB の核内移行量が回復した。

J. 各細胞株の同所性移植によって形成した原発巣の造腫瘍曲線

NIK Rescue によって、部分的な造腫瘍能の回復が確認された。(LM05-shGFP(n=6), shNIK no.2(n=6), NIK rescue(n=4), two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

K. 各細胞株の同所性移植によって形成した肺転移巣の *ex vivo* イメージング図とルシフェリンの発光量の定量評価

各原発巣の大きさが約 300mm³ の時点で原発巣を切除し、その後 2 週間後の肺転移巣を取り出し IVIS によって発光量を測定した。NIK をノックダウンしても発光量に差異は見られなかった。(LM05-shGFP (n=5), shNIK no.1 (n=4), shNIK no.2 cells (n=5) one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

L. 各細胞株の同所性移植によって形成した肺転移巣の HE 染色、CAM5.2(ヒト特異的抗ケラチン抗体)免疫染色像とその定量評価

各転移巣において、転移結節が観察された(矢印)。NIK をノックダウンしても、肺転移巣におけるがん細胞を示す CAM5.2 陽性割合(面積比)に差異は見られなかった。bar = 100μm (n=4×5 視野, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)
Hayashi et al.の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

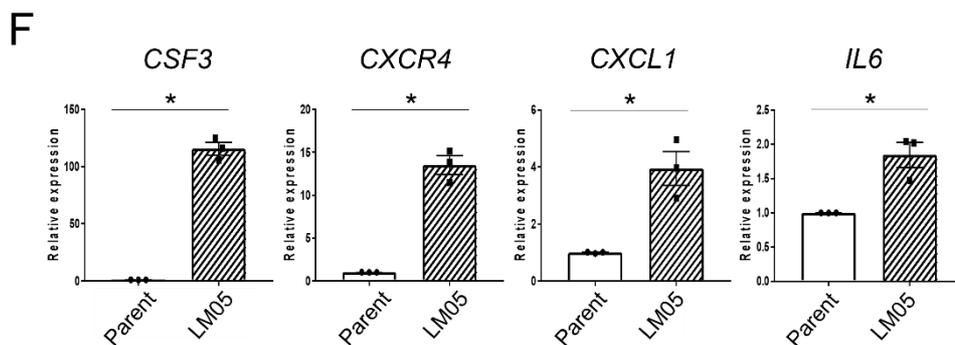
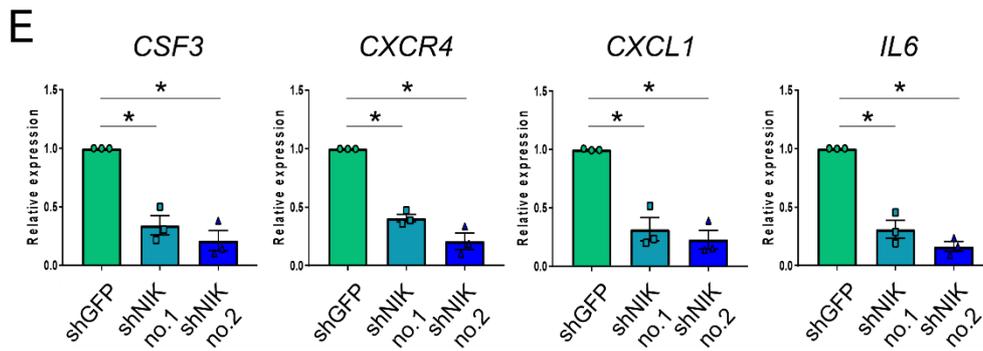
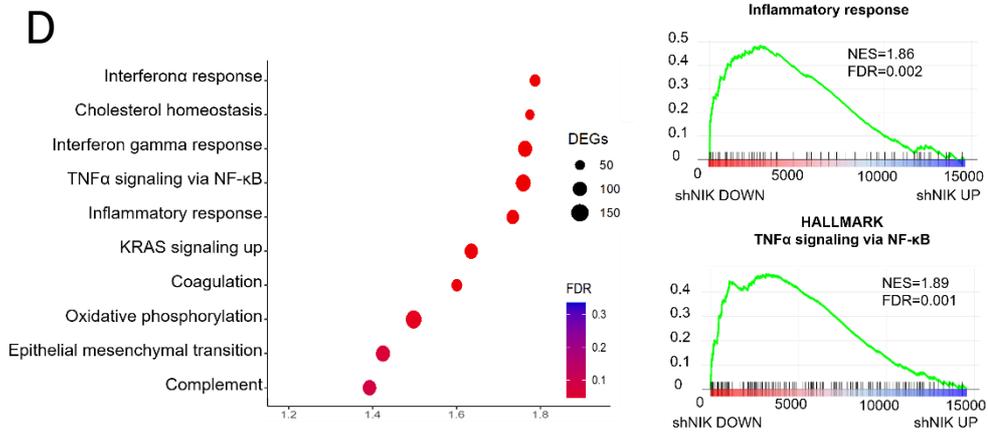
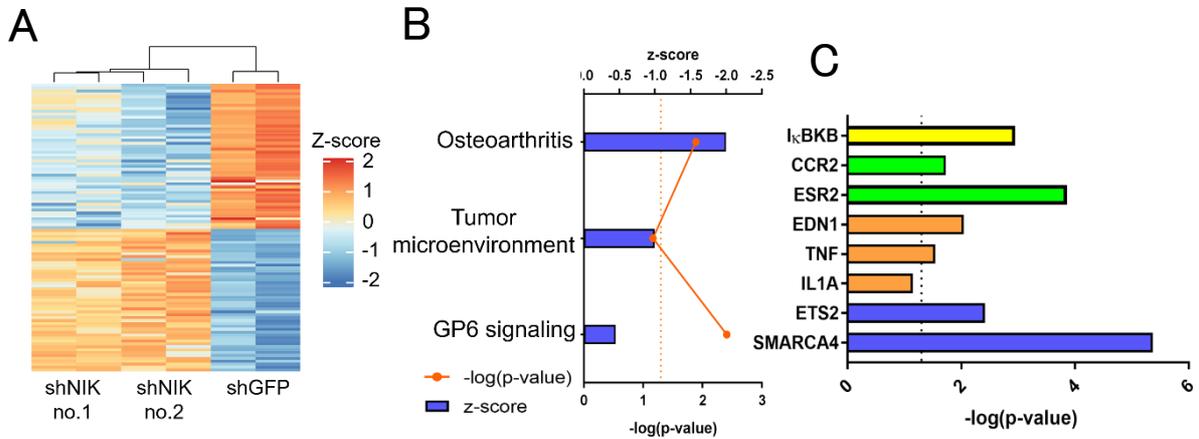
3.4. NIK KD による炎症関連遺伝子の発現低下と線維芽細胞の誘引能低下

次に、NIK KD によって確認された造腫瘍能の低下がどのような機構に基づくのか明らかにするため、コントロール細胞株と NIK KD 細胞株を用いた RNA-seq 解析を行い、NIK KD によって発現変動する遺伝子の抽出とパスウェイ解析を行った(図 3.4A,B,C,D)。RNA-seq による各サンプルの遺伝子発現データに基づき、QIAGEN 社の Ingenuity Pathway Analysis(IPA)ソフトウェアを用いて、NIK KD によって発現変動する遺伝子によってどのようなパスウェイや機能が抑制されているのか調べた。IPA は、トランスクリプトームやプロテオーム、メタボロームといった多様なオミックスデータを基に、一遺伝子とそのパスウェイや機能に対して活性化・抑制に働くかを加味した上で、評価するソフトウェアとなっている。解析結果より、活性度合いを示す z-score がマイナス(抑制)を示す経路に着目すると、NIK KD によって腫瘍微小環境や炎症性関節症に寄与するパスウェイの機能低下が推定された(図 3.4B)。また、発現低下した遺伝子群の転写制御因子や上流制御因子の推定を行い、kinase に該当するものを黄色、receptor に該当するものを緑、ligand に該当するものをオレンジ、transcription factor に該当するものを青で示した(図 3.4C)。その結果、NF- κ B 経路に関連する TNF や IL1A、I κ BKB が含まれており、発現低下した遺伝子が NF- κ B 経路によって制御を受けていると示唆される(図 3.4C)。さらに、これらのパスウェイ解析では、各パスウェイや機能に関与する遺伝子リストに基づいた推定が行われるが、発現変動している遺伝子が特定の遺伝子リストに偏っているか評価する Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を用いて同様に、NIK KD によって発現変動する遺伝子がどのような経路や機能に関与しているのか調べた。その結果、NIK KD によって発現低下する遺伝子群が、NF- κ B 経路や炎症に関連したパスウェイに偏っていることが推察された(表 7,図 3.4D)。これらの

解析結果の validation のため、代表的な炎症関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって調べた。その結果、腫瘍微小環境において重要な IL-6 や CXCL1 等の炎症性分泌因子が NIK KD によって発現低下していることが確認された(図 3.4E)。また、これらの遺伝子は親株に比べ LM05 において発現上昇していることが確認されており、NIK の増加に伴い、これらの遺伝子の発現が亢進していると考えられる(図 4F)。

さらに、RNA-seq 解析の結果を踏まえ、原発巣における細胞増殖や腫瘍微小環境の構成細胞のマーカー抗体を用いた免疫染色、死細胞を染色する TUNEL 染色を行った。その結果、細胞増殖マーカー(Ki67)陽性細胞の割合に差異は見られない一方で(図 3.4G)、死細胞(TUNEL⁺)の陽性割合の増加、腫瘍関連線維芽細胞(α -SMA⁺)や腫瘍関連マクロファージ(CD206⁺)の陽性割合が低下した(図 3.4G)。今回移植しているマウスは NOD-SCID マウスであり、成熟した T cell B cell の欠損および、NK 細胞活性低下、マクロファージや樹状細胞の機能低下が示されている(Gerling et al., 1992; Shultz et al., 1995)。NOD マウスのマクロファージは、未成熟細胞マクロファージの特徴の多くを保持しており、サイトカイン等に対する応答や抗原応答が弱い(Serreze et al., 1993)。そのため、NIK KD によって確認された腫瘍内の腫瘍関連マクロファージの減少という表現型が、最終的に造腫瘍の低下に寄与している可能性が低いと考え、線維芽細胞に着目して検討を行った。NIK KD による腫瘍関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblast: CAF)の低下原因を明らかにするため、がん細胞による線維芽細胞から CAF への転換誘導および、線維芽細胞に対する誘引能を調べた。Transwell を用いてヒト線維芽細胞と NIK KD 細胞との共培養を行い、線維芽細胞の CAF への活性化を促した。その結果、コントロール細胞(shGFP)と NIKKD 細胞における、線維芽細胞の α -SMA タンパク量に差異は見られないことから、NIK は

CAF への転換誘導に寄与していないと考えられる(図 4.4H)。一方で、ヒト線維芽細胞に対する NIK KD 細胞の誘引能を調べたところ、NIK KD によって chamber を通過する線維芽細胞が減少した(図 4.4I)。したがって、NIK KD による造腫瘍能の低下は、がん細胞の線維芽細胞に対する誘引能の低下に伴う腫瘍関連線維芽細胞の減少および、細胞死の増加に起因すると示唆される。



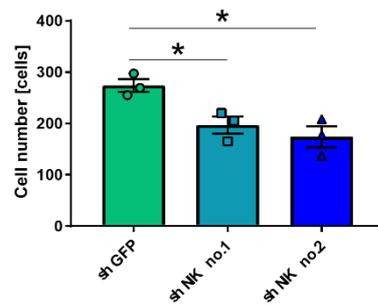
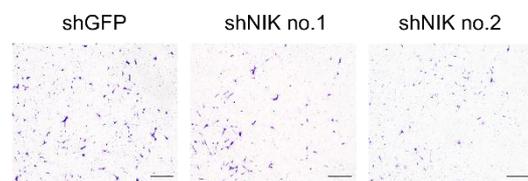
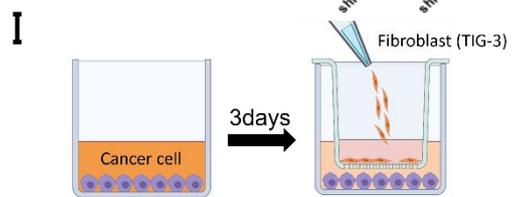
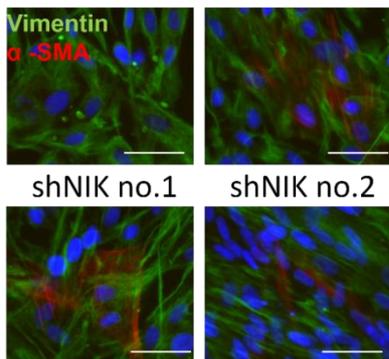
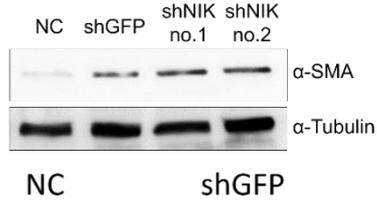
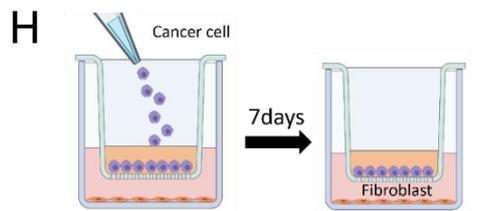
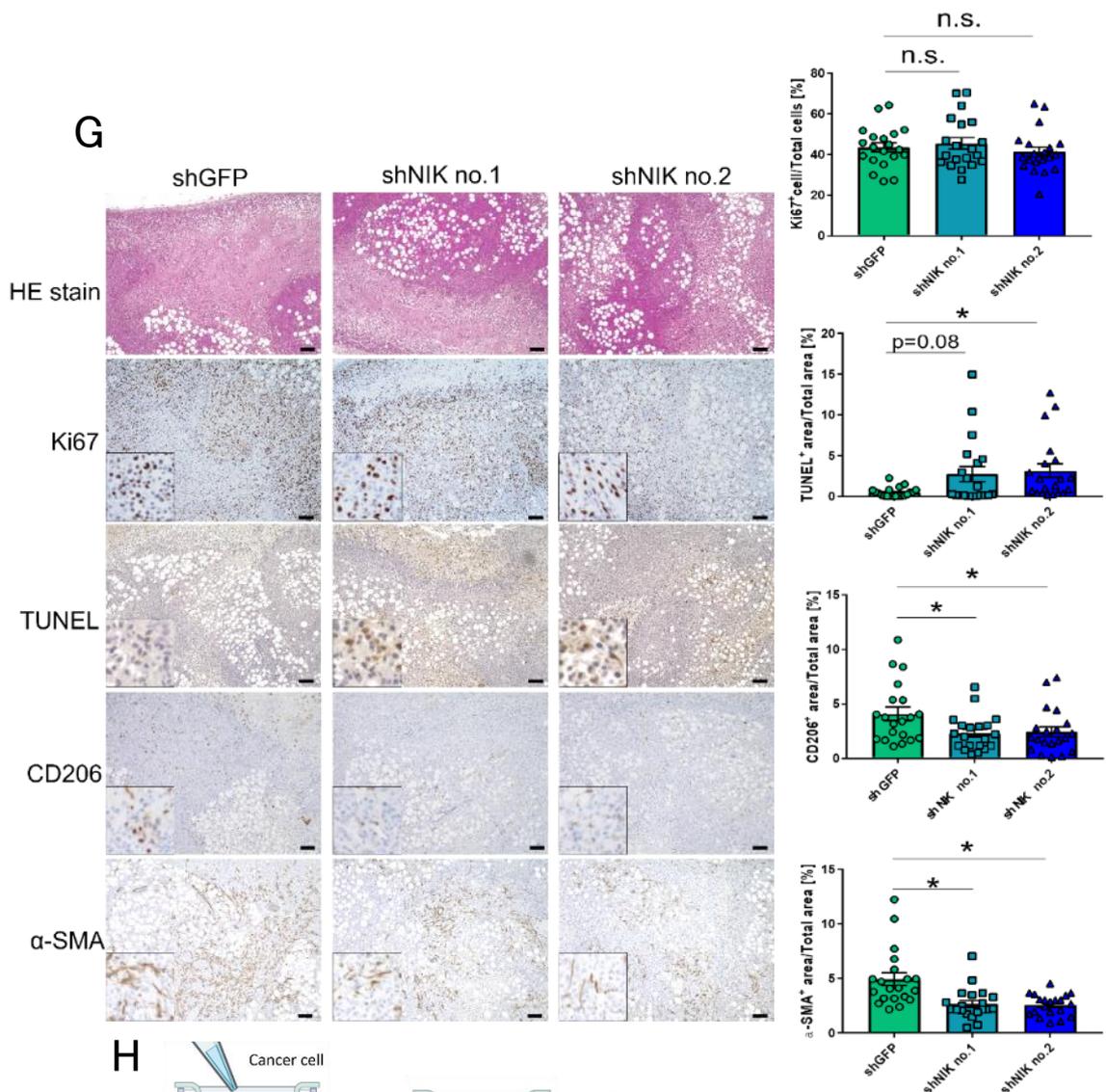


