

上皮細胞を用いたスクリーニングによる新規がん遺伝子

HNF1B の同定とその機能解析

Identification and functional analysis of a novel oncogene *HNF1B*

by screening with epithelial cells

2016年6月

松井 貴香

Atsuka MATSUI

上皮細胞を用いたスクリーニングによる新規がん遺伝子

HNF1B の同定とその機能解析

Identification and functional analysis of a novel oncogene *HNF1B*

by screening with epithelial cells

2016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

松井 貴香
Atsuka MATSUI

目次

第一章 序文

1.1. がん遺伝子とその評価法	3
1.2. がんの浸潤・転移とその評価方法	6
1.3. ヒトがんにおける遺伝子異常	8
1.4. 17q12-21 の driver 遺伝子 <i>ERBB2</i>	11
1.5. アンプリコン17q12-21に存在する複数のがん関連遺伝子	13
1.6. 本研究の目的	14

第二章 材料と方法

2.1. 細胞培養	16
2.2. DNA ベクター構築と抗体	17
2.3. レトロウイルスパッケージングと感染	19
2.4. shRNA ベクターによるノックダウン	19
2.5. フォーカスフォーメーションアッセイ	19
2.6. ソフトアガーアッセイ	20
2.7. スクリーニング	20
2.8. ウェスタンブロッティング	21
2.9. 三次元培養による浸潤アッセイ	21
2.10. マイクロアレイ解析	21
2.11. 定量性 RT-PCR	22
2.12. クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ	22
2.13. マウス実験 (異所性移植と同所性移植、尾静脈移植)	23
2.13.1. 異所性移植	23
2.13.2. 同所性移植	24
2.13.3. 尾静脈移植	24
2.13.4. Bioluminescence imaging	24
2.14. 組織切片の作製	24

2.15. 免疫蛍光染色	24
2.16. 統計処理	26
第三章 結果	
3.1. NMuMG 細胞株を用いたトランスフォーメーションアッセイの確立	27
3.2. <i>HNF1B</i> の同定と <i>HNF1B</i> の過剰発現による接触阻止の消失	27
3.3. <i>HNF1B</i> による EMT と浸潤能の誘導	31
3.4. <i>HNF1B</i> による STAT3 のリン酸化の誘導	34
3.5. <i>HNF1B</i> による遺伝子発現ネットワーク	37
3.5.1. <i>HNF1B</i> による Δ Np63 と ETS1 の発現制御とその意義	40
3.5.2. <i>HNF1B</i> による EMT 誘導因子の発現制御	44
3.6. <i>HNF1B</i> による ERBB2 依存的腫瘍形成の促進	46
3.7. ホメオボックス遺伝子のトランスフォーミング活性	56
第四章 考察	
4.1. NMuMG 上皮細胞を用いることの意義	60
4.2. 本スクリーニング法の改善点	60
4.3. アンプリコンのスクリーニングの意義	61
4.4. <i>HNF1B</i> の転写制御によるトランスフォーム活性と EMT 誘導	63
4.5. ホメオボックス遺伝子のがんにおける意義	65
4.5.1. ホメオボックス遺伝子と STAT3 リン酸化の関連性	65
4.5.2. トランスフォーム活性をもつホメオボックス遺伝子の特徴	67
4.5.3. ホメオボックス遺伝子の発現組織とトランスフォーミング活性について	69
4.6. がん転移における <i>HNF1B</i> の機能	70
4.7. 予後因子としての <i>HNF1B</i> の意義	71
結論	73
参考文献	75
謝辞	85
表	86

1. 序論

1.1. がん遺伝子とその評価法

遺伝的変異や後天的な変化は正常な細胞を腫瘍細胞へと変える。機能獲得型 (gain-of-function) の変異によって活性化してがん化を誘導する遺伝子のがん原遺伝子 (proto-oncogene)、活性化されたがん原遺伝子のがん遺伝子 (oncogene) と言う。逆に、機能欠損型 (loss-of-function) の変異によって腫瘍形成に関わる遺伝子は腫瘍抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) と言う。がん遺伝子 *src* は、1909年に P. Rous によって始まった Rous 肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus, RSV) の研究、すなわちウイルス発がんの研究から発見されたものである (Martin, 2004)。RSV は RNA をゲノムとするトリ白血球ウイルス (avian leukosis virus, ALV) が、トリゲノムからがん原遺伝子 (proto-*src*, *c-src*) を自らのゲノムに取り込むことによって誕生した。このウイルスへの取り込みの際に、*c-src* が指令する *c-Src* タンパク質のもつチロシンキナーゼ活性を負に制御するカルボキシ末端のチロシン残基 (Tyr-527) を含むアミノ酸配列が失われることで *c-Src* のチロシンキナーゼ活性が亢進し、がんウイルスとなる。さらに、ウイルスゲノムの複製の過程で起きる点変異の導入が *c-src* 遺伝子をさらに強力ながん遺伝子に変化させている。このようにウイルスのもつ *src* 遺伝子は多数の変異を含み、本来持つチロシンキナーゼ活性を亢進させているので、トリゲノムに存在する *c-src* と区別して *v-src* (viral *src*) という。

CEF (chicken embryo fibroblast) などの正常な細胞は、培養皿に播くと培養皿の底すべてをおおいつくすまで増殖し、培養皿一杯の (コンフルエントな) 状態になると接触阻止 (密度阻止あるいは局所阻止ともいう) によって単層を形成して増殖を停止する。しかし、RSV 感染 CEF 細胞は *v-src* の働きにより接触阻止の性質を失い、コンフルエントな状態になっても増殖を続け幾層にも重なった細胞の塊、すなわちフォーカスを形成する (Martin, 2004)。このフォーカス形成時の細胞の形態変化を形質転換 (トランスフォーメーション) という。フォーカスの数や細胞の形態からウイルスの量やトランスフォーメーション能の強度を評価できることから、フォーカス形成を調べる実験系 (フォーカスアッセイ) は、細胞のトランスフォーメーションを調べるのに最もよく使われ

る (図 1)。RSV感染細胞は顕微鏡下ではニワトリの肉腫から単離された細胞と類似していたことから、H. Rubin、H. Teminらは、細胞のトランスフォーメーションの過程は、人工的な培養皿の環境でも再現できることを示し、がんを *in vitro* で解析する研究基盤を確立した (Weinberg, 2014)。1960年にB.H.SweetとM.Hillemanによって発見されたSV40ウイルスの場合も、SV40でトランスフォーメーションした細胞も大きく形が変化し、フォーカスを作った。したがって、この接触阻止の消失はウイルスでトランスフォーメーションした細胞に共通に見られる変化の一つだと考えられる。

がん細胞の特性にもとづき、がん遺伝子を評価するさまざまな実験系が確立されている。正常の線維芽細胞や上皮細胞は、増殖するためには培養皿のような固い基質に接着することが必要である (足場依存性増殖)。したがって、正常細胞を寒天ゲル中に浮遊させると増殖することはできないが、RSVでトランスフォーメーションした細胞は増殖して何十〜何百もの細胞からなる球状のコロニーを形成する。この能力を足場非依存性の形質といい、コロニーの数を数えることでトランスフォーメーション能を定量的に評価するアッセイをソフトアガーアッセイ (コロニーアッセイ) という (図 1)。細胞が試験管内 (*in vitro*) で足場非依存的に増殖できるこの能力と、その細胞を宿主動物に注入した後に生体内 (*in vivo*) で腫瘍を形成する能力とは、よく一致することが知られている。最近では、これらのアッセイ系以外にも細胞外マトリックスで構成されたマトリゲルに細胞を埋め込み、細胞外基質に囲まれた状態で細胞を培養する三次元培養によって、乳腺の乳管構造を模倣した中空の構造 (スフィア) を形成させる実験系も用いられている。この系では、正常細胞は極性を維持し、ラミニン、コラーゲンIVなどのマトリゲルの基底膜成分と接触した細胞は増殖できるが内側の細胞には細胞死が誘導されることによって、スフィアを形成する。しかし、がん化した細胞はこの微小環境に適応して生存・増殖し、管腔内部が細胞で満たされる (Espina and Liotta, 2011)。乳がんの発がん過程の初期に見られる非浸潤性乳管癌 (Ductal carcinoma *in situ*, DCIS) の誘導能を評価できる系である。細胞外基質にはコラーゲン I が豊富にあることが知られており、がん細胞が間質中を浸潤するためにはコラーゲン I が必要であると言われているが (Egeblad et al., 2010)、マトリゲルに含まれているコラーゲン I は少ない。そのため、マトリゲルにコラーゲン I を混ぜ、結合組織を模倣することによって、がん細胞が基質を分解しながら、増殖、浸潤していく過程、すなわち、がんの悪性化の程度を評価する