図 3.4 NIK KD による炎症関連遺伝子の発現低下と線維芽細胞の誘引能低下

A. RNA-seq 解析から、NIK KD によって有意な発現変動(FDR <0.05, |(Log₂(FC))|>1)を示した遺伝子群によるヒートマップ図

NIK ノックダウンによって発現上昇、減少を含む計 96 遺伝子が抽出された。

B. RNA-seq の発現データよる、IPA を用いたパスウェイ解析の結果

各パスウェイにおいて、活性度合いを示す z-score と -log(p-value)を示した。NIK ノックダウンによって抑制を受けるパスウェイに、腫瘍微小環境や炎症性関節症に寄与するものが含まれていた。

C. RNA-seq の発現データよる、IPA を用いた上流制御因子解析の結果

NF-κB 経路に含まれている IκBKB をはじめ、炎症関連の分泌(TNF,IL1A)タンパク質や受容体(CCR2)が含まれていた。

D. RNA-seq の発現データよる、GSEA を用いたパスウェイ解析の結果

各パスウェイにおいて、発現変動遺伝子の偏り度合いを示す NES(Normalized enrichment score)とそのパスウェイに含まれる遺伝子数を示した。NIK ノックダウンによって発現低下する遺伝子が、炎症応答の機能に関与していた。

E. NIKKD 細胞株における炎症応答と遺伝子のリアルタイム PCR の発現評価

これらの遺伝子においても NIK ノックダウンによって発現が低下した。(n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

F. 親株および LM05 における、上記の炎症関連遺伝子のリアルタイム PCR の発現評価

これらの遺伝子は、親株に比べ LM05 において発現上昇していた。(n=3, Welch's t-test)

G. 各細胞株の同所性移植によって形成した原発巣の HE 染色、TUNEL 染色(アポトーシス)、Ki67(細胞増殖マーカー)、CD206(腫瘍関連マクロファージマーカー)、α-SMA(腫瘍関連線維芽細胞マーカー)免疫染色像とその定量評価

Ki67 陽性細胞の割合に変化が見られない一方で、NIK ノックダウンによって TUNEL 染色割合の増加、CD206 陽性および α-SMA 陽性領域の割合が増加していた。bar = 100μm

(n=4×5 視野, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

H. 各がん細胞と線維芽細胞の共培養実験系のスキーム図と共培養時における線維芽細胞の α-SMA のウェスタンブロット図と免疫染色像

共培養においては、液性因子は通過できるが細胞は通過できない 0.8μm 孔のトランズウェル インサートを用いて、7日間培養を行なった。NIK をノックダウンしても、線維芽細胞における α-SMA のタンパク量に差異は見られなかった。bar = 50μm

I. 各がん細胞と線維芽細胞の共培養実験系のスキーム図とインサートの下部に遊走した細胞の撮影図とその定量評価

チャンバーの下部でがん細胞を 3 日間培養後、線維芽細胞を含むインサートを設置して、インサートの上部から下部に遊走する線維芽細胞数を評価した。NIK ノックダウンによ

て遊走した線維芽細胞数が低下した。bar = 500 μ m (n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)
Hayashi et al.の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

3.5. ヒト乳がん検体における NIK の発現増加と cIAP1 との発現相関の検討

これまで細胞レベルで検証していた NIK タンパク質の増加がヒトの乳がん悪性化と関連するのか調べるため、乳がん組織切片を用いた NIK の免疫染色を行った。その結果、NIK 陽性領域の割合が、正常組織に比べ、stage I-III といった腫瘍組織において増加していることが観察された(図 3.5A,表 8)。また、今回使用している細胞株と同じサブタイプに当たるトリプルネガティブ乳がん(TNBC)においても、NIK 陽性領域の割合が増加していた(図 3.5B)。一方で、NIK の mRNA 量に基づき、TNBC における予後解析を行った結果、高発現群と低発現群には予後の差異は見られなかった(図 3.5C)。これらの結果より、TNBC における NIK のタンパク質増加は悪性化に寄与している可能性が考えられる。

そして、これまで確認されている NIK と cIAP1 の発現関係を乳がん組織において検証するため、免疫染色による NIK と cIAP1 の発現相関性を調べた。その結果、両者の遺伝子における統計的に有意な相関性は認められなかった(図 3.5D)。その一方で、NIK と cIAP1 が発現していた組織において、72%(40/55)の組織が、NIK^{high}/cIAP1^{low} (NIK 陽性割合>10%以上 かつ cIAP1 陽性割合<10%以下)もしくは NIK^{low}/cIAP1^{high} (NIK 陽性割合<10%以下 かつ cIAP1 陽性割合>10%以上)の傾向を示した(図 3.5E,表 9)。TNBC においても、同様に、両遺伝子の統計的な相関性は認められないものの(図 3.5F)、一部のサンプル(9/17)において NIK^{high}/cIAP1^{low} もしくは、NIK^{low}/cIAP1^{high} の傾向を示した。これらの結果より、cIAP1 の減少が部分的にもヒト乳がん検体における NIK のタンパク質の増加に寄与している可能性があると考えられる。

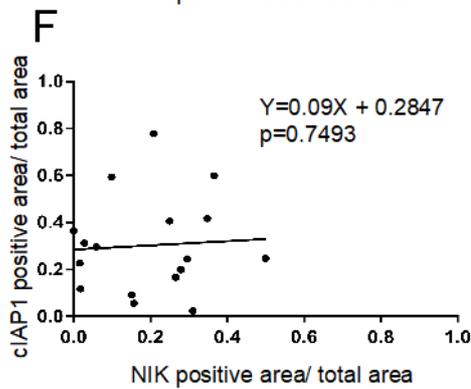
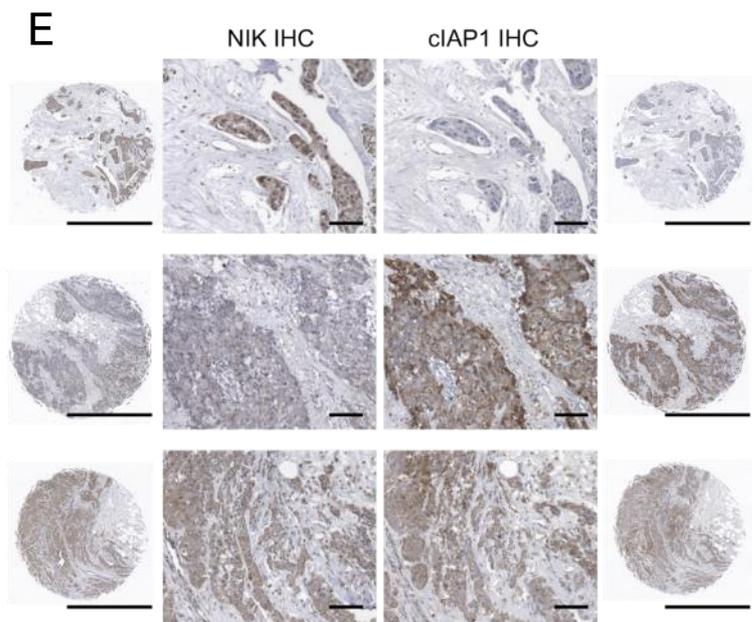
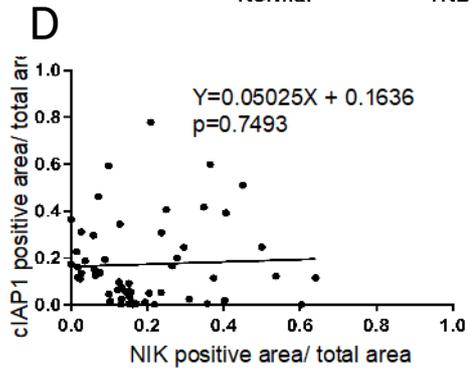
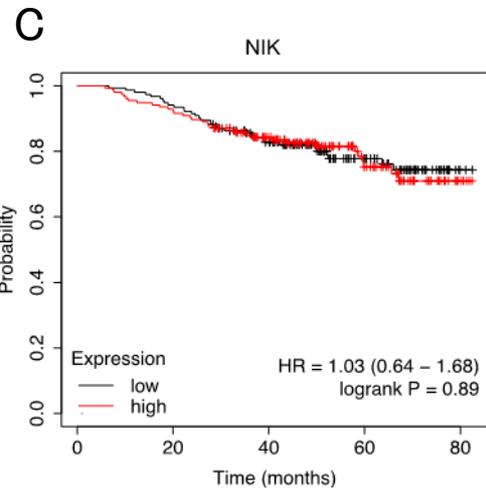
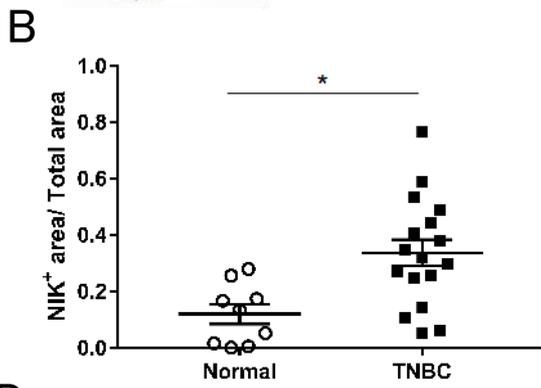
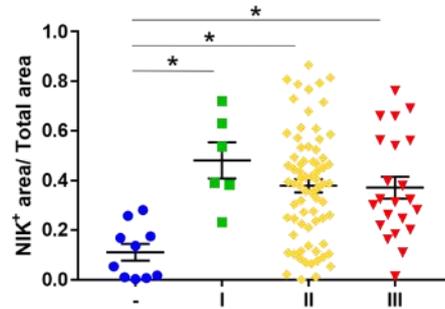
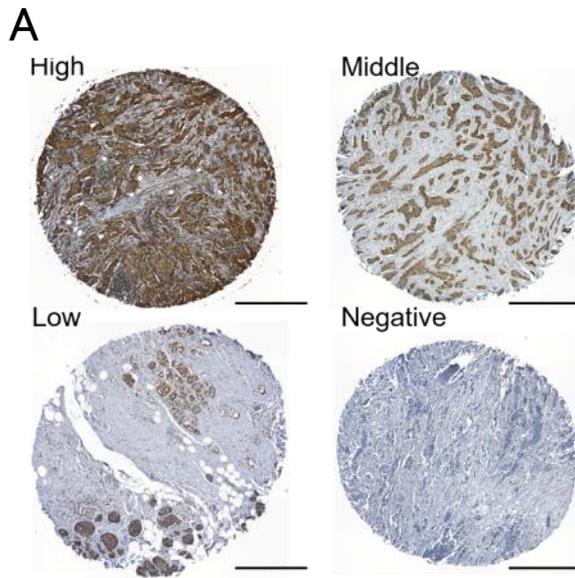


図 3.5 ヒト乳がん検体における NIK の発現増加と cIAP1 との発現相関の検討

A. 乳がん組織切片の NIK 免疫染色像とその定量評価

各検体において NIK 陽性領域が異なると共に、正常組織(-)に比べ、腫瘍組織を含む検体において NIK 陽性領域の割合が増加した。bar = 500 μ m (n=10 normal, n=6 stage I, n=72 stage II, and n=22 stage III, Ordinary one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

B. TNBC の組織切片における NIK 免疫染色の定量評価

TNBC 検体において、正常組織(-)と比べ、腫瘍組織における NIK 陽性領域の割合が増加した。(n=10 Normal, n=17 TNBC, Welch's t-test)

C. TNBC における NIK の生存解析

KM-plotter を用いて(Lánczky and Gyórfy, 2021)、TNBC における NIK の生存解析を行い、高発現群と低発現群に全生存期間(OS)に差異は見られなかった。(low: n=154, high: n=155)

D. 同一乳がん組織検体における NIK と cIAP1 の染色陽性割合の評価

片方の陽性領域の割合が 10%以上の切片を選別し、Graphpad prism7 を用いて回帰分析を行なった(回帰式、p 値)。両者の陽性領域の割合に統計的な相関関係は見られなかった。(n=55)

E. 同一乳がん組織検体の NIK と cIAP1 免疫染色像

検体によって NIK 陽性/cIAP1 陰性 (上)、NIK 陰性/cIAP1 陽性 (中)、NIK 陽性/cIAP1 陽性 (下) の染色パターンに分かれた。低倍率図 bar = 1m、高倍率図 bar = 100 μ m

F. TNBC 組織検体における NIK と cIAP1 の染色陽性割合の評価

TNBC 検体において、片方の陽性領域の割合が 10%以上の切片を選別し、Graphpad prism7 を用いて回帰分析を行なった(回帰式、p 値)。両者の陽性領域の割合に統計的な相関関係は見られなかった。(n=17)

Hayashi et al.の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

第4章 考察

4-1. cIAP1 と NIK の翻訳・翻訳後修飾異常に伴う非古典的 NF- κ B 経路の活性化

ウェスタンブロットによるシグナル解析から、同所性肺転移株 LM05 において非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進が確認された(図 3.1)。さらに、この活性亢進は、cIAP1 の翻訳低下に伴う NIK のユビキチン修飾低下による NIK の安定性向上に起因していると示唆された(図 3.2)。先行研究では、乳がん細胞株だけでなく多発性骨髄腫細胞株においても非古典的経路の恒常的活性化が報告されている(Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2007; Yamaguchi et al., 2009)。それらの報告によれば、Basal like や Claudin-low サブタイプの乳がん細胞株では、エピジェネティックな発現制御異常による NIK の mRNA 量の増加が、非古典的経路の恒常的な活性化に寄与している(Yamaguchi et al., 2009; Yamamoto et al., 2010)。また、特定の多発性骨髄腫細胞株においては、cIAP1/2 や TRAF2/3 の遺伝子欠損に伴い、NIK タンパク質が増加することにより、非古典的経路が過剰に活性化している(Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2007)。これらに対して、本研究で明らかになった cIAP1 の翻訳低下に伴う NIK タンパク質の増加機構は、先行研究の活性化原因とは異なると考えられる。

本研究結果より、LM05 における cIAP1 の翻訳減少が確認されたが、その減少機構は依然として明らかになっていない。cIAP1 遺伝子は約 1.4kb と長い 5'UTR 領域を有しており、この 5'UTR には internal ribosome entry site(IRES)が存在する。細胞種や状況によって異なるものの、NF45 や IGF2BP1 が IRES に結合し、cIAP1 の翻訳を亢進することが知られている(Faye et al., 2015; Graber et al., 2010)。そこで、親株と LM05 における NF45 と IGF2BP1 の発現量を確認したところ、同所性株における IGF2BP1 の発現低下が確認された(図 3.2G)。しかしながら、同所性株において IGF2BP1 の過剰発現を行い、cIAP1 のタンパク量