系としても用いることができる (図 1)。さらに、マウスを用いた *in vivo* での造腫瘍能

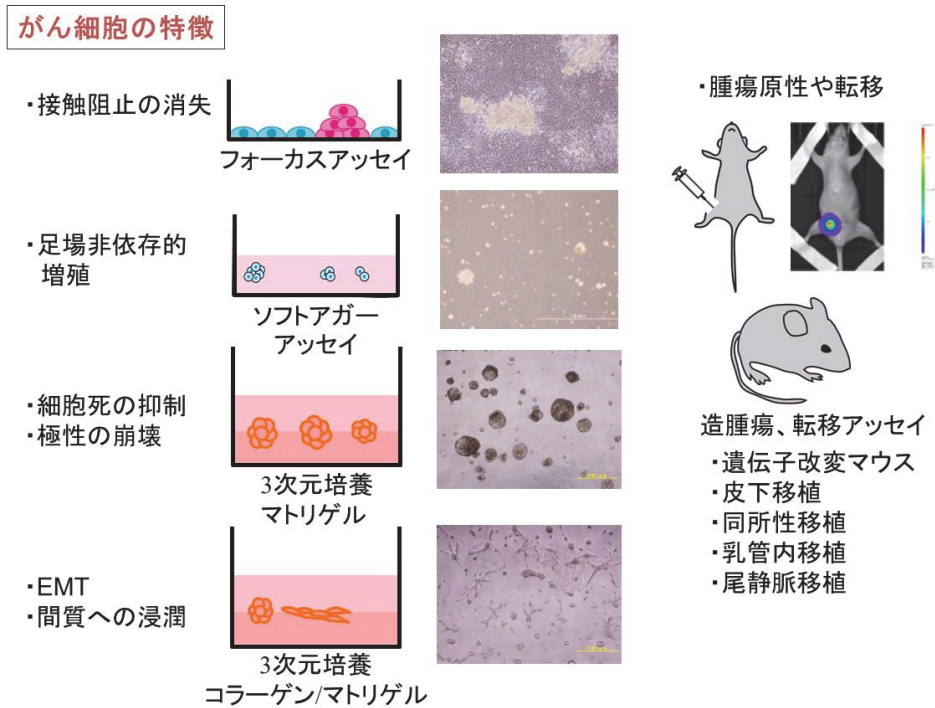


図 1. がん研究における評価系

がん細胞の特徴である「接触阻止の消失」、「足場非依存的増殖能」、「異常な増殖能」、「間質への浸潤能」、「腫瘍原性」の評価系を示す。

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

を評価する実験系として、遺伝子改変マウス、皮下に細胞を移植する異所性移植や本研究では乳腺のfatpadに移植する同所性移植 (orthotopic transplantation)、乳管に直接細胞を打ち込む乳管内移植 (intraductal injection)などが知られている (図 1)。

1.2. がんの浸潤・転移とその評価方法

がん患者の死因の90%以上は転移が原因とされている (Chaffer and Weinberg, 2011; Wirtz et al., 2011)。特に、乳がんでは肺、骨、脳、リンパ節への転移がよく報告される (Valastyan and Weinberg, 2011)。転移に関わる現象として、上皮間葉移行 (epithelial to mesenchymal transition, EMT)が知られている。EMTは、細胞極性を持ち不動性の上皮系細胞が運動性の間葉系細胞様の性質を獲得することで、運動能や浸潤能を得て転移へとつながる現象のことである (Thiery et al., 2009; Wendt et al., 2014)。最近では、EMTを誘導する因子 (EMT誘導転写因子*SNAIL1*や*SNAIL2*など)の一部に、がん細胞の幹細胞化を促進する機能が見いだされており (Mani et al., 2008)、がんの悪性化への関連性が指摘されている。現在、がんの転移には (1) 局所浸潤と血管、リンパ管の新生、(2) 血管やリンパ管への浸潤、(3) 血管やリンパ管での生存、(4) 血管、リンパ管外浸潤、(5) 遠方臓器への生着、(6) 微小転移巣の形成、転移コロニーの形成、と複雑かつ多くのステップを踏むことが必要であると考えられている (Chaffer and Weinberg, 2011; Wirtz et al., 2011) (図 2)。最近では、転移の各ステップを制御する因子が同定されてきている。例えば、*VEGF*は血管やリンパ管新生、血管外への輸送に関わる因子、*LOX*は臓器への生着に必要とされる因子 (Chanmee et al., 2014)、*P2Y2*は血管外への浸潤輸送に関わる因子として報告されている (Schumacher et al., 2013)。抗VEGF抗体のベバシズマブやVEGFのシグナル伝達阻害薬スニチニブなど、転移に関わる因子に対する治療薬の開発も行われてきている (Quail and Joyce, 2013)、有効な分子標的薬を開発するためにも転移のメカニズムを解明することは今後のがん治療に向けた重要な課題である。

実際にこれらの因子を評価するための手法として、*in vitro*では前述の三次元培養による浸潤のアッセイや均一なサイズの微細孔を多数持ったフィルターメンブレンを用いて、マトリゲルやコラーゲンをコートしたメンブレンの上に細胞を播種し、浸潤能をもった細胞がフィルターを潜り抜けて移動することを利用したボイデンチャンバー