を評価したところ、cIAP1 タンパク質量の増加が微小だったことから (図 3.2H)、LM05 における cIAP1 の翻訳低下は、IGF2BP1 以外の因子も介していると考えられる。

先行研究では、同所性移植によって樹立した肺転移株 LM05 に加え、同様の方法を用いて樹立した LM06,07 亜株が存在する。これらの細胞においても同様に非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進が見られるか、NF- κ B2(p52)の核内移行量を評価したところ、非古典的経路の活性化が誘導されているのは同所性肺高転移株の中でも、LM05 のみに確認された現象であった。様々な先行研究から、原発巣形成後期に生じる腫瘍内の遺伝的不均一なサブクローンの中から、実際に転移したがん細胞の遺伝子変異や発現が、同じ原発巣と転移巣であっても、患者ごとに異なることが報告されている(Hu et al., 2020)。また、*in vivo selection* を用いた先行研究において、同一細胞株由来の同じ臓器に対する転移細胞株 (肺転移細胞株) でも、転移能の活性化機構が異なることが示唆される(Minn et al., 2005)。この理由として、肺転移は、ほかの転移巣と比べ、複数クローンの転移が起こりやすいとされていることから(Berthelet et al., 2021)、肺転移巣におけるがん細胞や、転移に至る機構の多様性が高い可能性がある。そのため、同所性株同士の活性化シグナルに差異が生じたと考えている。肺転移特異的に、多クローンの転移が起こる原因は明らかになっていない。しかし、転移する際に、循環系中に存在するがん細胞が、複数細胞のクラスターを形成することで、液性因子を介した相互作用をしやすくしたり(Wrenn et al., 2020)、低酸素状態を誘導することで(Donato et al., 2020)、がん細胞の転移を促進することが報告されている。

悪性化機構の解明を目指した研究方針として、複数の細胞株に共通した遺伝子に着目する研究も行われている。そのため、本研究で着目した NIK が、全て

の乳がんや TNBC において共通の悪性化機構とは言えず、その悪性化への寄与は限定的であると考えられる。また、現状の細胞レベルの検証結果からも、NIK の増加は、がん悪性化の一般的な現象とは言い難いと考えられる。今後は、様々な TNBC 細胞株の NIK KD による表現型の検証や、同所性肺転移株の種類を増やし、NIK 発現量を評価することで、現象と意義の一般性を検証して行く必要がある。NIK の治療標的の有効性は、副作用の面も含めて、現段階では判断できないが、臨床検体においても NIK の発現量が TNBC の腫瘍組織において増加していること(図 3.5B)、先行研究で TNBC 細胞株における NIK 増加が、がん幹細胞という一つの悪性化指標に寄与していることから(Yamamoto et al., 2013)、NIK の治療標的としての可能性は残されている。一方で、がん転移機構は、同一臓器に対しても多様な機構が存在していることを踏まえると、共通の機構だけでなく、悪性化に寄与する個々の遺伝子機能解析も重要な課題であると考えている。

今回確認された翻訳や翻訳後修飾によるタンパク質レベルの発現変動は、先行研究で多用されてきたマイクロアレイや RNA-seq 解析による遺伝子発現解析では対象にできない現象であった。近年、tRNA 発現プロファイル変化やリボソーム構成遺伝子の発現増加が、翻訳量の変化をもたらし、転移能の亢進に寄与することが報告され(Ebright et al., 2020; Goodarzi et al., 2016)、転移機構における翻訳過程の重要性が高まっている。そして、転移初期過程に含まれる pre-metastatic niche の形成は、転移巣の形成において重要な役割を担っている(Peinado et al., 2017)。近年、この niche 形成に関わる機構が徐々に明らかになっており、新たな転移治療戦略の一つとして、それらの遺伝子を標的とした臨床試験も行われている(Wang et al., 2021b)。そのため、本研究を通して、転移初期

過程への寄与やタンパク質レベルで発現変動する遺伝子を探索することの重要性を再提示している。

4-2. 乳がん悪性化における NIK の機能

先行研究において、Basal like サブタイプの乳がん細胞株では、NIK mRNA の発現上昇による非古典的 NF- κ B 経路の活性化が、NOTCH 経路を介したがん幹細胞性の維持に寄与していることが報告されている(Yamamoto et al., 2013)。また、Claudin-low サブタイプの乳がん細胞株も、NIK mRNA の発現上昇に伴い、NF- κ B 活性亢進を示すが(Yamaguchi et al., 2009; Yamamoto et al., 2010)、このサブタイプのがん悪性化に対する NIK の機能について十分に検討されていなかった。本研究結果より、Claudin-low サブタイプに分類される LM05 細胞では、NIK の発現上昇が(図 3.2)、炎症関連遺伝子の発現上昇を介して(図 3.4E,F)、CAF の誘引やアポトーシスを抑制することで腫瘍形成の亢進に寄与することが示唆された(図 3.4G,H,I)。現状のところ、サブタイプによって機能が変化する機構は明らかになっていない。先行研究より、非古典的経路をふくむ NF- κ B 活性が、ER の活性に伴い変化することから(Lee et al., 2011; Wang et al., 2007)、サブタイプの差異による発現バックグラウンドやエピジェネティックな変化によって機能が変化する可能性が考えられる。

TNBC における NIK の機能解析は複数のがん細胞株を用いた検証がなされてきた一方で(Yamaguchi et al., 2009; Yamamoto et al., 2010, 2013)、他のサブタイプにおける NIK の機能解析は十分に行われていない。今回のヒト乳がん検体を用いた NIK 免疫染色より、TNBC 以外の Luminal や HER2 サブタイプにおいても、NIK 陽性面積の割合の増加が観察された(補足図 1)。この結果より、1. NIK が他の subtype でも悪性化に寄与する可能性 2. NIK が上がっていても悪性化に寄与しない可能性の二つが考えられる。これを検証するためには、他のサブタイプの乳がん細胞株において、NIK 過剰発現細させた際の造腫瘍能を評価すること、同所性移植による *in vivo selection* 法で造腫瘍能が亢進した細胞株におい

て NIK が亢進しているのか調べる方法が考えられる。ただし、過剰発現に関しては、NIK が非常に低いタンパク質レベルに管理されていることを踏まえると、過剰発現によって細胞にストレスを与え、適切な表現系を見られない可能性が考えられる。先行研究より、実験系による過剰発現が、他のタンパク質の結合や局在を阻害すること、発現に伴う RNA やアミノ酸の枯渇が、細胞増殖を抑制することが報告されている(Moriya, 2015)。実際に、親株(MDA-MB-231)で NIK を過剰発現させた際に、*in vitro* の平面培養状態では、細胞増殖の低下は見られていないが、造腫瘍能の低下が確認されており(補足図 2A,B)、ストレス(低栄養・低酸素など)状況下における細胞増殖能や抗アポトーシス能が減弱していると考えている。したがって、現実的な方法としては、後者を取り組んで行く必要があると考えている。現在は、他のサブタイプの乳がん細胞株を用いた同所性肺転移株を樹立できていないため、今後の検討課題と考えている。また、先行研究より、Luminal タイプに発現している ER が p52 を含む RelB の発現抑制に寄与すること、NF- κ B の標的遺伝子に対し転写抑制型のエピジェネティックな変化を誘導することが報告されている(Lee et al., 2011; Wang et al., 2007)。そのため、ER 陽性乳がんにおいては、NIK の増加を介した非古典的 NF- κ B 経路の活性化は悪性化に寄与しない可能性が考えられる。

本研究結果から、NIK ノックダウンによる造腫瘍能低下の一要因として、原発巣内のアポトーシス領域の増加が示唆されている(図 3.4G)。ウェスタンブロットによるシグナル解析より、同所性株は AKT 経路の活性化が見られなかったことから(Fig3.1C)、定常状態における NIK の増加は、AKT 経路を介した抗アポトーシス機構には寄与しないと考えられる。しかし、CAF との混合培養時や、腫瘍内における、がん細胞の抗アポトーシス機構に寄与する経路の活性評価ができていないため、腫瘍微小環境の影響を受けて、がん細胞の生存機能が

亢進する可能性が残されている。先行研究より、CAF はがん細胞との相互作用を介して、がん細胞の抗アポトーシス能の亢進を誘導することで、がん悪性化に寄与していることが報告されている(Su et al., 2018; Weigel et al., 2014)。本研究結果より、原発巣の CAF 陽性領域と TUNEL 陽性領域が重なり合わない様子が観察されている(補足図 3A,B)。また、がん細胞の生存に寄与する CXCR4 や ITGB4 が、NIK KD によって発現低下することが確認されている(Fig3.4E)(Orimo et al., 2005; Sung et al., 2020; Wang et al., 2021a)。さらに、線維芽細胞の誘引因子である IL6 や CXCL1 も、NIK KD によって発現低下していることを踏まえると(図 3.4E,F) (Buskermolen et al., 2017; Hendrayani et al., 2014)、これらのパラクリンを介したがん悪性化機構が、NIK ノックダウンによって減弱している可能性がある。また、発現確認を行った CXCR4 や IL6、CXCL1 のプロモーター領域には κ B 結合配列が存在し、NF- κ B によって発現誘導を受けることが報告されている(Burke et al., 2014; Helbig et al., 2003; Matsusaka et al., 1993)。すなわち、腫瘍微小環境において、がん細胞における NIK が、非古典的 NF- κ B 経路を介して、炎症関連遺伝子の発現制御をすることで、線維芽細胞との相互作用に重要な役割を担っていると考えられる。また、本研究の RNA-seq データより、AKT 経路以外にも、BIRC3 や PTPRN2 といった DISC(death-inducing signaling complex)の形成を抑制する遺伝子の発現が、NIKKD によって低下することが確認されている(Bertrand et al, 2008, Sorokin et al, 2015)。したがって、これらの遺伝子による抗アポトーシス機構の減弱によって、がん細胞自体の生存能が低下した可能性も考えられる。また、本研究で使用している MDA-MB-231 細胞株は、元来、足場非依存的増殖能を獲得しており、このような細胞株では、細胞周期や抗アポトーシス能の亢進によっても足場非依存的増殖能の亢進が報告されている(Deng et al., 2021; Han et al., 2019;

Hornsveld et al., 2016)。そのため、NIK KD によって観察されたコロニー形成能の低下も、がん細胞自体の生存能が低下したことに起因する可能性があると考えている。

しかし、今回の NIK KD によって観察される表現型が、顕著ではないことを踏まえると、NIK の下流の一遺伝子の機能評価が困難であると捉えており、下流遺伝子群の総合的な影響が、今回の表現型に繋がっていると考えている。ただし、NIK KD 細胞における下流遺伝子の過剰発現によって、造腫瘍能をはじめこれらの表現型に寄与する遺伝子の評価は可能であり、今後の検討事項である。また、本研究の *in vivo* 実験系では、免疫不全マウスを用いているため、T 細胞やマクロファージなどの免疫細胞に対する NIK の機能解析は行えていない。そのため、今後は、マウス乳がん細胞株と Syngeneic マウスモデルを用いて、NIK の免疫系に対する機能を調べる必要もあると考えている。

LM05 における NIK は、肺転移巣の形成能よりも造腫瘍能に顕著な影響を与えることが示されている(図 3.3G,H,K,L)。この結果から、NIK は乳房組織に特異的な造腫瘍亢進に重要な役割を担っている可能性がある。この仮説を検証するにあたり、先行研究にて行われた、親細胞と LM05 の尾静脈移植による肺組織における増殖能を評価結果に着目した。この結果では、尾静脈移植モデルにおける、親細胞と LM05 細胞の肺組織の増殖能に有意な差は見られなかった。LM05 は、乳房部位への異種移植を繰り返し、この部位で増殖した細胞株であるため、LM05 の造腫瘍能亢進の一要因は、乳房組織の微小環境からもたらされていると考えた。実際に、非古典的 NF- κ B 経路の活性化リガンドである TWEAK と RANKL は、乳腺の発達段階や腫瘍形成において発現し、重要な機能を有していることが報告されている(Fata et al., 2000; Michaelson et al., 2005; Schramek et al., 2010; Yin et al., 2013)。また、*in vitro* において、親株と LM05 細

胞株を TWEAK 刺激すると、NIK および下流の NF- κ B2(p52)の増加が確認された(補足図 4)。また、TWEAK 刺激下においても、親株に比べて LM05 において、これらのタンパク質量が増加している(補足図 4)。したがって、LM05 では、NIK の安定性が向上しており、乳房組織における、これらのリガンドによって非古典的経路の活性化を受けやすくなってたため、造腫瘍能の亢進や NIK ノックダウンによる造腫瘍能への影響が顕著に現れた可能性が考えられる。

一方、本研究では NIK は LM05 における肺転移能の亢進を説明することができなかった。そこで、LM05 細胞で親株に比べ発現が増加し、NIK ノックダウンでは発現が減少しない遺伝子群の抽出を試みた。その結果、これらのグループに、IL13RA2、TNS1、EMP1 などの既知の肺転移制御遺伝子が含まれていた (Ahmat Amin et al., 2018; Chang et al., 2020; Minn et al., 2005)。さらに、ウェスタンブロットによるシグナル解析結果から、LM05 において HIF1A タンパク質の増加が確認されている。HIF1A に関しては、様々な先行研究から、乳がん転移を促進することが報告されている (Hiraga et al., 2007; Lan et al., 2018; Liu et al., 2015; Zhang et al., 2012)。今後は、これらの遺伝子を対象とした発現上昇機構や機能解析を進めることで、LM05 細胞における転移促進機構が明らかになる可能性がある。

ヒト乳がん組織を用いた組織学的解析により、NIK の陽性領域が腫瘍組織において増加していたのに対し(図 3.5A)、正常組織と腫瘍組織における cIAP1 の陽性面積の割合に顕著な変化はみられなかった(補足図 5A、表 9)。しかし、サブタイプ別に比較すると、TNBC においては腫瘍組織において cIAP1 陽性割合の増加が確認されている(補足図 5B)。先行研究より、cIAP1 は非古典的 NF- κ B 経路において抑制的に働く一方で、アポトーシスの抑制に働くことが報告されており (Bertrand et al., 2008)、乳がんにおける cIAP1 の発現増加が、薬剤耐性や

造腫瘍能の亢進を介して、がん悪性化に寄与することが報告されている(Cheng et al., 2010; Wang et al., 2009)。実際に、今回使用した親株に対し、cIAP1 を KD すると、NIK の増加や下流の非古典的経路の活性は確認される一方で、soft agar assay ではコロニー数の低下が確認された(図 3.2E、補足図 6A,B)。LM05 の cIAP1 過剰発現株における評価はできていないが、先行研究と本結果を踏まえると、cIAP1 タンパク質の減少が、単純にがん悪性化に寄与するとは考えづらい。そのため、LM05 では、cIAP1 補完機構を介して悪性化に寄与している可能性が考えられる。先行研究より、cIAP1/2 の KO によって誘導されるアポトーシスは、下流の Caspase8 や RIPK3 の KO によって阻止されることが報告されている(Zhang et al., 2019)。また、ミトコンドリアから caspase 活性誘導体チトクロム c の放出を抑制し、がん悪性化に寄与する BCL2A1 が、マイクロアレイデータより、LM05 において増加していた(D'Sa-Eipper et al., 1996; Nakayama et al., 2017; Sagara et al., 2016; Wang et al., 1999)。実験での検証が必要ではあるが、乳がん悪性化における cIAP1 の役割は、発現増加もしくは減少に伴う二面性の機能があり、減少によって悪性化に寄与する場合は、異なる抗アポトーシス機構の亢進が必要になると考えられる。

in vitro で確認された cIAP1 と NIK の発現相関性は、乳がん組織では部分的な検体のみで観察され(図 3.5D,E)、他の分子生物学的現象が NIK タンパク質の増加に寄与している可能性が考えられる。先行研究では、TRAF2 と TRAF3 も NIK タンパク質の分解遺伝子であり(Morrison et al., 2005; Zarnegar et al., 2008)、他のがん種では、これらの遺伝子を欠失したり、不活性型の変異を有していることが報告されている(Zhu et al., 2018)。従って、乳がん組織における NIK の増加機構を明らかにするために、他の NIK 分解遺伝子の発現を調べていく必要があると考えられる。

4-3. NIK の治療標的としての可能性

NIK は、免疫系、骨形成、腎臓、肝臓、造血など、様々な組織機能の維持に重要な遺伝子である(Valiño-Rivas et al., 2019)。がんでは、NIK の機能的な変異報告はないが、原発性免疫不全症においては、Val345Met や Pro565Arg の変異に伴い、NIK キナーゼ活性が低下し、炎症応答が抑制されることが報告されている(Schlechter et al., 2017; Willmann et al., 2014)。そのため、NIK の異常な活性化や不活化は、がん、急性腎障害、全身性エリテマトーデス等の様々な疾患に関与している(Valiño-Rivas et al., 2019)。そして、これらの研究から、NIK の治療標的としての注目が近年集まっており、NIK 阻害剤の探索・開発研究が活発に行われている(Valiño-Rivas et al., 2019)。NIK の結晶データを用いた構造活性相関やドッキングシミュレーションに基づいた阻害剤開発や、類似のキナーゼファミリーの阻害剤や従来の NIK 阻害剤を改変して、NIK 阻害剤が開発されてきた(Blaquiere et al., 2018; Pippione et al., 2018)。これらの研究により、NIK 阻害剤が、特定の炎症性肝疾患や全身性エリテマトーデスのマウスモデルにおいて治療効果を示すことが確認されている(Brightbill et al., 2018; Ren et al., 2017)。また、NIK 阻害活性を有する天然化合物である mangiferin は、メラノーマ細胞株における腫瘍形成および転移能を阻害することが報告されている(Takeda et al., 2016)。しかしながら、これらの NIK 阻害剤の他のがん種や疾患モデルに対する有効性は不明であり、その有効性を検証する必要がある。一方で、NIK の不活性化変異は、成熟 B 細胞や T 細胞の数の減少や機能障害による免疫不全を引き起こすことが示されている(Schlechter et al., 2017)。また、NIK は細胞傷害性 CD8⁺T 細胞の糖代謝を調節することにより、抗腫瘍免疫において重要な役割を担っている(Gu et al., 2021)。したがって、NIK が生体内で果たす機能を阻害しない、あるいは NIK 経路阻害剤の開発を目指す必要がある。

第 5 章 結論

本研究では、同所性移植を用いた *in vivo* selection 法によって樹立された高悪性化乳がん細胞株(LM05)のシグナル解析を行い、本細胞株は、NIK タンパク質の増加に伴い、非古典的 NF- κ B 経路の活性が亢進していることを見出した。また、*in vivo* selection 法による高悪性化株を用いた先行研究において検討が不十分であった、タンパク質レベルで発現変動する遺伝子を探索することの重要性を示唆した。本研究では、本細胞株における NIK の発現制御機構および機能に関して次のことを明らかにした。

- I. NIK のタンパク質レベルの増加は、cIAP1 の翻訳量の低下に伴う、NIK のユビキチン修飾の減少に起因する。
- II. NIK タンパク質の増加が、造腫瘍能の亢進に寄与している。
- III. NIK は、IL-6 や CXCL1 などの炎症関連の遺伝子発現を促進する。
- IV. NIK の増加は、原発巣内におけるアポトーシスの抑制および CAF の増加に関与している可能性がある。
- V. NIK の増加は、がん細胞の線維芽細胞に対する誘引能に寄与している。
- VI. NIK の増加が、TNBC におけるがん悪性を助長している可能性がある。

以上のことを踏まえ、本研究の概要を図 4 にまとめた。つまり、同所性株において、cIAP1 の翻訳低下に由来する NIK のタンパク質レベルの増加によって、非古典的 NF- κ B 経路の活性亢進が誘導されていた。そして、この NIK の増加は、炎症に関連する遺伝子の発現を促進することで、腫瘍内における CAF の誘引や細胞死を抑制し、同所性株の造腫瘍能の亢進に寄与していることが示唆された。本研究では、高悪性化乳がん細胞株において NIK の新たな異常発現原因と機能を明らかにし、乳がんにおける NIK の重要性を示した。

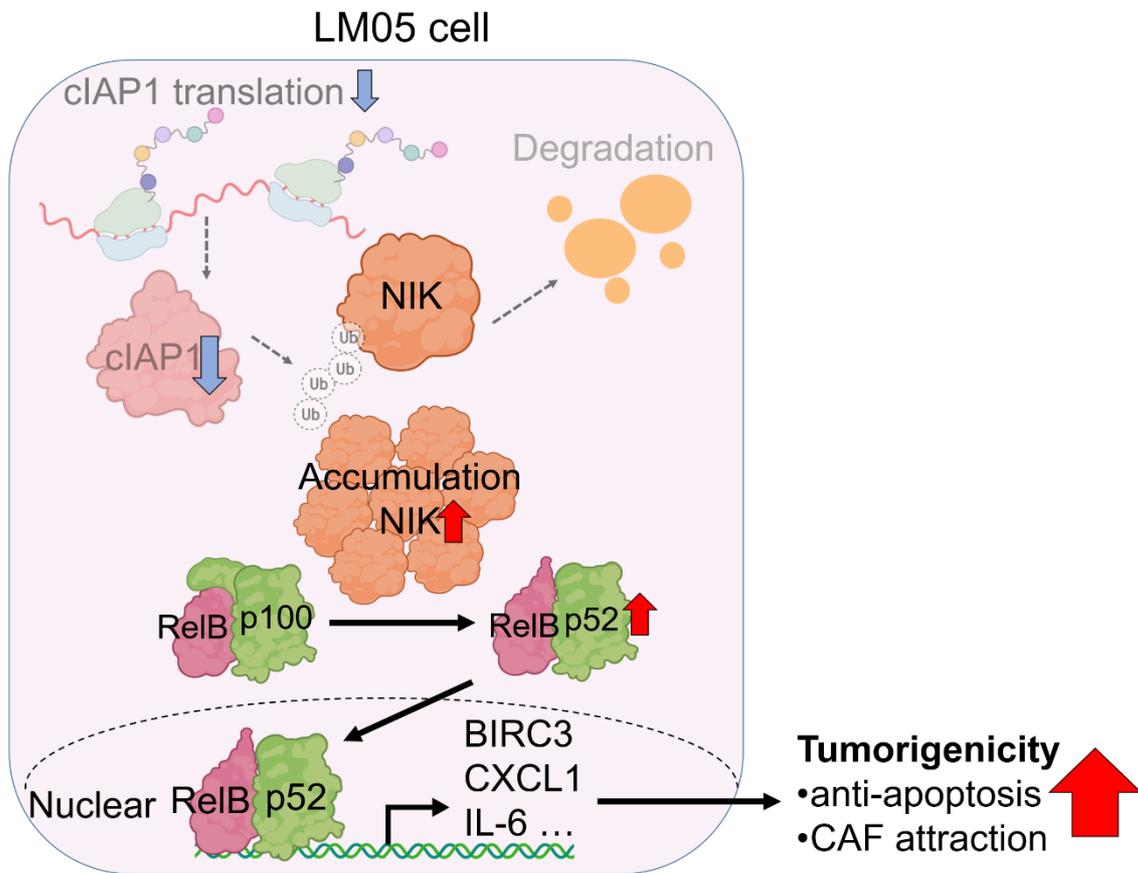


図 4 LM05 における翻訳・翻訳後制御機構の異常に伴う非古典的 NF- κ B 経路の活性と造腫瘍能の亢進

Hayashi et al. の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

第 6 章 参考文献

- Ahmat Amin, M.K.B., Shimizu, A., Zankov, D.P., Sato, A., Kurita, S., Ito, M., Maeda, T., Yoshida, T., Sakaue, T., Higashiyama, S., et al. (2018). Epithelial membrane protein 1 promotes tumor metastasis by enhancing cell migration via copine-III and Rac1. *Oncogene* 37, 5416–5434. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0286-0>.
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- κ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* 12, 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.004>.
- Arguello, F., Baggs, R.B., and Frantz, C.N. (1988). A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. *Cancer Res.* 48, 6876–6881. .
- Bakhoun, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., et al. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 553, 467–472. <https://doi.org/10.1038/nature25432>.
- Barth, C.F., Ewert, D.L., Olson, W.C., and Humphries, E.H. (1990). Reticuloendotheliosis virus REV-T(REV-A)-induced neoplasia: development of tumors within the T-lymphoid and myeloid lineages. *J. Virol.* 64, 6054–6062. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.12.6054-6062.1990>.
- Berthelet, J., Wimmer, V.C., Whitfield, H.J., Serrano, A., Boudier, T., Mangiola, S., Merdas, M., El-Saafin, F., Baloyan, D., Wilcox, J., et al. (2021). The site of breast cancer metastases dictates their clonal composition and reversible transcriptomic profile. *Sci. Adv.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf4408>.
- Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. *Mol. Cell* 30, 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.014>.
- Beug, H., Müller, H., Grieser, S., Doederlein, G., and Graf, T. (1981). Hematopoietic cells transformed in vitro by REVT avian reticuloendotheliosis virus express characteristics of very immature lymphoid cells. *Virology* 115, 295–309. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90112-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90112-4).
- Blaquiere, N., Castanedo, G.M., Burch, J.D., Berezhkovskiy, L.M., Brightbill, H., Brown, S., Chan, C., Chiang, P.-C., Crawford, J.J., Dong, T., et al. (2018). Scaffold-Hopping Approach To Discover Potent,

- Selective, and Efficacious Inhibitors of NF- κ B Inducing Kinase. *J. Med. Chem.* *61*, 6801–6813.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00678>.
- Bos, P.D., Zhang, X.H.F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., et al. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* *459*, 1005–1009. <https://doi.org/10.1038/nature08021>.
- Bren, G.D., Solan, N.J., Miyoshi, H., Pennington, K.N., Pobst, L.J., and Paya, C. V. (2001). Transcription of the RelB gene is regulated by NF- κ B. *Oncogene* *20*, 7722–7733.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204868>.
- Brightbill, H.D., Jackman, J.K., Suto, E., Kennedy, H., Jones, C., Chalasani, S., Lin, Z., Tam, L., Rose-Girma, M., Balazs, M., et al. (2015). Conditional Deletion of NF- κ B-Inducing Kinase (NIK) in Adult Mice Disrupts Mature B Cell Survival and Activation. *J. Immunol.* *195*, 953–964.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401514>.
- Brightbill, H.D., Suto, E., Blaquiere, N., Ramamoorthi, N., Sujatha-Bhaskar, S., Gogol, E.B., Castanedo, G.M., Jackson, B.T., Kwon, Y.C., Haller, S., et al. (2018). NF- κ B inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythematosus. *Nat. Commun.* *9*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02672-0>.
- Burke, S.J., Lu, D., Sparer, T.E., Masi, T., Goff, M.R., Karlstad, M.D., and Collier, J.J. (2014). NF- κ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *306*, E131-49. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00347.2013>.
- Buskermolen, J.K., Roffel, S., and Gibbs, S. (2017). Stimulation of oral fibroblast chemokine receptors identifies CCR3 and CCR4 as potential wound healing targets. *J. Cell. Physiol.* *232*, 2996–3005.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25946>.
- Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T.N., Greten, F.R., Johnson, R., Schmidt, E. V., and Karin, M. (2001). IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* *107*, 763–775. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00599-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00599-2).
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 417–427. <https://doi.org/10.1038/nrd3455>.
- Celià-Terrassa, T., and Kang, Y. (2018). Metastatic niche functions and therapeutic opportunities. *Nat. Cell Biol.* *20*, 868–877. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0145-9>.
- Chang, K.-C., Diermeier, S.D., Yu, A.T., Brine, L.D., Russo, S., Bhatia, S., Alsudani, H., Kostroff, K., Bhuiya, T., Brogi, E., et al. (2020). MaTAR25 lncRNA regulates the Tensin1 gene to impact breast cancer progression. *Nat. Commun.* *11*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20207-y>.

- Cheng, L., Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Toshkov, I.A., Wang, W., Camps, J., Ried, T., and Nikitin, A.Y. (2010). Rb inactivation accelerates neoplastic growth and substitutes for recurrent amplification of cIAP1, cIAP2 and Yap1 in sporadic mammary carcinoma associated with p53 deficiency. *Oncogene* 29, 5700–5711. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.300>.
- Choudhary, S., Sinha, S., Zhao, Y., Banerjee, S., Sathyanarayana, P., Shahani, S., Sherman, V., Tilton, R.G., and Bajaj, M. (2011). NF- κ B-inducing kinase (NIK) mediates skeletal muscle insulin resistance: Blockade by adiponectin. *Endocrinology* 152, 3622–3627. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1343>.
- Chung, S., Sundar, I.K., Hwang, J.W., Yull, F.E., Blackwell, T.S., Kinnula, V.L., Bulger, M., Yao, H., and Rahman, I. (2011). NF- κ B inducing kinase, NIK mediates cigarette smoke/TNF α -induced histone acetylation and inflammation through differential activation of IKKs. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023488>.
- D'Sa-Eipper, C., Subramanian, T., and Chinnadurai, G. (1996). bfl-1, a bcl-2 homologue, suppresses p53-induced apoptosis and exhibits potent cooperative transforming activity. *Cancer Res.* 56, 3879–3882.
- Davis, R.T., Blake, K., Ma, D., Gabra, M.B.I., Hernandez, G.A., Phung, A.T., Yang, Y., Maurer, D., Lefebvre, A.E.Y.T., Alshetaiwi, H., et al. (2020). Transcriptional diversity and bioenergetic shift in human breast cancer metastasis revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat. Cell Biol.* 22, 310–320. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0477-0>.
- Deng, Z., Wang, H., Liu, J., Deng, Y., and Zhang, N. (2021). Comprehensive understanding of anchorage-independent survival and its implication in cancer metastasis. *Cell Death Dis.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03890-7>.
- Ding, J., Sharon, N., and Bar-Joseph, Z. (2022). Temporal modelling using single-cell transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 23, 355–368. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00444-7>.
- Donato, C., Kunz, L., Castro-Giner, F., Paasinen-Sohns, A., Strittmatter, K., Szczerba, B.M., Scherrer, R., Di Maggio, N., Heusermann, W., Biehlmaier, O., et al. (2020). Hypoxia Triggers the Intravasation of Clustered Circulating Tumor Cells. *Cell Rep.* 32, 108105. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108105>.
- Dwyer, B.J., Jarman, E.J., Gogoi-Tiwari, J., Ferreira-Gonzalez, S., Boulter, L., Guest, R. V., Kendall, T.J., Kurian, D., Kilpatrick, A.M., Robson, A.J., et al. (2021). TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression. *J. Hepatol.* 74, 860–872. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.018>.
- Ebright, R.Y., Lee, S., Wittner, B.S., Niederhoffer, K.L., Nicholson, B.T., Bardia, A., Truesdell, S., Wiley, D.F., Wesley, B., Li, S., et al. (2020). Deregulation of ribosomal protein expression and

translation promotes breast cancer metastasis. *Science* (80-.). 367, 1468–1473.

<https://doi.org/10.1126/science.aay0939>.

Esposito, M., Ganesan, S., and Kang, Y. (2021). Emerging strategies for treating metastasis. *Nat. Cancer* 2, 258–270. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00181-0>.

Fata, J.E., Kong, Y.-Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L., et al. (2000). The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. *Cell* 103, 41–50.

[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00103-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00103-3).

Faye, M.D., Beug, S.T., Graber, T.E., Earl, N., Xiang, X., Wild, B., Langlois, S., Michaud, J., Cowan, K.N., Korneluk, R.G., et al. (2015). IGF2BP1 controls cell death and drug resistance in rhabdomyosarcomas by regulating translation of cIAP1. *Oncogene* 34, 1532–1541.

<https://doi.org/10.1038/onc.2014.90>.