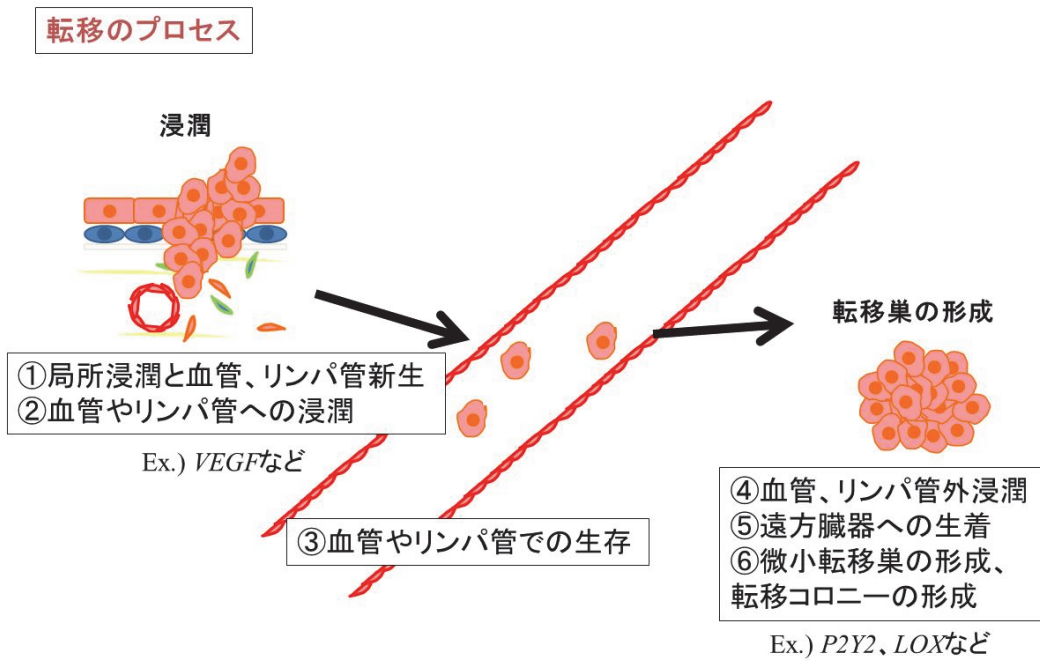


図 2. がん転移のプロセス

転移には 6 つのプロセスが必要であることが知られており、それらのプロセスを制御する因子のいくつかを示す。

アッセイなどがあるが、これらは転移時の微小環境を模倣していない状況で転移プロセスの一部（血管浸潤や局所浸潤など）を評価する方法となっている。*in vivo*では同所性移植や尾静脈注射、動脈注射、心臓への注射などによって転移の評価を行うことができる。同所性移植や乳管内移植は原発巣の形成から遠位臓器でのコロニー形成と腫瘍形成からすべての転移プロセスを評価できるアッセイとなっているが、どのプロセスに関わる因子であるかを特定することが難しい面や腫瘍形成能に差があると純粋な転移能の評価が難しい面がある。一方で、尾静脈注射や動脈注射、心臓への注射は血管中に同等の細胞数を注射することで先の問題点である腫瘍形成能の差を除くことができ、転移のステップの後半（3）～（6）を評価することができるが、評価したい遺伝子が転移のステップの前半（1）、（2）に関わるような因子であれば評価できないアッセイとなる。このようにこれらのアッセイはそれぞれに転移能の一部を評価するアッセイであることから、本研究では、同所性移植と尾静脈注射のアッセイを用いることで転移に関する評価をしていくことにする。

1.3. ヒトがんにおける遺伝子異常

RSV の発見以降 1960 年代までにはさまざまながんウイルスが発見されていたが、ヒトゲノムからがん原遺伝子を取り込んでがん化能を獲得したレトロウイルスは発見されなかった。現在においては、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスとしてヒト T 細胞白血病ウイルス (human T-cell leukemia virus type I, HTLV-I) が知られているが、白血病の発症に関わる遺伝子はヒトゲノム由来ではない。1980 年代、ヒトのがんに遺伝子変異があるかどうかを解析するために、がん細胞から抽出したゲノム DNA を不死化したマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞株へ遺伝子導入する実験が行われた。その結果、正常なゲノム DNA を導入した細胞と異なり、がんゲノムの DNA が導入された細胞はフオーカスを形成した。このことからがんのゲノム DNA には変異遺伝子が存在することが想定された。その後、ヒトの膀胱がん細胞などから変異遺伝子（がん遺伝子）が単離され、マウスのレトロウイルスとして見つかったがん遺伝子 *RAS* が“再発見”された。興味深いことに、*RAS* タンパク質の 1 つのアミノ酸の変異（12 番目のアミノ酸、グリシンがバリンへ変異）が NIH3T3 細胞をトランスフォームさせるのに十分であった (Reddy et al., 1982; Tabin et al., 1982)。この発見はウイルス発がんヒトの発がん

が共通の機構によることを強く支持し、これ以降、後述のように *RAS* をはじめとしてレトロウイルスのがん遺伝子として見つかった遺伝子が、ヒトのがんでも変異していることが明らかにされていった。

ヒトのがんにおいて、細胞内に元々存在しているがん原遺伝子からがん遺伝子へと変換する変異は大きく分けて3つに分類される(図3)。(1)点変異や欠損などのDNA配列の変異:この変異により機能が活性化したタンパク質を生じる (*gain-of-function*)。前述の*RAS*遺伝子 (*HRAS*, *KRAS*遺伝子) や *ERBB1* (EGF受容体) 遺伝子などがこれに属する。また、*RAF*遺伝子のパラログ(遺伝子重複によって生じた二つの遺伝子)である*BRAF*はメラノーマの20-30%で活性化変異が見つかった。(2) DNAの切断と再結合を含む染色体の再編成:この変異はタンパク質のコード領域を変化させ活性化した融合タンパク質を生じさせたり、異なるプロモーターによって正常なタンパク質の過剰産生を引き起こす。*BCR-ABL*、*MYC*がこれに属する。いずれもがんウイルスのがん遺伝子として発見された遺伝子である。(3) 遺伝子増幅:この変異はDNA複製のエラーによって起き、余分な遺伝子コピーを産生することで正常なタンパク質過剰産生を引き起こす (Santarius et al., 2010)。これまでに、*MYC*以外にも、*MYC*のパラログとして発見された*MYCN*や*ERBB1* (EGF受容体) 遺伝子のパラログとして発見された*ERBB2*などの遺伝子増幅が知られている (Matsui et al., 2013)。このようにウイルスのがん遺伝子として見つかった遺伝子の多くがヒトのがんでも変異していることが明らかになっているが、近年、がんウイルスのがん遺伝子として見つかっていない遺伝子の変異も見ついている。例えば、ヒトリンパ腫や肺がんの解析から染色体転座によって活性化する遺伝子として*ALK*が発見されている (Fujimoto et al., 1996; Soda et al., 2007)。最近塩基配列の解読技術が飛躍的に向上し、多数のがんのゲノム配列から点変異や欠失変異、染色体の再編成によって生じる遺伝子異常が見いだされている。これらの変異遺伝子は直接的にその遺伝子の発がんとの関連性が疑われる。しかしながら、遺伝子増幅の場合は、数十にもおよぶ遺伝子が同時に増幅し過剰発現することから、発がんに関与するがん遺伝子 (*driver*遺伝子ともいう) を直ちに決めることは困難で、*driver*遺伝子を絞り込む戦略を立てる必要がある。

DCIS (Ductal carcinoma *in situ*) と IBC (Invasive breast cancer) における遺伝子異常の起きる割合を比較すると DCISよりも IBCの方が増加しているが、遺伝子増幅の

がんで見られる遺伝子異常

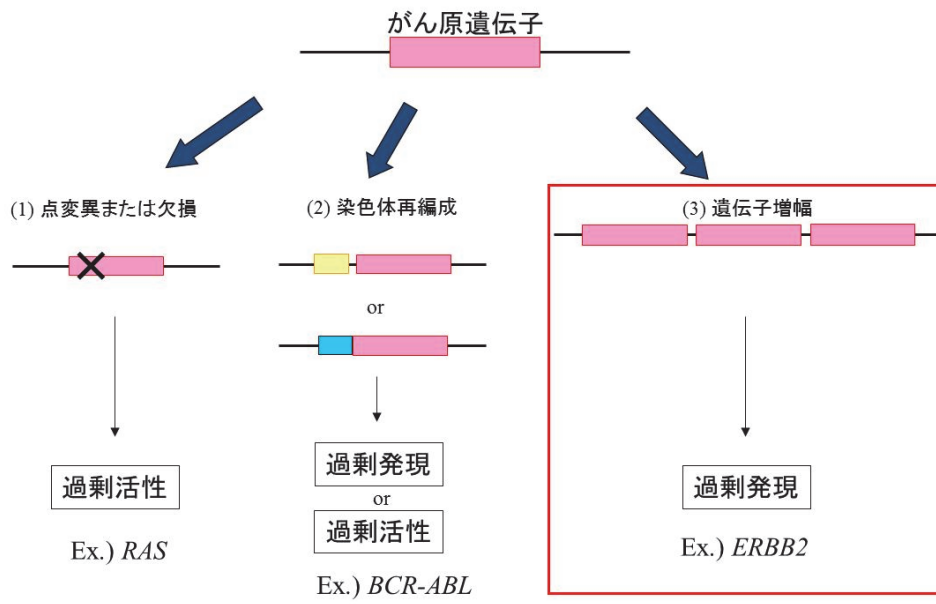


図 3. がんにおける遺伝子異常

がんで見られる遺伝子異常には「点変異 (point mutation)、欠損」(ex. *RAS*)、「染色体の再編成」(ex. *BCR-ABL*)、「遺伝子増幅」(ex. *ERBB2*)がある。

起きる割合については DCISと IBCでは有意な差は見られなかった(Kim et al., 2015)。しかしながら、乳がんで見られる遺伝子増幅の中でも、*ERBB2*の遺伝子増幅は IBCよりも DCISで確認される割合 (DCIS: 31%とIBC: 20%)が多く、逆に*FGFR1*の遺伝子増幅は IBCにおいて増加している傾向 (DCIS: 6%とIBC: 13%)にあった(Jang et al., 2012)。このように、がんの initiationへの関与が考えられる遺伝子増幅もあれば、がんの進行への関与が考えられる遺伝子増幅もあり、複数の遺伝子異常によってがんが多段階に悪性化することが考えられている。

1.4. 17q12-21のdriver遺伝子 *ERBB2*

こうした背景のもとで、私は遺伝子増幅に着目し、増幅領域 (アンプリコン) 中に存在する遺伝子の発がんとの関連性を明らかにする研究に取り組んだ。本研究で着目したアンプリコン17q12-21には既知のがん遺伝子 *ERBB2*が存在する。すなわち、*ERBB2*がこのアンプリコンに存在するdriver遺伝子と考えられている。*ERBB2*が指令する *ERBB2*タンパク質はEGFなどがリガンドとして結合する受容体型チロシンキナーゼ *ERBB*ファミリーに属する。*ERBB*ファミリーには、*ERBB2*以外に*ERBB1* (EGFR)や*ERBB3*、*ERBB4*があり、リガンドが結合することでホモもしくは*ERBB*ファミリー同士でヘテロ二量体を形成し、下流にあるMAPK経路やPI3K-Akt経路などの増殖、生存シグナルを活性化する (図 4)。*ERBB2*は既存のリガンドが同定されておらず、リガンドが結合しなくてもリガンドが結合した“活性化”状態の構造をしていることが知られている (Cho et al., 2003)。一方、*ERBB3*は機能的キナーゼドメインが変異しているが、ニューレギュリンなどの*ERBB3*リガンドとの結合により、*ERBB2*と*ERBB3*はヘテロ二量体を形成することによってシグナルを伝達する (Yamamoto et al., 2011)。1983年に山本らによってトリ赤芽球症を引き起こすウイルスから発見されたがん遺伝子 *v-erbB*は後に上皮増殖成長因子受容体 *EGFR* (*ERBB1*)が変異したものであることが報告された (Yamamoto et al., 1983)。その後、この*ERBB1*のパラログの*ERBB2*がヒト唾液腺癌において過剰発現しているがん遺伝子として発見された (Semba et al., 1985)。*ERBB2*はエチルニトロソ尿素を投与して発生したラットの神経芽細胞腫において発見された*ERBB2*のホモログである*neu*がん遺伝子 (Bargmann et al., 1986)や、ヒト肺がんなどで点変異の報告はあるが (Arcila et al., 2012)、ほとんどのヒトのがんで

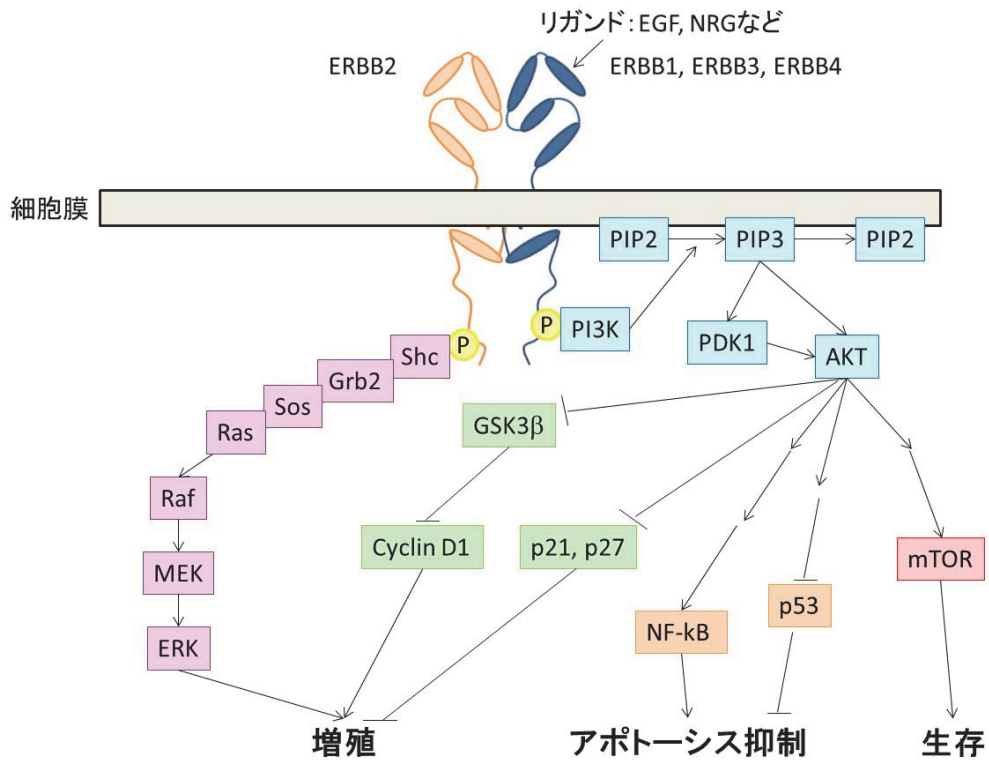


図 4. ERBB2 の下流のシグナル経路

ERBB2 はホモ二量体もしくは ERBB2 ファミリーとヘテロ二量体を形成することで下流のシグナルを活性化し、がん細胞の生存・増殖・細胞死抑制に関わる。

は遺伝子増幅により変異を持たない野生型が過剰発現していることが報告されている (Iqbal and Iqbal, 2014)。 *ERBB2*の増幅は乳がん、卵巣がん、胃がん、食道がんなどで認められ、予後との関連が報告されている (Iqbal and Iqbal, 2014; Slamon et al., 1989)。そのため、*ERBB2*は臨床において、がんの悪性度・予後の重要な指標として用いられるだけでなく、分子標的治療薬トラスツズマブ(ハーセプチン)の開発により、がんの個別診断と分子標的治療の確立に大きく貢献した。なお、本研究で用いる *ERBB2*V659Eは*neu*がん遺伝子の変異 (V664E)と相同の位置のアミノ酸に変異を導入したものである。この変異体の立体構造はほとんど野生型と変わらないことが言われている。通常*neu*は膜貫通ドメインの中の2つのモチーフ (A₆₆₁XXXG₆₆₅とI₆₅₉XXXV₆₆₃)によって二量体を形成しており、そのうち IXXXVモチーフによる二量体形成時が活性型であることが推測されている。*neu*の変異体 (V664E)は立体構造スイッチを抑制することで、立体構造的にこのIXXXVモチーフをとった活性型を維持している可能性があることが報告されている (Beevers et al., 2010)。この変異体は、がんで見られる野生型の*ERBB2*の過剰発現を模倣し、野生型の過剰発現よりも効率的に細胞をがん化することができる (Muller et al., 1988)。

1.5. アンプリコン17q12-21に存在する複数のがん関連遺伝子

野生型*ERBB2*の過剰発現は細胞をトランスフォームするという報告もあるが (Di Fiore et al., 1987)、トランスフォーミング活性を持たないという報告もある (Akiyama et al., 1991)。当研究室においてプロモーター活性の違う2つの発現ベクターを用いて*ERBB2*を発現させたところ、MMLV, Moloney Murine Leukemia Virusプロモーターで発現させた*ERBB2*はフォーカス形成能や造腫瘍能のトランスフォーミング活性が確認されたが、CMV, Cytomegalovirusプロモーターで発現させた*ERBB2*では確認されなかった。このことから、*ERBB2*のトランスフォーミング活性はその発現量に依存するといえる。一般に遺伝子増幅の単位は数キロベースから数十メガベースに及び、*ERBB2*が増幅しているがんでは*ERBB2*と*ERBB2*に隣接している遺伝子の発現増加が同時に起きている (Albertson, 2006)。遺伝子増幅の意義として、当研究室ではこうした遺伝子の中に*ERBB2*と協調的に働く遺伝子が存在し、細胞のトランスフォームを協調的に誘導しているのではないかと考え、斉藤らが*ERBB2*発現NIH3T3細胞を用いて