Fidler, I.J. (1973). Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. *Nat. New Biol.* 242, 148–149.

<https://doi.org/10.1038/newbio242148a0>.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.

Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>.

Fomicheva, M., and Macara, I.G. (2020). Genome-wide crispr screen identifies noncanonical nf- κ b signaling as a regulator of density-dependent proliferation. *Elife* 9, 1–24.

<https://doi.org/10.7554/eLife.63603>.

Gehlhausen, J.R., Hawley, E., Wahle, B.M., He, Y., Edwards, D., Rhodes, S.D., Lajiness, J.D., Staser, K., Chen, S., Yang, X., et al. (2019). A proteasome-resistant fragment of NIK mediates oncogenic NF- κ B signaling in schwannomas. *Hum. Mol. Genet.* 28, 572–583. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy361>.

Gerling, I.C., Serreze, D. V., Christianson, S.W., and Leiter, E.H. (1992). Intrathymic islet cell transplantation reduces β -cell autoimmunity and prevents diabetes in NOD/Lt mice. *Diabetes* 41, 1672–1676. <https://doi.org/10.2337/diab.41.12.1672>.

Ghosh, S., Gifford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P., and Baltimore, D. (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- κ B: Homology to rel and dorsal. *Cell* 62, 1019–1029.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90276-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90276-K).

- Gilmore, T.D. (1999). Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene* 18, 6925–6937. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203222>.
- Gong, Y., Liu, Y.-R., Ji, P., Hu, X., and Shao, Z.-M. (2017). Impact of molecular subtypes on metastatic breast cancer patients: a SEER population-based study. *Sci. Rep.* 7, 45411. <https://doi.org/10.1038/srep45411>.
- Goodarzi, H., Nguyen, H.C.B., Zhang, S., Dill, B.D., Molina, H., and Tavazoie, S.F. (2016). Modulated expression of specific tRNAs drives gene expression and cancer progression. *Cell* 165, 1416–1427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.046>.
- Graber, T.E., Baird, S.D., Kao, P.N., Mathews, M.B., and Holcik, M. (2010). NF45 functions as an IRES trans-acting factor that is required for translation of cIAP1 during the unfolded protein response. *Cell Death Differ.* 17, 719–729. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.164>.
- Gu, M., Zhou, X., Sohn, J.H., Zhu, L., Jie, Z., Yang, J.Y., Zheng, X., Xie, X., Yang, J., Shi, Y., et al. (2021). NF- κ B-inducing kinase maintains T cell metabolic fitness in antitumor immunity. *Nat. Immunol.* 22, 193–204. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00829-6>.
- Gupta, G.P., Nguyen, D.X., Chiang, A.C., Bos, P.D., Kim, J.Y., Nadal, C., Gomis, R.R., Manova-Todorova, K., and Massagué, J. (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446, 765–770. <https://doi.org/10.1038/nature05760>.
- Gye, Y.P., Wang, X., Hu, N., Pedchenko, T. V., Blackwell, T.S., and Christman, J.W. (2006). NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKK α . *J. Biol. Chem.* 281, 18684–18690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600733200>.
- Han, T., Jiang, S., Zheng, H., Yin, Q., Xie, M., Little, M.R., Yin, X., Chen, M., Song, S.J., Beg, A.A., et al. (2019). Interplay between c-Src and the APC/C co-activator Cdh1 regulates mammary tumorigenesis. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11618-7>.
- Hayashi, Y., Nakayama, J., Yamamoto, M., Maekawa, M., Watanabe, S., Higashiyama, S., Inoue, J.I., Yamamoto, Y., Semba, K. (2023). Aberrant accumulation of NIK promotes tumor growth by dysregulating translation and post-translational modifications in breast cancer. *Cancer Cell Int.* 23, 57. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02904-y>.
- Helbig, G., Christopherson, K.W., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K.D., Broxmeyer, H.E., and Nakshatri, H. (2003). NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278, 21631–21638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300609200>.

- Hendrayani, S.F., Al-Khalaf, H.H., and Aboussekhra, A. (2014). The cytokine il-6 reactivates breast stromal fibroblasts through transcription factor STAT3-dependent up-regulation of the RNA-binding protein AUF1. *J. Biol. Chem.* *289*, 30962–30976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.594044>.
- Hiraga, T., Kizaka-Kondoh, S., Hirota, K., Hiraoka, M., and Yoneda, T. (2007). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res.* *67*, 4157–4163. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2355>.
- Hoesel, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* *12*, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>.
- Hornsveld, M., Tenhagen, M., van de Ven, R.A., Smits, A.M.M., van Triest, M.H., van Amersfoort, M., Kloet, D.E.A., Dansen, T.B., Burgering, B.M., and Derksen, P.W.B. (2016). Restraining FOXO3-dependent transcriptional BMF activation underpins tumour growth and metastasis of E-cadherin-negative breast cancer. *Cell Death Differ.* *23*, 1483–1492. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.33>.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* *527*, 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
- Hu, Z., Li, Z., Ma, Z., and Curtis, C. (2020). Multi-cancer analysis of clonality and the timing of systemic spread in paired primary tumors and metastases. *Nat. Genet.* *52*, 701–708. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0628-z>.
- Huang, T., Gao, Z., Zhang, Y., Fan, K., Wang, F., Li, Y., Zhong, J., Fan, H.Y., Cao, Q., Zhou, J., et al. (2018). CRL4DCAF2 negatively regulates IL-23 production in dendritic cells and limits the development of psoriasis. *J. Exp. Med.* *215*, 1999–2017. <https://doi.org/10.1084/jem.20180210>.
- Huxford, T., and Ghosh, G. (2009). A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000075>.
- Jane-wit, D., Surovtseva, Y. V., Qin, L., Li, G., Liu, R., Clark, P., Manes, T.D., Wang, C., Kashgarian, M., Kirkiles-Smith, N.C., et al. (2015). Complement membrane attack complexes activate noncanonical NF- κ B by forming an Akt+NIK+ signalosome on Rab5+ endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 9686–9691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503535112>.
- Jia, Q., Chu, H., Jin, Z., Long, H., and Zhu, B. (2022). High-throughput single-cell sequencing in cancer research. *Signal Transduct. Target. Ther.* *7*, 145. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00990-4>.

- Jiang, B., Shen, H., Chen, Z., Yin, L., Zan, L., and Rui, L. (2015). Carboxyl terminus of HSC70-interacting protein (CHIP) down-regulates NF- κ B-inducing kinase (NIK) and suppresses NIK-induced liver injury. *J. Biol. Chem.* *290*, 11704–11714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635086>.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 239–252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>.
- Jung, J.U., Ravi, S., Lee, D.W., McFadden, K., Kamradt, M.L., Toussaint, L.G., and Sitcheran, R. (2016). NIK/MAP3K14 Regulates Mitochondrial Dynamics and Trafficking to Promote Cell Invasion. *Curr. Biol.* *26*, 3288–3302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.009>.
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A., and Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* *3*, 537–549. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00132-6](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00132-6).
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* *438*, 820–827. <https://doi.org/10.1038/nature04186>.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.-J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.-X., Sebag, M., et al. (2007). Promiscuous Mutations Activate the Noncanonical NF- κ B Pathway in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* *12*, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.003>.
- Kieran, M., Blank, V., Logeat, F., Vandekerckhove, J., Lottspeich, F., Le Bail, O., Urban, M.B., Kourilsky, P., Baeuerle, P.A., and Israël, A. (1990). The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* *62*, 1007–1018. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90275-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90275-j).
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* *168*, 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- Lan, J., Lu, H., Samanta, D., Salman, S., Lu, Y., and Semenza, G.L. (2018). Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E9640–E9648. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809695115>.
- Lánczky, A., and Györfy, B. (2021). Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J. Med. Internet Res.* *23*, e27633. <https://doi.org/10.2196/27633>.

- Langley, R.R., and Fidler, I.J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer* *128*, 2527–2535. <https://doi.org/10.1002/ijc.26031>.
- Lavie, D., Ben-Shmuel, A., Erez, N., and Scherz-Shouval, R. (2022). Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nat. Cancer* *3*, 793–807. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00411-z>.
- Lee, S.T., Li, Z., Wu, Z., Aau, M., Guan, P., Karuturi, R.K.M., Liou, Y.C., and Yu, Q. (2011). Context-Specific Regulation of NF- κ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Mol. Cell* *43*, 798–810. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.011>.
- Lewis, R.B., McClure, J., Rup, B., Niesel, D.W., Garry, R.F., Hoelzer, J.D., Nazerian, K., and Bose, H.R. (1981). Avian reticuloendotheliosis virus: Identification of the hematopoietic target cell for transformation. *Cell* *25*, 421–431. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90060-X).
- Liu, Y., and Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* *30*, 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011>.
- Liu, J., Huang, X., Hao, S., Wang, Y., Liu, M., Xu, J., Zhang, X., Yu, T., Gan, S., Dai, D., et al. (2018). Peli1 negatively regulates noncanonical NF- κ B signaling to restrain systemic lupus erythematosus. *Nat. Commun.* *9*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03530-3>.
- Liu, Y., Sheng, L., Xiong, Y., Shen, H., Liu, Y., and Rui, L. (2017). Liver NF- κ B-inducing kinase promotes liver steatosis and glucose counterregulation in male mice with obesity. *Endocrinology* *158*, 1207–1216. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1582>.
- Liu, Z., Semenza, G.L., and Zhang, H. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J. Zhejiang Univ. B* *16*, 32–43. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400221>.
- Longo, S.K., Guo, M.G., Ji, A.L., and Khavari, P.A. (2021). Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics. *Nat. Rev. Genet.* *22*, 627–644. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00370-8>.
- Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* *385*, 540–544. <https://doi.org/10.1038/385540a0>.
- Malle, E.K., Zammit, N.W., Walters, S.N., Koay, Y.C., Wu, J., Tan, B.M., Villanueva, J.E., Brink, R., Loudovaris, T., Cantley, J., et al. (2015). Nuclear factor κ B-inducing kinase activation as a mechanism of pancreatic β cell failure in obesity. *J. Exp. Med.* *212*, 1239–1254. <https://doi.org/10.1084/jem.20150218>.

- Marienfeld, R., May, M.J., Berberich, I., Serfling, E., Ghosh, S., and Neumann, M. (2003). RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J. Biol. Chem.* 278, 19852–19860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301945200>.
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10193–10197. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10193>.
- McFaline-Figueroa, J.L., Hill, A.J., Qiu, X., Jackson, D., Shendure, J., and Trapnell, C. (2019). A pooled single-cell genetic screen identifies regulatory checkpoints in the continuum of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Genet.* 51, 1389–1398. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0489-5>.
- Michaelson, J.S., Cho, S., Browning, B., Zheng, T.S., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., Hsu, Y.M., and Burkly, L.C. (2005). Tweak induces mammary epithelial branching morphogenesis. *Oncogene* 24, 2613–2624. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208208>.
- Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L., and Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518–524. <https://doi.org/10.1038/nature03799>.
- Moriya, H. (2015). Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol. Biol. Cell* 26, 3932–3939. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0512>.
- Morrison, M.D., Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S.-C. (2005). An Atypical Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-associated Factor-binding Motif of B Cell-activating Factor Belonging to the TNF Family (BAFF) Receptor Mediates Induction of the Noncanonical NF-κB Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 10018–10024. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413634200>.
- Nadiminty, N., Chun, J.Y., Hu, Y., Dutt, S., Lin, X., and Gao, A.C. (2007). LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.119>.
- Nakayama, J., Ito, E., Fujimoto, J., Watanabe, S., and Semba, K. (2017). Comparative analysis of gene regulatory networks of highly metastatic breast cancer cells established by orthotopic transplantation and intra-circulation injection. *Int. J. Oncol.* 50, 497–504. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3809>.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.

- Nolan, G.P., Ghosh, S., Liou, H.C., Tempst, P., and Baltimore, D. (1991). DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, a rel-related polypeptide. *Cell* 64, 961–969. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90320-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90320-X).
- Noma, H., Eshima, K., Satoh, M., and Iwabuchi, K. (2015). Differential dependence on nuclear factor- κ B-inducing kinase among natural killer T-cell subsets in their development. *Immunology* 146, 89–99. <https://doi.org/10.1111/imm.12484>.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>.
- Ortiz, A., Husi, H., Gonzalez-Lafuente, L., Valiño-Rivas, L., Fresno, M., Sanz, A.B., Mullen, W., Albalat, A., Mezzano, S., Vlahou, T., et al. (2017). Mitogen-Activated protein kinase 14 promotes AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28, 823–836. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015080898>.
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X.H.F., Vanharanta, S., Tavazoie, S.F., Morris, P.G., Downey, R.J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., and Massagué, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat. Med.* 17, 867–874. <https://doi.org/10.1038/nm.2379>.
- Padua, D., Zhang, X.H.F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W.L., Gomis, R.R., and Massagué, J. (2008). TGF β Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell* 133, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.046>.
- Paget, S. (1889). Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 133, 571–573. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., et al. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat. Rev. Cancer* 17, 302–317. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>.
- Pippione, A.C., Sainas, S., Federico, A., Lupino, E., Piccinini, M., Kubbutat, M., Contreras, J.M., Morice, C., Barge, A., Ducime, A., et al. (2018). N -Acetyl-3-aminopyrazoles block the non-canonical NF- κ B cascade by selectively inhibiting NIK. *Medchemcomm* 9, 963–968. <https://doi.org/10.1039/c8md00068a>.
- Psaila, B., and Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* 9, 285–293. <https://doi.org/10.1038/nrc2621>.

- Qing, G., Yan, P., Qu, Z., Liu, H., and Xiao, G. (2007). Hsp90 regulates processing of NF- κ B p100 involving protection of NF- κ B-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation. *Cell Res.* *17*, 520–530. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.47>.
- Ranjan Sen, and David Baltimore (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* *46*, 705–716. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6).
- Ren, X., Li, X., Jia, L., Chen, D., Hou, H., Rui, L., Zhao, Y., and Chen, Z. (2017). A small-molecule inhibitor of NF- κ B-inducing kinase (NIK) protects liver from toxin-induced inflammation, oxidative stress, and injury. *FASEB J.* *31*, 711–718. <https://doi.org/10.1096/fj.201600840R>.
- Robinson, F.R., and Twiehaus, M.J. (1974). Isolation of the avian reticuloendothelial virus (strain T). *Avian Dis.* *18*, 278–288. .
- Ruben, S.M., Dillon, P.J., Schreck, R., Henkel, T., Chen, C.H., Maher, M., Baeuerle, P.A., and Rosen, C.A. (1991). Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science* *254*, 11. <https://doi.org/10.1126/science.1925549>.
- Sagara, A., Igarashi, K., Otsuka, M., Karasawa, T., Gotoh, N., Narita, M., Kuzumaki, N., Narita, M., and Kato, Y. (2016). Intrinsic resistance to 5-fluorouracil in a brain metastatic variant of human breast cancer cell line, MDA-MB-231BR. *PLoS One* *11*, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164250>.
- Sanz, A.B., Justo, P., Sanchez-Nino, M.D., Blanco-Colio, L.M., Winkles, J.A., Kretzler, M., Jakubowski, A., Blanco, J., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., et al. (2008). The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 695–703. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007050577>.
- Sanz, A.B., Sanchez-Niño, M.D., Izquierdo, M.C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L.M., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., Egido, J., and Ortiz, A. (2010). TWEAK activates the non-canonical NF κ B pathway in murine renal tubular cells: Modulation of CCL21. *PLoS One* *5*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008955>.
- Schlechter, N., Glanzmann, B., Hoal, E.G., Schoeman, M., Petersen, B.S., Franke, A., Lau, Y.L., Urban, M., van Helden, P.D., Esser, M.M., et al. (2017). Exome sequencing identifies a novel MAP3K14 mutation in recessive atypical combined immunodeficiency. *Front. Immunol.* *8*. <https://doi.org/10.1007/BF01874049>.
- Schramek, D., Leibbrandt, A., Sigl, V., Kenner, L., Pospisilik, J.A., Lee, H.J., Hanada, R., Joshi, P.A., Aliprantis, A., Glimcher, L., et al. (2010). Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature* *468*, 98–102. <https://doi.org/10.1038/nature09387>.