スクリーニングを行った。その結果、17q12-21のアンプリコンに含まれる遺伝子の中から、ERBB2と協調的にトランスフォームする遺伝子として*GRB7*を同定した (Saito et al., 2012)。*GRB7*遺伝子はERBB2とSH2ドメインを介して結合するアダプタータンパク質を指令し、AktとERBB2のリン酸化を亢進する。*GRB7*は*ERBB2*と近接しているために遺伝子増幅のある症例のほとんどで*ERBB2*と同時に増幅していることから、発がんに関わる重要な遺伝子であると考えられた。遺伝子増幅においてdriver遺伝子とともに増幅しても発がんに関わらない遺伝子はpassenger遺伝子と呼ばれるが、*GRB7*はそれ自身にはトランスフォーメーション能がないが*ERBB2*と協調的にトランスフォーメーションを促進するという意味で、passenger遺伝子ではなく、“supporter遺伝子” と言うべき新たなカテゴリーの遺伝子である。さらに、当研究室では17q12-21のアンプリコンに存在する*RARA*遺伝子がEMTを誘発することも報告した (Doi et al., 2014)。これらのことから、一つのアンプリコンにはdriver遺伝子と協調的に腫瘍形成に関わる遺伝子、単独でがんの悪性化に関わる遺伝子、あるいは別のdriver遺伝子が存在している可能性があると考えられる。実際にその他のアンプリコンでも、同一のアンプリコン (14q13.3アンプリコン) にあって過剰発現する転写因子TTF1とNKX2-1、PAX9が肺がんの増殖に協調的に働いていることが報告されている (Kendall et al., 2007)

1.6. 本研究の目的

先ほども述べたが、トランスフォーミングアッセイには、歴史的にはNIH3T3やCEF、Rat-1 (ラット線維芽細胞) などの線維芽細胞が用いられてきた。これらの細胞は不死化されているが、がん細胞の性質を有しておらず、がん細胞のゲノムDNAをトランスフェクションすることでトランスフォームする性質を持つ。すなわち、がん遺伝子に対する感受性を持つ、トランスフォーミングアッセイに適した細胞であった。しかしながら、乳がんをはじめとする多くのがんが上皮由来であることから、私はこれらとは異なる上皮細胞を用いてスクリーニングすることで今までに発見されてこなかった新たながん遺伝子を同定することができるのではないかと考えた。すでに発がんの責任遺伝子 (driver遺伝子) が同定されたアンプリコンでも、同じアンプリコン内にdriver遺伝子と協調することでトランスフォーミング活性を増強させる遺伝子が存在する可能性が高いことから、本研究では、過去にHynesらがレシピエント細胞として報告した上皮細

胞株NMuMGを用い (Hynes et al., 1985)、アンプリコン17q12-21の中から *ERBB2* と協調的、または単独的に働くことで細胞のがん化に関わる遺伝子をスクリーニングし、同定した遺伝子のがん化や悪性化における機能の解析を行った。

2. 材料と方法

2.1. 細胞培養

NMuMG 細胞株は山梨大学の宮澤恵二博士より供与された。MCF10A 細胞株は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)より購入した後、マトリゲル 三次元培養で正常な管腔状のスフィアを形成するものとしてクローン化されたものを使用した (Doi et al., 2014)。

NMuMG は熱処理による非働化を行った 10%ウシ胎児血清 (ニチレイバイオサイエンス) と 100 U/ml penicillin (Meiji Seika ファルマ)、100 µg/ml streptomycin (Meiji Seika ファルマ)、10 µg/ml insulin (和光純薬工業) を添加した high glucose DMEM (和光純薬工業) を用いて 37 °C、5% CO₂ 環境下で培養した。MCF10A は熱処理による非働化済 5%ウマ血清と 20 ng/ml hEGF (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.1 µg/ml cholera toxin (List Biological Labs, Campbell, CA, USA)、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、10 µg/ml insulin を添加した DMEM/F12 (Thermo Fisher, Waltham, MA)を用いて 37 °C、5% CO₂ 環境下で培養した。

HNF1B 発現型、wtERBB2 発現型、ERBB2VE 発現型、luciferase 発現型 NMuMG 細胞 (以下 NMuMG-HNF1B、NMuMG-ERBB2wt、NMuMG-ERBB2VE、NMuMG-luc と記す) は pMXs-IRES-puro-HNF1B もしくは pQCXIN-ERBB2wt、pQCXIN-ERBB2V659E、pMSCV-Luc-bla のレトロウイルス感染によって導入し、pMXs-IRES-puro-HNF1B 導入細胞は 1 µg/ml puromycin、pQCXIN-ERBB2wt、pQCXIN-ERBB2V659E 導入細胞は 2 mg/ml neomycin、pMSCV-Luc-bla 導入細胞は 3 µg/ml blastcidin によって薬剤選択することにより樹立した。

Plat-E パッケージング細胞 (Morita et al., 2000)は東京大学医科学研究所の北村俊雄博士より供与され、非働化ウシ胎児血清と 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を添加した DMEM (和光純薬工業) を用いて 37 °C、5% CO₂ 環境下で培養した。

2.2. DNA ベクター構築と抗体

wtERBB2 発現ベクターはヒト ERBB2 cDNA (RefSeq: NM_004448)を pQCXIN レトロウイルスベクター (Clontech, Mountain View, CA, USA)に挿入することで構築し、ERBB2V659E 発現ベクターはヒト ERBB2 の ORF の Val659 をコードする GAG コドンを GTT におきかえた変異体 (V659E)を同様に pQCXIN レトロウイルスベクターに挿入することで構築された (Saito et al., 2012)。HNF1B 発現ベクターはヒト HNF1B cDNA (RefSeq: NM_000458)を pMXs レトロウイルスベクター (Kitamura et al., 2003)に Gateway Cloning system (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)を用いて挿入した。スクリーニングで用いた他の発現ベクターも HNF1B 同様である。HNF1B の変異体発現ベクターは、pMXs-IRES-puro-HNF1B 発現ベクターを鋳型として用い表 1 のプライマーの組み合わせによって PCR 反応を行い、得られた増幅産物を自己ライゲーションにより環状化させることで作製した。また、この変異体は DNA シークエンシング (ABI 3130 Genetic Analyzer, Thermo Fisher)によって配列の確認を行った。

Δ Np63 α 発現ベクターは MCF10A から抽出した RNA を逆転写し合成した cDNA をテンプレートとして表 1 に示したプライマーを用いて、ヒト Δ Np63 α cDNA (NM_001114980)をクローニングし、pMXs レトロウイルスベクターに Gateway Cloning system を用いて挿入することにより作製した。pMSCV-Luc-bla は高崎健康福祉大の村上孝博士から供与された pMSC-Luc-puro を元に構築された (Ihara et al., 投稿準備中)。遺伝子導入実験のコントロールとして使用した pMXs-Venus レトロウイルスベクターは Venus 蛍光タンパク質 (Nagai et al., 2002)をコードした配列を pMXs ベクターに挿入したものである。