- Serreze, D. V., Gaedeke, J.W., and Leiter, E.H. (1993). Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: Defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9625–9629. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9625>.
- Shen, H., Sheng, L., Chen, Z., Jiang, L., Su, H., Yin, L., Omary, M.B., and Rui, L. (2014). Mouse hepatocyte overexpression of NF- κ B-inducing kinase (NIK) triggers fatal macrophage-dependent liver injury and fibrosis. *Hepatology* *60*, 2065–2076. <https://doi.org/10.1002/hep.27348>.
- Sheng, L., Zhou, Y., Chen, Z., Ren, D., Cho, K.W., Jiang, L., Shen, H., Sasaki, Y., and Rui, L. (2012). NF- κ B-inducing kinase (NIK) promotes hyperglycemia and glucose intolerance in obesity by augmenting glucagon action. *Nat. Med.* *18*, 943–949. <https://doi.org/10.1038/nm.2756>.
- Shinkura, R., Kitada, K., Matsuda, F., Tashiro, K., Ikuta, K., Suzuki, M., Kogishi, K., Serikawa, T., and Honjo, T. (1999). Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding nf- κ b-inducing kinase. *Nat. Genet.* *22*, 74–77. <https://doi.org/10.1038/8780>.
- Shostak, K., and Chariot, A. (2011). NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res.* *13*, 214. <https://doi.org/10.1186/bcr2886>.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V, and Greiner, D.L. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* *154*, 180–191. .
- Simeonov, K.P., Byrns, C.N., Clark, M.L., Norgard, R.J., Martin, B., Stanger, B.Z., Shendure, J., McKenna, A., and Lengner, C.J. (2021). Single-cell lineage tracing of metastatic cancer reveals selection of hybrid EMT states. *Cancer Cell* *39*, 1150-1162.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.05.005>.
- Steeg, P.S., Bevilacqua, G., Kopper, L., Thorgerirsson, U.P., Talmadge, J.E., Liotta, L.A., and Sobel, M.E. (1988). Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* *80*, 200–204. <https://doi.org/10.1093/jnci/80.3.200>.
- Su, S., Chen, J., Yao, H., Liu, J., Yu, S., Lao, L., Wang, M., Luo, M., Xing, Y., Chen, F., et al. (2018). CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* *172*, 841-856.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>.
- Suhail, Y., Cain, M.P., Vanaja, K., Kurywchak, P.A., Levchenko, A., Kalluri, R., and Kshitiz (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* *9*, 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>.
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* *21*, 71–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>.

- Sung, J.S., Kang, C.W., Kang, S., Jang, Y., Chae, Y.C., Kim, B.G., and Cho, N.H. (2020). ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 39, 664–676. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1014-0>.
- Takahashi, M. (1915). An experimental study of metastasis. *J. Pathol. Bacteriol.* 20, 1–13. <https://doi.org/10.1002/path.1700200102>.
- Takeda, T., Tsubaki, M., Sakamoto, K., Ichimura, E., Enomoto, A., Suzuki, Y., Itoh, T., Imano, M., Tanabe, G., Muraoka, O., et al. (2016). Mangiferin, a novel nuclear factor kappa B-inducing kinase inhibitor, suppresses metastasis and tumor growth in a mouse metastatic melanoma model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 306, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.07.005>.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>.
- Tegowski, M., and Baldwin, A. (2018). Noncanonical NF- κ B in Cancer. *Biomedicines* 6, 66. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020066>.
- Theilen, G.H., Zeigel, R.F., and Twiehaus, M.J. (1966). Biological studies with RE virus (strain T) that induces reticuloendotheliosis in turkeys, chickens, and Japanese quail. *J. Natl. Cancer Inst.* 37, 731–743. .
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147, 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>.
- Valiente, M., Obenauf, A.C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X.H.F., Lee, D.J., Chaft, J.E., Kris, M.G., Huse, J.T., Brogi, E., et al. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular Co-option in brain metastasis. *Cell* 156, 1002–1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040>.
- Valino-Rivas, L., Gonzalez-Lafuente, L., Sanz, A.B., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., and Sanchez-Nino, M.D. (2016). Non-canonical NF κ B activation promotes chemokine expression in podocytes. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28857>.
- Valiño-Rivas, L., Vaquero, J.J., Sucunza, D., Gutierrez, S., Sanz, A.B., Fresno, M., Ortiz, A., and Sanchez-Niño, M.D. (2019). NIK as a Druggable Mediator of Tissue Injury. *Trends Mol. Med.* 25, 341–360. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.02.005>.
- Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W.Z., Tseng, P.H., Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A.A., Bergsagel, P.L., and Karin, M. (2008). Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling. *Nat. Immunol.* 9, 1364–1370. <https://doi.org/10.1038/ni.1678>.

- Vazquez-Santillan, K., Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L.E., Gaytan-Cervantes, J., Muñoz-Galindo, L., Piña-Sanchez, P., Martinez-Ruiz, G., Torres, J., Garcia-Lopez, P., Gonzalez-Torres, C., et al. (2016). NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci. Rep.* *6*, 37340. <https://doi.org/10.1038/srep37340>.
- Wang, C., Shang, C., Gai, X., Song, T., Han, S., Liu, Q., and Zheng, X. (2021a). Sulfatase 2-Induced Cancer-Associated Fibroblasts Promote Hepatocellular Carcinoma Progression via Inhibition of Apoptosis and Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.631931>.
- Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S. (1999). NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* *19*, 5923–5929. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.5923>.
- Wang, H., Pan, J., Barsky, L., Jacob, J.C., Zheng, Y., Gao, C., Wang, S., Zhu, W., Sun, H., Lu, L., et al. (2021b). Characteristics of pre-metastatic niche: the landscape of molecular and cellular pathways. *Mol. Biomed.* *2*, 3. <https://doi.org/10.1186/s43556-020-00022-z>.
- Wang, M.-Y., Chen, P.-S., Prakash, E., Hsu, H.-C., Huang, H.-Y., Lin, M.-T., Chang, K.-J., and Kuo, M.-L. (2009). Connective Tissue Growth Factor Confers Drug Resistance in Breast Cancer through Concomitant Up-regulation of Bcl-xL and cIAP1. *Cancer Res.* *69*, 3482–3491. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2524>.
- Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K.H., Mineva, N.D., Galtier, F., Chalbos, D., and Sonenshein, G.E. (2007). Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat. Cell Biol.* *9*, 470–478. <https://doi.org/10.1038/ncb1559>.
- Weigel, K.J., Jakimenko, A., Conti, B.A., Chapman, S.E., Kaliney, W.J., Leevy, W.M., Champion, M.M., and Schafer, Z.T. (2014). CAF-secreted IGFBPs regulate breast cancer cell anoikis. *Mol. Cancer Res.* *12*, 855–866. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0090>.
- Willmann, K.L., Klaver, S., Do U, F., Santos-Valente, E., Garncarz, W., Bilic, I., Mace, E., Salzer, E., Domínguez Conde, C., Sic, H., et al. (2014). Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat. Commun.* *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms6360>.
- Wrenn, E.D., Yamamoto, A., Moore, B.M., Huang, Y., McBirney, M., Thomas, A.J., Greenwood, E., Rabena, Y.F., Rahbar, H., Partridge, S.C., et al. (2020). Regulation of Collective Metastasis by Nanolumenal Signaling. *Cell* *183*, 395–410.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.045>.

- Wu, S.Z., Al-Eryani, G., Roden, D.L., Junankar, S., Harvey, K., Andersson, A., Thennavan, A., Wang, C., Torpy, J.R., Bartonicek, N., et al. (2021). A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nat. Genet.* *53*, 1334–1347. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00911-1>.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (2001). NF- κ B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- κ B2 p100. *Mol. Cell* *7*, 401–409. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00187-3).
- Yamaguchi, N., Ito, T., Azuma, S., Ito, E., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J. ichi, Watanabe, S., et al. (2009). Constitutive activation of nuclear factor- κ B is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* *100*, 1668–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01228.x>.
- Yamaguchi, N., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., and Inoue, J. (2013). Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* *3*, 2568. <https://doi.org/10.1038/srep02568>.
- Yamamoto, M., Ito, T., Shimizu, T., Ishida, T., Semba, K., Watanabe, S., Yamaguchi, N., and Inoue, J. ichiro (2010). Epigenetic alteration of the NF- κ B-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci.* *101*, 2391–2397. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01685.x>.
- Yamamoto, M., Taguchi, Y., Ito-Kureha, T., Semba, K., Yamaguchi, N., and Inoue, J.I. (2013). NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3299>.
- Yamamoto, M., Abe, C., Wakinaga, S., Sakane, K., Yumiketa, Y., Taguchi, Y., Matsumura, T., Ishikawa, K., Fujimoto, J., Semba, K., et al. (2019). TRAF6 maintains mammary stem cells and promotes pregnancy-induced mammary epithelial cell expansion. *Commun. Biol.* *2*. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0547-7>.
- Yang, C., McCoy, K., Davis, J.L., Schmidt-Supprian, M., Sasaki, Y., Faccio, R., and Novack, D.V. (2010). NIK stabilization in osteoclasts results in osteoporosis and enhanced inflammatory osteolysis. *PLoS One* *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015383>.
- Yin, X., Luistro, L., Zhong, H., Smith, M., Nevins, T., Schostack, K., Hilton, H., Lin, T.A., Truitt, T., Biondi, D., et al. (2013). RG7212 anti-TWEAK mAb inhibits tumor growth through inhibition of tumor cell proliferation and survival signaling and by enhancing the host antitumor immune response. *Clin. Cancer Res.* *19*, 5686–5698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0405>.
- Yoneda, T., Williams, P.J., Hiraga, T., Niewolna, M., and Nishimura, R. (2001). A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a

brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* *16*, 1486–1495.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1486>.

Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W., Mak, T.W., et al. (2008). Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat. Immunol.* *9*, 1371–1378. <https://doi.org/10.1038/ni.1676>.

Zeng, R., Faccio, R., and Novack, D. V. (2015). Alternative NF- κ B Regulates RANKL-Induced Osteoclast Differentiation and Mitochondrial Biogenesis via Independent Mechanisms. *J. Bone Miner. Res.* *30*, 2287–2299. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2584>.

Zhang, H., Wong, C.C.L., Wei, H., Gilkes, D.M., Korangath, P., Chaturvedi, P., Schito, L., Chen, J., Krishnamachary, B., Winnard, P.T., et al. (2012). HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* *31*, 1757–1770. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.365>.

Zhang, J., Webster, J.D., Dugger, D.L., Goncharov, T., Roose-Girma, M., Hung, J., Kwon, Y.C., Vucic, D., Newton, K., and Dixit, V.M. (2019). Ubiquitin Ligases cIAP1 and cIAP2 Limit Cell Death to Prevent Inflammation. *Cell Rep.* *27*, 2679-2689.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.111>.

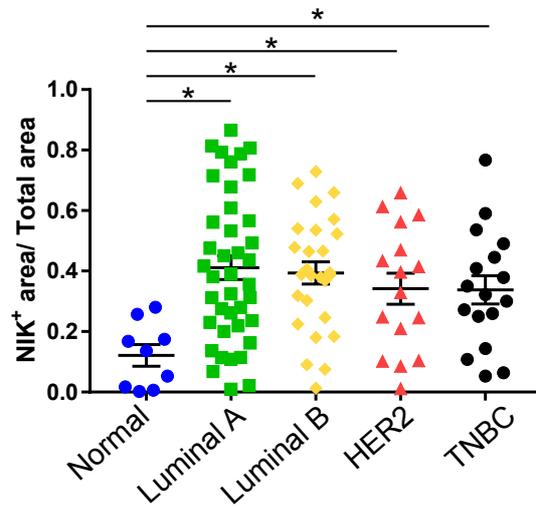
Zhang, W., Tan, W., Wu, X., Poustovoitov, M., Strasner, A., Li, W., Borcherdig, N., Ghassemian, M., and Karin, M. (2013). A NIK-IKK α Module Expands ErbB2-Induced Tumor-Initiating Cells by Stimulating Nuclear Export of p27/Kip1. *Cancer Cell* *23*, 647–659. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.012>.

Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* *527*, 525–530. <https://doi.org/10.1038/nature16064>.

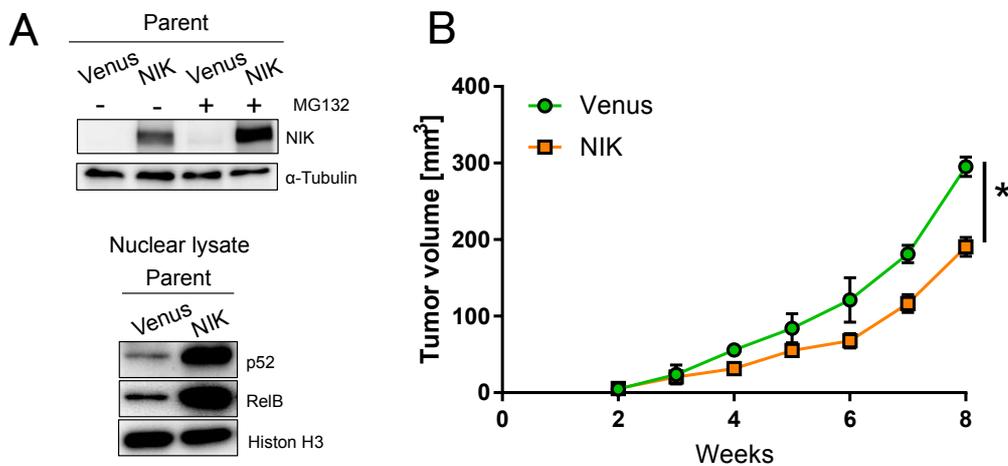
Zhu, S., Jin, J., Gokhale, S., Lu, A.M., Shan, H., Feng, J., and Xie, P. (2018). Genetic Alterations of TRAF Proteins in Human Cancers. *Front. Immunol.* *9*, 1–30. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02111>.

Zhuang, X., Zhang, H., Li, X., Li, X., Cong, M., Peng, F., Yu, J., Zhang, X., Yang, Q., and Hu, G. (2017). Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signalling inhibitor DKK1. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1274–1285. <https://doi.org/10.1038/ncb3613>.

第7章 補足図と表



補足図 1. 乳がん組織切片における各サブタイプの NIK 陽性面積の割合評価
 いずれのサブタイプにおいても、正常組織(Normal)に比べ、腫瘍組織を含む検体において NIK 陽性領域の割合が増加した。(n=10 Normal, n=39 LuminalA, n=27 LuminalB, n=17 HER2, and n=17 TNBC, Ordinary one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)



補足図 2. 親株(Parent)の NIK 過剰発現による造腫瘍能の低下

A. 親株の NIK 過剰発現した際における、NIK と NF- κ B2 (p52)と RelB のウェスタンブロット図

NIK 過剰発現によって、親株の NIK 増加、および下流の非古典的経路を構成する活性型 NF- κ B2 (p52)や RelB の核内移行量が増加した。(同一メンブレン)

B. NIK 過剰発現細胞株を同所性移植した際における造腫瘍曲線

NIK 過剰発現によって、造腫瘍能の低下が確認された。(Parent-Venus(n=2), Parent-NIK(n=2), two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

Hayashi et al.の図から引用 (Hayashi et al., 2023)。

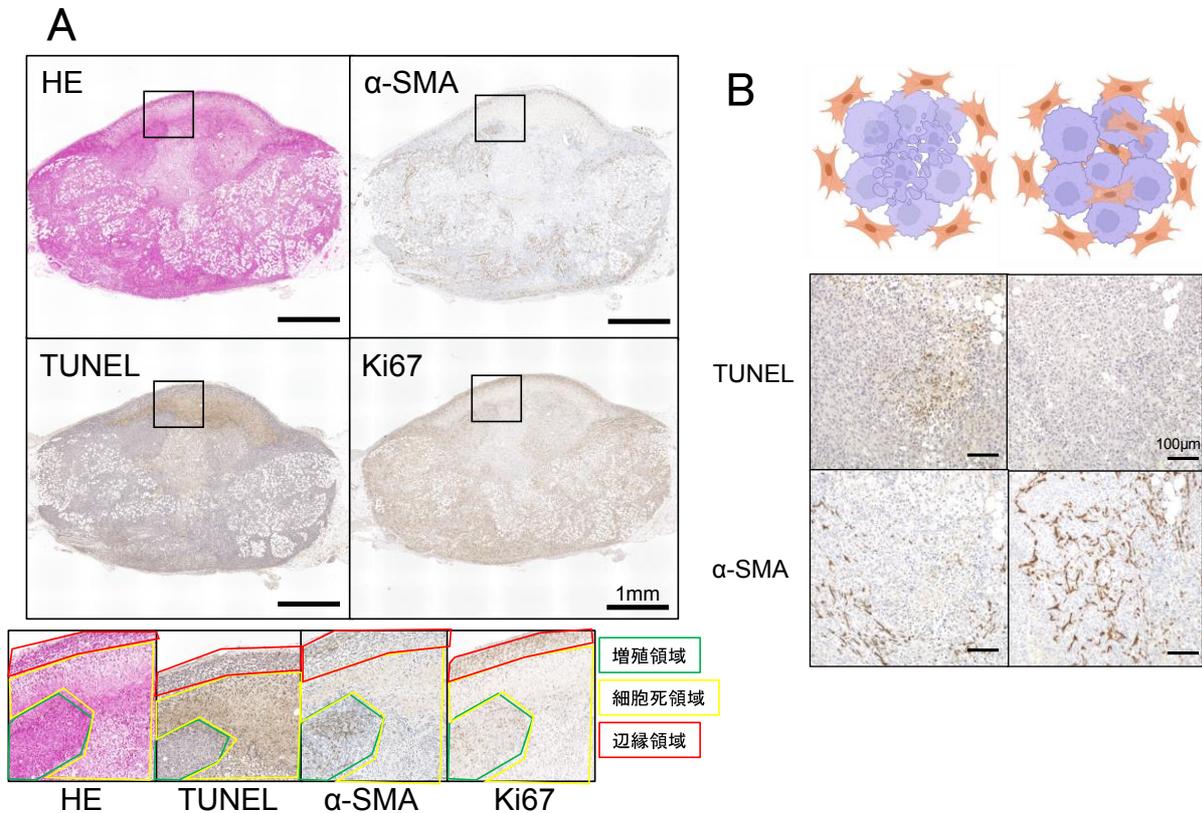


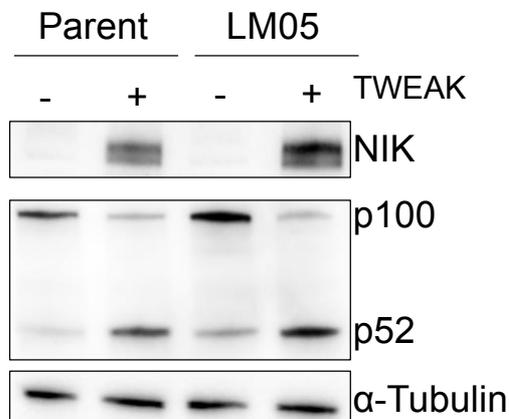
図 3.原発巣の連続切片を用いた細胞増殖、死細胞、CAF 領域の局在評価

A. 原発巣の連続切片における HE 染色、TUNEL 染色、 α -SMA と Ki67 抗体を用いた免疫染色図

がん細胞の増殖領域と辺縁領域では、Ki67 および α -SMA の発現が観察された一方で、TUNEL 陽性領域とは重なり合わなかった。

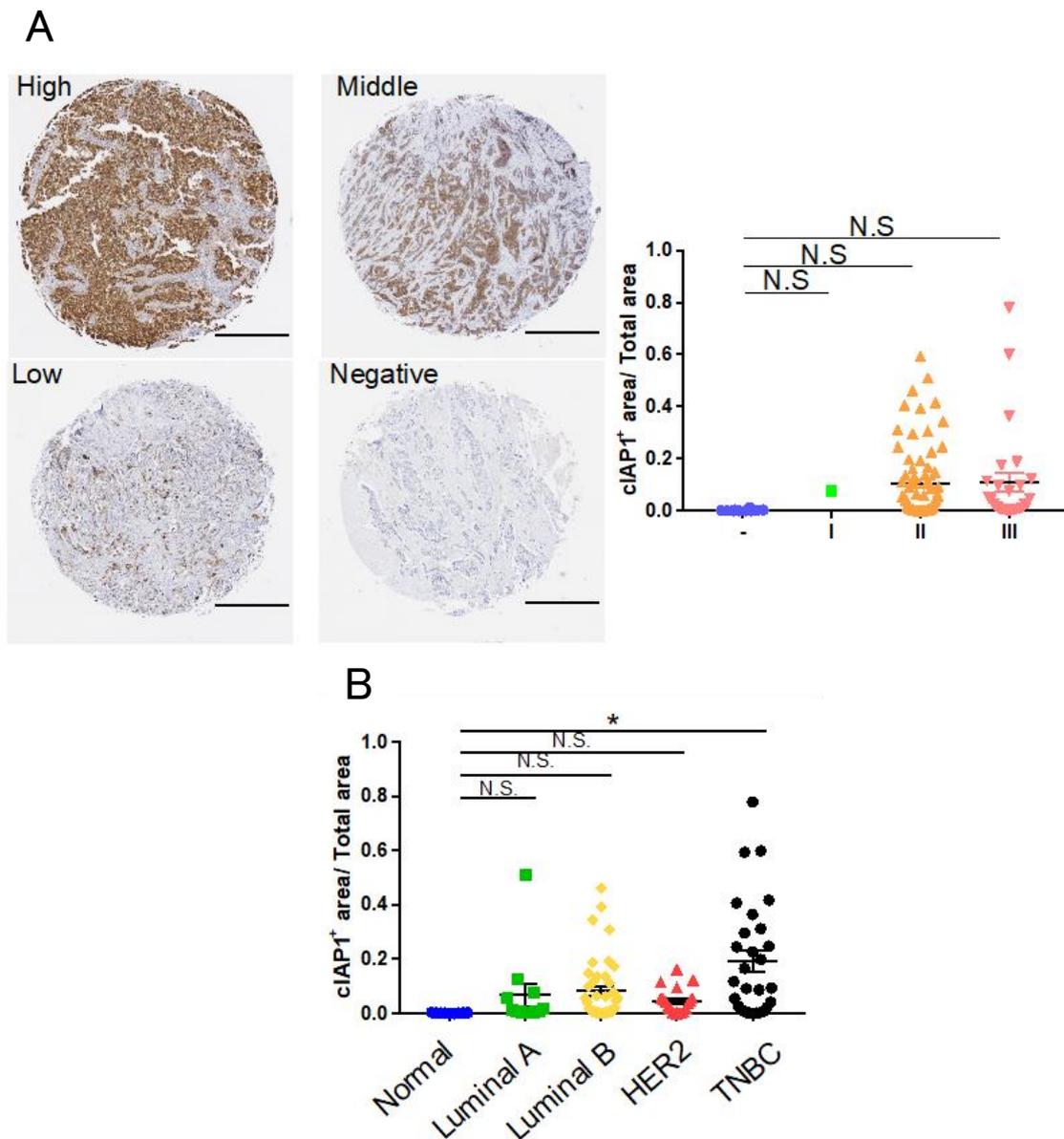
A. 原発巣の連続切片における CAF および死細胞領域の局在評価

CAF 集積領域では細胞死領域が低下していることが観察され、一方で、TUNEL 陽性領域には CAF の集積は認められなかった。



補足図 4.親株および LM05 における、TWEAK 添加時の非古典的経路の活性化

親株および LM05 に 100ng/mL TWEAK 刺激をした際に、NIK の蓄積および下流の NF- κ B2 (p52) 増加が確認された。また、親株に比べ、LM05 において TWEAK 刺激時における NIK や NF- κ B2 (p52) のタンパク質量が増加していた。(同一メンブレン)



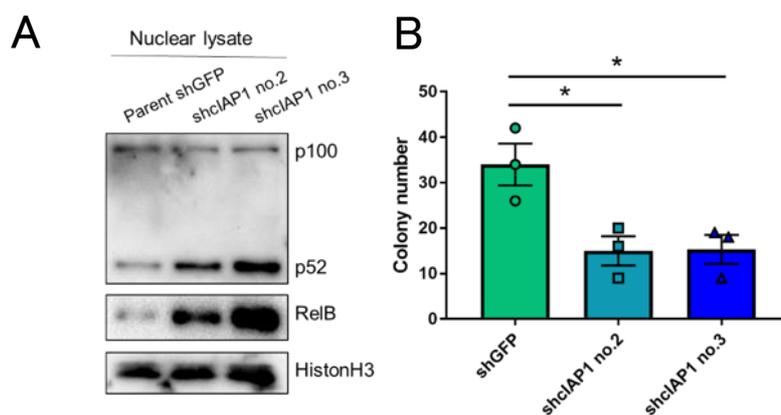
補足図 5. 乳がん組織切片の cIAP1 免疫染色像とその定量評価

A. 乳がん組織切片における cIAP1 免疫染色像と各 stage の cIAP1 陽性面積の割合評価
各検体において cIAP1 陽性領域が異なるが、正常組織(-)と、腫瘍組織を含む検体における cIAP1 陽性領域の割合に顕著な差異は見られなかった。bar = 500 μ m (n=10 normal, n=1 stage I, n=72 stage II, and n=27 stage III, Ordinary one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

B. 各サブタイプの cIAP1 陽性面積の割合評価

常組織(Normal)に比べ、TNBC サブタイプの腫瘍組織において cIAP1 陽性領域の割合が増加した。(n=10 Normal, n=12 LuminalA, n=41 LuminalB, n=19 HER2, and n=28 TNBC, Ordinary one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test)

Hayashi et al.の図から一部引用。



補足図 6. 親株(Parent)の cIAP1KD によるコロニー形成能の低下

A. 親株の cIAP1 KD した際における、NF- κ B2 (p52)と RelB のウェスタンブロット図

cIAP1 KD によって、下流の非古典的経路を構成する活性型 NF- κ B2 (p52)や RelB の核内移行量が増加した。

B. Soft agar assay における cIAP1KD 細胞株のコロニー形成数の定量評価

親株の cIAP1KD によって、soft agar 中のコロニー数が減少した。(n=3, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test)

表 1. ベクター作製のために用いたプライマー

名称	配列
TAP tag deletion Forward	GCAGTGATGGAAATGGCCTG
TAP tag deletion Reverse	CATGGCGGATCCTTAATTAAGTAGC
Sal I -Neo Forward	ACGCGTCGACAGCTGTGGAATGTGTGTC
Sal I -Neo Reverse	ACGCGTCGACATCGAAATCTCGTGATGGC
HA-UB cloning Forward	AGTTAATTAAGGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACG
HA-UB cloning Reverse	GAAGCTTGAGCTCGAGTTACCCACCTCTGAGACGGAG
pSuper Mlu I Forward	GGAAGATCTGTGGTCTCATAACAGAAC
pSuper Mlu I Reverse	ACGACGCGTATCGATACCGTCGACCTC
IGF2BP1 cloning Forward	AGTTAATTAAGGATCCATGAACAAGCTTTACATCGGCAAC
IGF2BP1 cloning Reverse	GAAGCTTGAGCTCGAGTCACTTCCTCCGTGCCTG

表 2. 各遺伝子を標的とした shRNA 配列

名称	配列
shNIK no.1	GCAGCTGGAAATAGAATTA
shNIK no.2	GAAGGCTCCCTGGTAGAATAC
shcIAP1 no.1	TCATTAAGTGTGTTTATAGTTC
shcIAP1 no.2	AAGCACCAAAGACAATTCGGC
shcIAP1 no.3	AGTCTGCTTTGGTACTAATAA
shGFP	ACAACAGCCACAACGTCTATA

表 3. ウェスタンブロッティングにおいて使用した抗体と条件

名称	メーカー	希釈 倍率	型番
p-EGFR (Y1068) (D7A5) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#3777
EGFR (D38B1) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4267
p-c-Raf (S338) (56A6) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9427
c-Raf (D5X6R) M mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#12552
p-MEK1/2 (S217/221) (41G9) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9154
MEK1/2 (L38C12) M mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4694
p-p44/42 MAPK (T202/Y204) (D13.14.4E) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4370
p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4695
p-JAK2 (Y1007/1008) (C80C3) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#3776
JAK2 (D2E12) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#3230
p-STAT1 (Ser727) R pAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9177
STAT1 R pAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9172
p-STAT3 (Y705) (D3A7) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9145
STAT3 (79D7) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4904
p-AKT (S473) (D9E) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4060
AKT (pan) (C67E7) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4691
p-mTOR (S2448) (D9C2) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#5536
mTOR (7C10) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#2983
p-p70 S6K (T389) (108D2) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9234
p70 S6K (49D7) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#2708
p-GSK-3 β (S9) (5B3) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9323
GSK-3 β (D5C5Z) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#12456
p-SAPK/JNK (T183/Y185) (81E11) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4668
SAPK/JNK (56G8) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9258
p-c-JUN (S73) (D47G9) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#3270
c-JUN (60A8) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9165
NF- κ B1 p105/p50 (D4P4D) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#13586
NF- κ B2 p100/p52 M mAb	Merck	1:2000	#05-361

表 3 の続き

名称	メーカー	希釈 倍率	型番
NOTCH1 (D1E11) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#3608
NOTCH3 (D11B8) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#5276
p-p38 MAPK (T180/Y182) (D3F9) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4511
p38 MAPK (D13E1) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#8690
p-CREB (S133) (87G3) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#9198
CREB (D76D11) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4820
NIK R pAb	Cell Signaling Technology	1:2000	#4994
TRAF2 (F-2) M mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	sc-136999
TRAF3 (E8H3B) R pAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#4729
c-IAP1 (F-4) M mAb	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	1:1000	sc-271419
c-IAP2 (58C7) R mAb	Cell Signaling Technology	1:1000	#3130
RelB R mAb	Cell Signaling Technology	1:2000	#4922
RelA/ NF- κ B p65 M mAb	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	1:1000	sc-8008
NF45 (H-4) M mAb	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	1:1000	sc-365283
IGF2BP1 (D-9) M mAb	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	1:1000	sc-166344
HIF1A	Cell Signaling Technology	1:1000	#36169
HA-probe (Y-11) R pAb	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	1:2000	sc-805
DYKDDDDK-tag (1E6) M mAb	FUJIFILM Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation	1:2000	014-22383
Histone H3 (D1H2) XP(R) R mAb	Cell Signaling Technology	1:2000	#4499
α -Tubulin (10G10) M mAb	FUJIFILM Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation	1:2000	013-25033
β -Actin (13E5) R mAb	Pure Chemical Corporation Cell Signaling Technology	1:2000	#4970

表 4. 免疫組織化学染色において使用した抗体と条件

名称	社名	希釈倍率	型番
α -SMA	Sigma-Aldrich	1:100	A2547
MMR/CD206	R&D System	1:50	AF2535
Ki-67	Abcam	1:200	ab16667
CAM5.2	BD Bioscience	原液	#349205
NIK	Sigma-Aldrich	1:50	HPA027269
cIAP1	Abcam	1:100	ab108361