STAT3 の shRNA によるノックダウンベクターは pSuperior-sv40egfp ベクター (Ishikawa et al., 2009)の H1 promoter と EGFP の領域を XhoI と SpeI の制限酵素によって切り出し、pSuperior-sv40egfp ベクターと同様に制限酵素処理をした pPB-RL5 (Cadiñanos and Bradley, 2007)に挿入することにより pPB- sv40egfp ベクターを構築した後に STAT3target 配列 (表 2) を挿入し作製した。また、トランスポゾンシステムを用いて pPB-sv40egfp ベクターをゲノムに挿入するため、PiggyBac トランスポザーゼベクターとして pCMV-hyPBbase (Yusa et al., 2011)を用いた。ZEB2 の shRNA によるノックダウンベクターは promoter を H1 promoter とした pMXs ベクターに

target 配列 (表 2) を挿入したベクターを用いた(Doi et al., 2014)。

ウェスタンブロッティングおよび免疫染色、クロマチン免疫沈降には以下の 1 次抗体を用いた : anti-alpha-tubulin DM1A (Sigma)、anti-HNF-1 beta (Cat: 612504, BD Transduction Laboratories)、anti-E-cadherin (Cat: 610182, BD Transduction Laboratories)、anti-N-cadherin (Cat: 610921, BD Transduction Laboratories)、anti-p63[4A4] (sc-8431, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、anti-phospho Stat3 Tyr705 (#9145, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、anti-Stat3 (#9139, Cell signaling Technology)、anti-ERBB2 (#2165, Cell signaling Technology)、anti-phospho ERBB2 Tyr877 (#2241, Cell signaling Technology)、anti-phospho ERBB2 Tyr1221/1222 (#2243, Cell signaling Technology)、anti-phospho ERBB2 Tyr1248 (#2247, Cell signaling Technology)、anti-phospho FAK Tyr397 (#3283, Cell signaling Technology)、anti-phospho Akt Thr308 (#2965, Cell signaling Technology)、anti-phospho p38 Thr180/Tyr182 (#9211, Cell signaling Technology)、anti-phospho ERK Thr202/Tyr204 (#4370, Cell signaling Technology)、anti-Ki67 (Cat: 18-0191Z, Thermo Fisher)、anti-LYVE (Cat: 11-034, Angio Bio)、anti-CD31 (550274, BD Pharmingen)、anti- DYKDDDDDK tag (和光純薬工業)、normal mouse IgG (sc-2025, Santa Cruz)。また、がん化関連シグナルの活性化を調べた抗体は表 3 に示す。

anti-HNF-1 beta ウサギ抗体は、ペプチド CHMYAHKQEPPQYSHTSR(Amd)

(511-527 アミノ酸の配列) を抗原としてウサギを免疫し、得られた抗血清を硫酸沈殿の後 proteinA カラム (17-5080-02, GE Healthcare) 及びペプチドカラム (17-0716-01, GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。実際の方法は、GE Healthcare のバイオ実験の原理と方法の抗体精製の章を参考にした (http://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/biodirect_mail/technical_tips/index.html)。

2 次抗体はウェスタンブロッティングでは anti-rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey もしくは anti-mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (NA934-1mL, NA931-1mL, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) を、免疫染色では Alexa Flour 568 goat anti-Rat IgG もしくは mouse IgG, Rabbit IgG (A-11077 もしくは A-11004, A-11011, Thermo Fisher) を用いた。抗体の使用条件は表 3 に示す。

2.3. レトロウイルスパッケージングと感染

Plat-E 細胞を 60 mm 培養皿に 1.0×10^6 個播種し、翌日に 4 μg のレトロウイルスプラスミドと 10 μl の Lipofectamine 2000 reagent (Thermo Fisher) を混ぜてトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後に培養上清を NMuMG の培地へと交換し、そのさらに 24 時間後に培養上清を回収し、4 $^{\circ}\text{C}$ 下で 1500 rpm 5 分間と 3000rpm 5 分間の 2 回の遠心により細胞の残骸などを取り除いた培養上清（ウイルス溶液）を -80°C で保存した。

NMuMG 細胞もしくは MCF10A 細胞を感染させる前日に 12well 培養プレートに 7.0×10^4 個播種し、500 μl のウイルス溶液と 500 μl の NMuMG 培地、10 μl の 0.8 mg/ml polybrene (Sigma) を加え感染させた。翌日、細胞を播き直し、発現ベクターに対応した薬剤を加え培養を 1 週間行うことによって発現細胞のみを選択した。

2.4. shRNA ベクターによるノックダウン

NMuMG 細胞を 60 mm 培養皿に 5.0×10^5 個播種し、翌日に 2.6 μg の pPB-sv40egfp ノックダウンベクターと 5.4 μg の pCMV-hyPBBase ベクター、12 μl の 2 mg/ml polyethylenimine (polyscience, Warrington, PA, USA) (pH7.0 with NaOH) を混ぜてトランスフェクションした。翌日に播き直し、1 回継代を行いトランスフェクションしてから 6 日後にセルソーター (SH800Z, ソニー) にて EGFP 陽性を指標としてノックダウンベクターが導入された細胞を分取した。

2.5. フォーカスフォーメーションアッセイ

フォーカスフォーメーションアッセイは 2.0×10^3 個の遺伝子発現細胞と 2.0×10^5 個の親株（非感染 NMuMG 細胞）を混ぜて 60 mm 培養皿に播種し、1-2 週間 2 日おきの培地交換を経て、フォーカスを形成するまで培養した。フォーカスは PBS で洗浄し、100%メタノールにて 10 分間固定後、0.01% クリスタルバイオレット/69.1%メタノールにより 10 分間染色した。その後、MQ にて 10 分 3 回洗浄し、乾燥させ、全体像を撮影した。

2.6. ソフトアガーアッセイ

0.53%低融点アガロース (SeaPlaque GTG agarose, Lonza, Bazel, Switzerland)/1xNMuMG 培地を 60 mm 培養皿に 2.5 ml 注ぎ、室温で固めてボトムアガー層を作製した。1.0×10⁵ 個の細胞を 3 ml の 0.27%低融点アガロース/1xNMuMG 培地に懸濁し、ボトムアガー層の上に重層した。短時間氷上に静置してアガロースを固めた後、乾燥を防ぐため NMuMG 培地を 1 週間毎に 1 ml 追加しながら 30 日間培養した。形成されたコロニーを撮影し、直径が 150 μm 以上のものを計数した。

2.7. スクリーニング

ヒト乳がんの臨床サンプルをマイクロアレイ解析し、底が 2 の対数値に直したマイクロアレイデータから、各遺伝子の平均値を求め、サンプル値と平均値の差を求めて相対発現量とした。染色体上の位置に従って遺伝子を配列し、相対発現量をプロットすることで近接した遺伝子がまとまって高い相対発現量を示している領域を遺伝子コピー数の増加によるものと考え、この領域をアンプリコンとして推定した。このようにして推定した 17q12-21 アンプリコンに存在する遺伝子のうち 52 個の遺伝子 (表 6) を多重感染によって導入した細胞を用いてフォーカスアッセイとソフトアガーアッセイを行った。形成されたフォーカスとコロニーをマイクロピペットを用いて採取し、96well プレートで培養した。

96well プレートで 90-100%コンフルエントになった細胞を 23 μl の TNT buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100)で懸濁し、PCR 反应用サンプルとした。それらサンプルを鋳型として、pMX ベクター配列より作成した PCR プライマー (pMXs-s1811、pMXs-AS3200)を用いて KOD FX (東洋紡) にて細胞に導入された cDNA を増幅した (PCR 条件はこの章の一番最後に示す)。それら増幅産物をライゲーションにより pBlueScript SK(-) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)へクローニングした。29 個のフォーカスサンプルから 137 個の独立した大腸菌コロニーを拾い、プラスミドを調製した。プラスミドは M13 プライマーを用いて DNA シーケンシング (ABI 3130 Genetic Analyzer)を行い、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を用いて BLAST (Altschul et al., 1990)により Genbank データベースの検索を行い、cDNA を同定した。