表 5. リアルタイム PCR において使用したプライマー

名称	配列
NIK Forward	TTCAGCCCCACCTTTTCAG
NIK Reverse	ACGCTTTCCTTCCAACAC
cIAP1 Forward	TTCCAAGGTGTGAGTTCTTGATAC
cIAP1 Reverse	TCTCCAGTGGTATCTGAAGTTGAC
CXCL1 Forward	CCCAAACCGAAGTCATAGCC
CXCL1 Reverse	CAGGAACAGCCACCAGTGAG
CXCR4 Forward	CCTCTGACATTCACCAAGGTCTC
CXCR4 Reverse	CAAGATTTCCCTCCAGGTCCATC
IL6 Forward	GGTACATCCTCGACGGCATCT
IL6 Reverse	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
IGF2BP1 Forward	TGAGACGGCAGTGGTGAATG
IGF2BP1 Reverse	GTCCCTGTGCTATCTGCTCATC
β -actin Forward	GGAGGAGCTGGAAGCAGCC
β -actin Reverse	GCTGTGCTACGTCGCCCTG

表 6. 研究対象のシグナル経路における構成遺伝子のウェスタンブロット結果
(親株と比較し、 \log_2 FC 値を記載)

Name	LM05	LM1-2-1
p-EGFR(Y1068)	0.287	0.077
p-c-RAF(S338)	0.152	0.116
Name	LM05	LM1-2-1

表 6 の続き

p-MEK1/2(S217/221)	0.015	-0.070
p-ERK1/2(T202/Y204)	-0.129	-0.087
p-JAK2(Y1007/1008)	0.208	-0.120
p-STAT1(S727)	0.196	0.262
p-STAT3(Y705)	-0.183	0.155
p-AKT(S473)	0.446	0.204
p-mTOR(S2448)	0.009	-0.067
p-S6K(T389)	-0.011	0.010
p-GSK3B(S9)	0.354	0.180
p-SAPK/JNK(T183/185)	0.270	0.216
p-c-JUN(S73)	0.177	0.018
p50(NF- κ B1)	-0.126	-0.143
p52(NF- κ B2)	1.116	0.019
NOTCH1(NICD)	0.259	0.040
NOTCH3(NICD)	0.175	-0.120
p-p38(T180/182)	0.273	0.433
p-CREB(S133)	0.248	0.311

表 7. GSEA 解析による NIK ノックダウンによって抑制を受けたパスウェイ一覧

Name	NES	NOM p-val	FDR q-val
HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	1.9299747	0	0.004028283
HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	1.9148673	0.001788909	0.002714141
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	1.9007101	0	0.001809428
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NF- κ B	1.8954331	0	0.001357071
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	1.8647978	0	0.002242589
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	1.7439446	0	0.006220839
HALLMARK_COAGULATION	1.7017386	0.001672241	0.008939475
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.5756699	0	0.029181717
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	1.4861348	0.006430868	0.063371636
HALLMARK_COMPLEMENT	1.4472965	0.011235955	0.08092645
Name	NES	NOM	FDR q-val

表 7 の続き

		p-val	
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	1.428844	0.007751938	0.08631504
HALLMARK_NOTCH_SIGNALING	1.4078401	0.07835821	0.09223181

表 8. ヒト乳がん組織を用いた NIK の免疫染色結果

Sample number	Grade	NIK+ area/Total area
1	IIIA	0.379
2	IIA	0.475
3	IIA	0.609
4	IIA	0.767
5	IIB	0.788
6	IIA	0.356
7	IIA	0.478
8	IIA	0.466
9	IIB	0.729
10	IIIB	0.219
11	-	0.175
12	IIA	0.329
13	IIB	0.566
14	IIA	0.085
15	IIB	0.586
16	IIB	0.417
17	IA	0.719
18	IA	0.535
19	IIA	0.108
20	IIIA	0.109
21	IIA	0.313
22	-	0.257
23	IIB	0.102
24	IIA	0.114
25	IIA	0.406

表 8 の続き

Sample number	Grade	NIK+ area/Total area
26	IIIB	0.325
27	IA	0.390
28	IIA	0.246
29	IIB	0.068
30	IIIB	0.658
31	IIA	0.523
32	IIIA	0.184
33	-	0.281
34	IIA	0.053
35	IA	0.231
36	IIA	0.248
37	IIA	0.115
38	IIB	0.090
39	IIIB	0.540
40	IIA	0.678
41	IIIA	0.162
42	IIA	0.021
43	IIIB	0.690
44	-	0.053
45	IIA	0.388
46	IIIB	0.312
47	IIA	0.259
48	IIA	0.445
49	IIB	0.250
50	IB	0.381
51	IIIB	0.562
52	IIA	0.461
53	IIA	0.369
54	IIIB	0.280
55	-	0.168

表 8 の続き

Sample number	Grade	NIK+ area/Total area
56	IIB	0.533
57	IIIB	0.261
58	IIB	0.490
59	IIB	0.000
60	IIA	0.536
61	IIA	0.180
62	IIA	0.386
63	IIIB	0.762
64	IIA	0.379
65	IIIB	0.300
66	-	0.007
67	IIIB	0.396
68	IIA	0.275
69	IIA	0.590
70	IIA	0.807
71	IIA	0.136
72	IIA	0.437
73	IIA	0.388
74	IIA	0.272
75	IIIB	0.322
76	IIIB	0.659
77	-	0.136
78	IIA	0.225
79	IIA	0.465
80	IIA	0.303
81	IIB	0.571
82	IIA	0.210
83	IIB	0.394
84	IIIA	0.246
85	IIA	0.434

表 8 の続き

Sample number	Grade	NIK+ area/Total area
86	IIA	0.793
87	IIB	0.237
88	-	0.017
89	IIA	0.469
90	IIA	0.493
91	IIB	0.613
92	IIA	0.865
93	IIA	0.415
94	IIA	0.450
95	IA	0.629
96	IIIA	0.562
97	IIA	0.011
98	IIIB	0.200
99	-	0.010
100	IIIB	0.013
101	IIA	0.104
102	IIA	0.409
103	IIA	0.075
104	IIA	0.144
105	IIA	0.319
106	IIA	0.813
107	IIB	0.351
108	IIA	0.715
109	IIA	0.064
110	-	0.002

表 9. ヒト乳がん組織を用いた NIK と cIAP1 の免疫染色結果

Sample number	stage	cIAP1+ area/Total area	NIK+ area/Total area
1	IIA	0.040	0.094
2	IIIA	0.008	0.034
3	IIA	0.018	0.032
4	IIA	0.001	0.084
5	IIB	0.112	0.024
6	IA	0.076	0.133
7	IIB	0.012	0.195
8	IIIA	0.115	0.374
9	IIA	0.002	0.604
10	IIA	0.003	0.131
11	-	0.001	0.004
12	IIA	0.049	0.205
13	IIA	0.002	0.019
14	IIIA	0.016	0.000
15	IIIA	0.045	0.079
16	IIA	0.055	0.015
17	IIA	0.019	0.402
18	IIIA	0.005	0.152
19	IIB	0.000	0.000
20	IIA	0.000	0.055
21	IIIB	0.779	0.209
22	-	0.002	0.001
23	IIB	0.002	0.001
24	IIB	0.004	0.006
25	IIA	0.055	0.157
26	IIA	0.065	0.122
27	IIA	0.056	0.001
28	IIB	0.092	0.152
29	IIA	0.094	0.010
30	IIA	0.296	0.059

表 9 の続き

Sample number	stage	cIAP1+ area/Total area	NIK+ area/Total area
31	IIIA	0.047	0.100
32	IIA	0.462	0.071
33	-	0.000	0.004
34	IIA	0.005	0.004
35	IIA	0.022	0.096
36	IIA	0.017	0.103
37	IIA	0.118	0.018
38	IIIA	0.025	0.132
39	IIIB	0.123	0.537
40	IIIA	0.599	0.365
41	IIA	0.393	0.406
42	IIA	0.150	0.062
43	IIIB	0.002	0.050
44	-	0.001	0.002
45	IIIB	0.135	0.027
46	IIA	0.014	0.158
47	IIA	0.005	0.004
48	IIA	0.056	0.144
49	IIA	0.312	0.028
50	IIIB	0.008	0.011
51	IIIB	0.006	0.358
52	IIIA	0.052	0.057
53	IIIA	0.012	0.039
54	IIA	0.087	0.065
55	-	0.004	0.000
56	IIIA	0.188	0.038
57	IIA	0.002	0.069
58	IIIA	0.024	0.310
59	IIA	0.001	0.017
60	IIA	0.002	0.162

表 9 の続き

Sample number	stage	cIAP1+ area/Total area	NIK+ area/Total area
61	IIIA	0.009	0.057
62	IIA	0.000	0.015
63	IIA	0.166	0.266
64	IIIA	0.008	0.012
65	IIIB	0.096	0.060
66	-	0.000	0.002
67	IIIB	0.002	0.000
68	IIIA	0.365	0.001
69	IIA	0.002	0.063
70	IIB	0.193	0.089
71	IIA	0.345	0.129
72	IIIB	0.175	0.000
73	IIA	0.417	0.348
74	IIB	0.046	0.034
75	IIA	0.115	0.641
76	IIB	0.061	0.153
77	-	0.013	0.019
78	IIA	0.008	0.023
79	IIA	0.042	0.059
80	IIA	0.161	0.017
81	IIA	0.000	0.019
82	IIIA	0.003	0.219
83	IIIA	0.000	0.003
84	IIIC	0.077	0.007
85	IIIB	0.098	0.127
86	IIA	0.510	0.450
87	IIA	0.002	0.000
88	-	0.001	0.000
89	IIB	0.008	0.000
90	IIB	0.055	0.055

表 9 の続き

Sample number	stage	cIAP1+ area/Total area	NIK+ area/Total area
91	IIB	0.053	0.236
92	IIA	0.137	0.077
93	IIA	0.125	0.065
94	IIB	0.006	0.171
95	IIA	0.245	0.296
96	IIA	0.007	0.097
97	IIA	0.594	0.099
98	IIIA	0.026	0.001
99	-	0.003	0.003
100	IIB	0.227	0.016
101	IIA	0.057	0.007
102	IIB	0.000	0.092
103	IIA	0.001	0.002
104	IIB	0.199	0.279
105	IIIA	0.006	0.048
106	IIB	0.036	0.153
107	IIB	0.307	0.238
108	IIA	0.406	0.250
109	IIB	0.247	0.500
110	-	0.002	0.004

謝辞

研究内容のみならず進路や、様々な物事に対する価値観に関してアドバイスやご指導していただいた仙波憲太郎先生に深く感謝申し上げます。また、博士後期課程からは、技術的な内容を始め、一人の研究者としての在り方や他愛のない話まで相談に乗っていただいた国立がん研究センター 山本雄介先生に厚く御礼申し上げます。そして、自身の至らなかった実験結果に対する考察や、研究の方向性に関して様々なアドバイスをしてくださった藤元次郎先生、石川公輔先生に感謝申し上げます。そして、研究内容から実験方法までの全般のご指導していただいた中山淳博士に感謝の意を申し上げます。また、本研究において過剰発現やノックダウン実験を行うにあたり、各ベクターを分与していただいた東京大学医科学研究所 井上純一郎教授、山本瑞生博士、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 東山繁樹教授、慶應義塾大学 前川大志博士に深く感謝申し上げます。そして何より、研究生活を有意義にかつ楽しく過ごす環境を作っていただいた先輩方、後輩、いつも笑顔が絶えず、とても楽しく生活を送らせてもらった同期の皆様に感謝申し上げます。最後に、研究活動でどんなに忙しく疲れていても、温かく手厚いサポートをしてくれた母、父、ペットに感謝いたします。ありがとうございました。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名： 林 祐介 印

(2023年 4月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文	<p>○1. <u>Hayashi Y</u>, Nakayama J, Yamamoto M, Maekawa M, Watanabe S, Higashiyama S, Inoue J, Yamamoto Y, Semba K. Aberrant accumulation of NIK promotes tumor growth by dysregulating translation and post-translational modifications in breast cancer. <i>Cancer Cell Int</i>. 2023 Mar;23(57). doi: 10.1186/s12935-023-02904-y.</p> <p>2. Watanabe N, Fujita Y, Nakayama J, Mori Y, Kadota T, <u>Hayashi Y</u>, Shimomura I, Ohtsuka T, Okamoto K, Araya J, Kuwano K, Yamamoto Y. Anomalous Epithelial Variations and Ectopic Inflammatory Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i>. 2022 Dec;67(6):708-719. doi: 10.1165/rcmb.2021-0555OC.</p> <p>3. Yoshida K, Yokoi A, Yamamoto T, <u>Hayashi Y</u>, Nakayama J, Yokoi T, Yoshida H, Kato T, Kajiyama H, Yamamoto Y. Aberrant Activation of Cell-Cycle-Related Kinases and the Potential Therapeutic Impact of PLK1 or CHEK1 Inhibition in Uterine Leiomyosarcoma. <i>Clin Cancer Res</i>. 2022 Mar;28(10):2147-2159. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0100.</p> <p>4. Nakayama J, Saito R, <u>Hayashi Y</u>, Kitada N, Tamaki S, Han Y, Semba K, Maki SA. High Sensitivity In Vivo Imaging of Cancer Metastasis Using a Near-Infrared Luciferin Analogue seMpai. <i>Int J Mol Sci</i>. 2020 Oct;21(21):7896. doi: 10.3390/ijms21217896.</p> <p>5. Han Y, Nakayama J, <u>Hayashi Y</u>, Jeong S, Futakuchi M, Ito E, Watanabe S, Semba K. Establishment and characterization of highly osteolytic luminal breast cancer cell lines by intracaudal arterial injection. <i>Genes Cells</i>. 2020 Feb;25(2):111-123. doi: 10.1111/gtc.12743.</p>
講演	<p>1. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 山本 雄介, 「Cell-in-Cell現象に着目した乳がん細胞株の性状解析」, 『第81回日本癌学会学術総会』, 2022年10月, (ポスター発表, P-3181)</p>
国内学会	<p>2. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 山本 瑞生, 山本 雄介, 井上 純一郎, 仙波 憲太郎, 「同所性乳がん肺転移株におけるNIKの機能解析」, 『第80回日本癌学会学術総会』, 2021年10月, (口演発表, J10-2-2)</p> <p>3. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 山本 瑞生, 山本 雄介, 井上 純一郎, 仙波 憲太郎, 「同所性乳がん肺転移株におけるシグナル解析」, 『第44回日本分子生物学会年会』, 2021年12月, (ポスター発表, 2P-0558)</p> <p>4. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 山本 瑞生, 山本 雄介, 井上 純一郎, 仙波 憲太郎, 「同所性移植手法を用いた乳がん肺転移株のシグナル解析」, 『第79回日本癌学会学術総会』, WEB開催, 2020年10月, (口頭発表, OJ10-2-5)</p> <p>5. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 「乳がん肺高転移株における殺細胞性抗がん剤耐性機構と細胞増殖機構の解明」, 『第24回日本がん分子標的治療学会学術総会』, WEB開催, 2020年10月, (ポスター発表, P9-4)</p> <p>6. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 「乳がん肺高転移株における殺細胞性抗がん剤耐性機構と細胞増殖機構の解明」, 『第29回日本がん転移学会学術集会・総会』, WEB開催, 2020年7月, (要旨掲載)</p> <p>7. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 「同所性移植手法を用いた乳がん肺転移株のシグナル解析」, 『第72回日本細胞生物学会大会』, WEB開催, 2020年6月, (要旨掲載)</p> <p>8. <u>林 祐介</u>, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 「同所性移植手法を用いた乳がん肺高転移株の性状解析」, 『文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」2019年度若手支援技術講習会』, 2019年9月, (口頭発表, OS-1)</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 林 祐介 印

(2023年 4月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	9. 林 祐介, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 「同所性移植手法を用いた乳がん肺高転移株の性状解析」, 『第28回日本がん転移学会学術集会・総会』, 鹿児島県, 2019年7月, (口頭発表, WS07-3)
	10. 林 祐介, 中山 淳, 仙波 憲太郎, 「乳がん同所性肺高転移株の性状解析」, 『第一回がん代謝研究会・若手の会』, 東京都, 2018年1月, (口頭発表, ST-17)