2.8. ウェスタンブロッティング

細胞を氷冷した PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2 mM KH₂PO₄, Mg²⁺, Ca²⁺ free) で洗浄し、SDS-PAGE サンプルバッファーを用いて溶解し、95 °C で 5 分間の煮沸により SDS 化を行った。これらのサンプルは目的のタンパク質の分子量によって 7.5%、10%、12.5% のポリアクリルアミドゲルによって分離し、PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) にトランスファーした。メンブレンはブロッキングバッファー (3–5% 脱脂粉乳/ TBS もしくは 5% ウシ血清アルブミン/ 0.01% Triton X-100/ TBS) を用いて、室温 1 時間でブロッキングした後、1 次抗体を加え、4 °C で一晩メンブレンを回転させながら結合させた。TBST (TBS-0.05% Triton X-100) によって洗浄した後、HRP が結合した 2 次抗体を室温 1 時間で結合させた。Immobilon Western reagent (Millipore) を用いて、ChemiDoc™ XRS+ (BioRad, Hercules, CA, USA) によって化学発光を検出した。

2.9. 三次元培養による浸潤アッセイ

Purified collagen (3 mg/ml) (PureCol, Advanced BioMatrix, San Diego, CA, USA) に 100mM NaOH と 10xPBS を最終濃度が 10mM と 1x になるように加え、ムラがないように vortex によってよく混ぜ中和した。そこに、等量の Growth Factor Reduced BD Matrigel (BD Biosciences) を加え、vortex でよく混ぜ、コラーゲン/マトリゲル溶液を作製する。50 µl のコラーゲン/マトリゲルを氷上に置いた 24well plate に塗布し、37 °C のインキュベータで固めた。6×10³ 個の細胞を 400 µl のアッセイ培地 (EGF を含まず、ウマ血清濃度を 1% に減じた MCF10A 培地) と 0.1 µl hEGF (20 µg/ml)、8 µl matrigel (終濃度 2%) に混ぜ、ベースのコラーゲン/マトリゲル層の上に播種した。通常の培養と同様の条件下で 3-4 日培養し、顕微鏡で観察した。

2.10. マイクロアレイ解析

ヒト転写産物 30913 種に対応した配列を持つ 80 mer のポリヌクレオチド (MicroDiagnostic, Japan) を custom arrayer によりガラス基板の上に固定することで作製されたマイクロアレイを用いて解析を行った。Total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) によって AGPC 法で抽出してから、MicroPoly(A)Purist (Thermo Fisher) を使

用して、オリゴ dT セルロースで polyA+RNA を精製した。2 μ g の poly(A)+RNA を、蛍光色素 Cyanine 5-dUTP もしくは Cyanine 3-dUTP を用いて逆転写酵素による cDNA 合成を行うことでラベル化した。遺伝子発現の細胞特異的な偏りを避けるため、22 種類のヒト癌細胞株から抽出した poly(A)+RNA を等量ずつ混ぜ、ヒト共通の reference RNA として用いた (Ito et al., 2007)。ハイブリダイゼーションは labeling and hybridization kit (MicroDiagnostic)を用いて行い、蛍光シグナルはスキャナー GenePix4000A (Axon Instruments Inc., CA, USA)で計測した。得られた遺伝子発現データを用いて、MetaCore platform (<http://www.genego.com/metacore.php>, GeneGo, St. Joseph, MI, USA)にて、パスウェイ解析を行った。

2.11. 定量性 RT-PCR

RNA 抽出は ISOGEN を用いて行い、抽出した totalRNA 5 μ g を SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher)を用いて逆転写し、cDNA を合成した。

PCR はそれぞれのサンプル 4 ng の RNA 由来の cDNA を用いて、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (東洋紡)もしくは Taqman gene expression assays と Taqman gene expression master mix (Thermo Fisher)によって行った。定量性 PCR はそれぞれのサンプルを duplicate で行っている。内在性コントロールとして、TBP (TATA box Binding Protein, Refseq: NM_003194)もしくは 18S ribosomal RNA を用いた。使用したプライマーは表 4 に示す。また、Taqman gene expression assays は以下のものを用いた: SNAIL, Hs00195591_m1; SLUG, Hs00950344_m1; FOXC2, Hs00270951_s1; ZEB1, Hs00232783_m1; ZEB2, Hs00207691_m1; TGFBR1, Hs00610320_m1; TGFBR2, Hs00234253_m1; TGFB1, Hs00998133_m1; TGFB2, Hs00234244_m1; SMAD3, Hs00969210_m; 18S, Hs99999901_s1.

2.12. クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは SimpleChIP™ Enzymatic Chromatin IP Kit (#9003, Cell Signaling Technology)を用いて行った。細胞を 1%ホルムアルデヒドでクロスリンク処理し、添付のバッファーで懸濁した。micrococcal nuclease 処理によってクロマチンを

断片化し、Bioruptor（コスモバイオ）を用いて核膜を破碎した。免疫沈降 1 回分のクロマチン溶液（ 4×10^6 個の細胞に由来）に $5 \mu\text{g}$ の抗体を加え $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、一晚反応させた。 $30 \mu\text{l}$ の ChIP Grade Protein G magnetic beads を加え、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ で 2 時間反応させて免疫複合体を回収した。 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ の湯浴で 2 時間の加熱により脱クロスリンクさせたサンプルを付属の DNA 精製スピнкаラムで精製し、定量性 PCR を THUNDERBIRD SYBR qPCR mix（東洋紡）を用いて行った。使用したプライマーを表 5 に示す。ネガティブコントロール抗体として、normal mouse IgG を、ネガティブコントロールプライマーとして ACTB 遺伝子のエクソン部分配列由来のプライマーを用いた。

2.13. マウス実験（異所性移植と同所性移植、尾静脈移植）

BALB/c slc-nu/nu マウス（6-8 週齢、メス）を日本 SLC 社から購入して使用した。異所性移植には NMuMG-luc に Venus と HNF1B を発現させた細胞を用いた。同所性移植と尾静脈移植には NMuMG-luc に ERBB2VE を発現させ、薬剤選択によって NMuMG-luc-ERBB2VE 細胞株を樹立し、これに Venus または HNF1B を導入した細胞を用いた。マウス実験は異所性移植と同所性移植、尾静脈注入の 3 つの方法で行った。異所性移植においては腫瘍形成の有無を目視により観察した。その他の 2 つの実験は In vivo Imaging system (IVIS LuminaXR, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)を用いた経時観察を行い、腫瘍形成および他臓器転移の有無を観察した。また、これらの一連の実験はすべてイソフルラン（和光純薬工業）を用いた呼気麻酔下にて行った。本実験は、早稲田大学における動物実験の承認に基づいて行った（課題名：免疫不全マウスを用いた造腫瘍・転移能アッセイ、課題番号：2015-A060）。

2.13.1. 異所性移植

異所性移植は、 3.5×10^5 個の細胞を $100 \mu\text{l}$ の 50%マトリゲル/PBS で懸濁し、28G の注射針を用いてマウスの乳腺付近の皮下に移植した。腫瘍体積はノギスにて長軸と短軸を計測し、楕円球体の体積の算出式を元にした式（長軸 \times 短軸 $^2 \times 3.14 \times 4 \div 3$ ）によって算出した。

2.13.2. 同所性移植

同所性移植は、 1×10^6 個の細胞を 10 μ l の PBS で懸濁し、28G の注射針を用いてマウスの第 4 乳腺に移植した。腫瘍体積が 300 mm³ を超えるまで測定を行い、その後、腫瘍の切除を行い、切除後 4 週間、IVIS にて非侵襲的な転移巣の経時観察を行った。

2.13.3. 尾静脈移植

尾静脈注射は、 5×10^5 個の細胞を 100 μ l の PBS で懸濁し、27G の注射針を用いてマウスの尾静脈に移植した。移植後 4 週間、IVIS にて非侵襲的な転移巣の経時観察を行った。

2.13.4. Bioluminescence imaging

200 μ l の D-luciferin (15 mg/ml, Gold Biotechnology, Olivette, MO, USA) を腹腔内注射し、10-15 分後に、IVIS LuminaXR を用いて発光及び X 線イメージングを行った。

2.14. 組織切片の作製

摘出した腫瘍(原発巣および肺転移巣)を 4% パラホルムアルデヒド(和光純薬工業)で一晩浸漬固定し、10%スクロース (和光純薬工業)、15%スクロース、20%スクロース中にそれぞれ 4 °C にて 4 時間もしくは一晩浸漬し、スクロース置換を行った。6.5% O.C.T.コンパウンド (6.5% Mowiol® 56-98, 3.72% PEG600, 1% Tween 20, 0.6mg/ml NaN₃) に包埋し、液体窒素にて凍結後、クリオスタットマイクローム (CM1850, Leica, Germany) を用いて 10 μ m 厚の切片を作製した。

2.15. 免疫蛍光染色

作製した切片を風乾させ、PBS で洗浄後、10 分間 0.5% Triton X-100/PBS にて膜透過処理を施した後、PBS 洗浄、ブロッキングバッファー (1% ヤギ血清/0.1% Triton X-100/PBS) にて室温 1 時間でブロッキング、1 次抗体を 4 °C オーバーナイトで反応させた。0.1% Tween 20/PBS で 5 分、3 回洗浄した後、遮光し 50 ng/ml DAPI (和光純薬工業) と 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、PBS で洗浄後 Mowiol Dabco 封入剤 (10% Mowiol 4-88, 25% Glycerol, 0.1M Tris-HCl (pH 8.5), 2.5% DABCO

(1,4,-diazabicyclo-[2.2.2]-octane))で封入し、蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus) により観察した。

2.16. 統計処理

乳がんのマイクロアレイデータセットは Zhang et al (Zhang cohort or dataset, Affymetrix arrays) (Zhang et al., 2009)と Hatzis et al. (Hatzis cohort or dataset, Affymetrix arrays) (Hatzis et al., 2011)を用いた。患者サンプルは HNF1B の発現値の平均値+0.5 標準偏差を基準に高発現群と低発現群に分けた。Prism 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて、Metastasis-free survival (MFS)を Kaplan-Meier 法によって示し、2 群間の差を Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定によって検定した。その他の定量性 RT-PCR や CHIP アッセイなどは t 検定によって検定したが、ソフトアガーアッセイのみ多重比較を考慮し、Bonferroni 補正を行った。統計処理の結果、 $p < 0.05$ の場合を有意な差と評価した。

○PCR 条件

・ Genome PCR

98°C	2min		
98°C	10sec	}	×30 サイクル
55°C	15sec		
68°C	2min		
4°C	∞		

・ sequence PCR

96°C	2min		
96°C	15sec	}	×30 サイクル
50°C	15sec		
60°C	4min		
60°C	2min		
15°C	∞		

・ 定量 PCR

THUNDERBIRD SYBR qPCR mix 使用時

95°C	1min		
96°C	15sec	}	×40 サイクル
60°C	1min		
融解曲線分析			

本研究の実験はすべて2回以上実験を行い、同様の結果を得たうちの一つの実験結果を示している。(動物実験においては2回行ったものをまとめて一つの結果として示している。)

3. 結果

3.1. NMuMG 細胞株を用いたトランスフォーメーションアッセイの確立

80%の腫瘍が上皮由来であることから、私は、がん遺伝子のスクリーニングに使用するレシピエント細胞として、NIH3T3のような線維芽細胞ではなく、上皮細胞由来の不活化細胞株を用いることを考えた。用いる細胞はがん細胞としての性質、すなわち、少なくとも接触阻止、足場依存性増殖、非造腫瘍性の条件を満たす必要がある。その上で、遺伝子導入効率が高く、既知のがん遺伝子でトランスフォームできることが求められる。過去の文献を調べると、Hynes らが (Hynes et al., 1985)、不活化乳腺上皮細胞である NMuMG に活性化 *RAS* 遺伝子 DNA を導入してマウスに腫瘍を形成することを報告していた。そこでトランスフォーメーションアッセイのレシピエント細胞として NMuMG が使用可能かどうかを検討することにした。まず初めに、通常の NMuMG を用いてフォーカスアッセイ、コロニーアッセイを行い、フォーカスやコロニーを形成しないことを確認した (図 5)。次に、CMV プロモーターを持つ pQCXIN レトロウイルスベクターに *ERBB2* の野生型と活性化型変異体 *ERBB2V659E* (Bargmann et al., 1986) を導入し、Plat-E にトランスフェクトすることで、組換えウイルスを産生させた。この組換えウイルスを NMuMG に感染させることによってフォーカスアッセイとソフトアガーアッセイを行った。このとき、蛍光タンパク質である Venus 発現ベクターを用いて導入効率を検討したところ、約 90%の細胞に遺伝子を導入できることを確認した (Saito et al., personal communication)。野生型 *ERBB2* (wt *ERBB2*) 発現細胞はフォーカスやコロニーを形成しなかったが、活性化型変異体発現細胞ではフォーカス、コロニー共に形成した (図 5)。なお、当研究室の伊原らにより、NMuMG 細胞は造腫瘍能をもたないが、活性化型 *RAS* を導入した NMuMG 細胞は腫瘍を形成することを確認している (Ihara et al., 投稿中)。これらのことから、NMuMG をがん遺伝子スクリーニングのレシピエント細胞として適していると判断し、以降のスクリーニング実験に使用することにした。

3.2. *HNF1B* の同定と *HNF1B* の過剰発現による接触阻止の消失

ERBB2 の活性化型変異体は NIH3T3 と同様に NMuMG でもフォーカスとコロニーを形成した (トランスフォームした) が、染色体 17q12-21 における遺伝子増幅の結果起

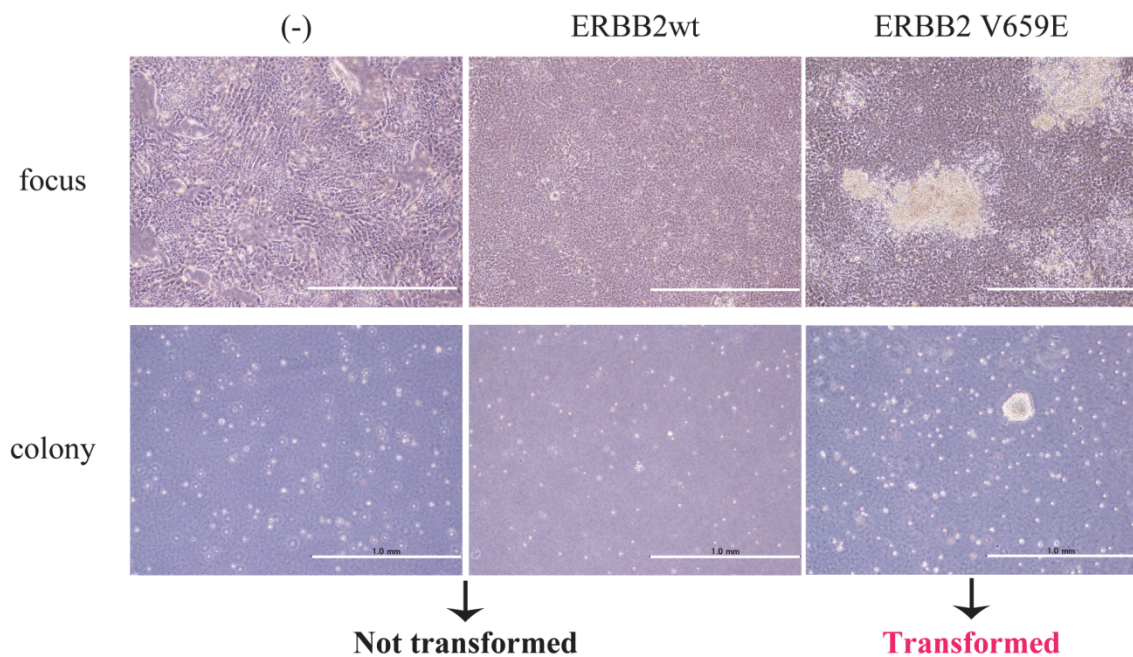


図 5. NMuMG を用いたトランスフォーメーションアッセイ系の確立
 遺伝子導入していない細胞と野生型の ERBB2 の発現細胞ではフォーカス、コロニーを形成しなかったが、活性型変異体 ERBB2 の発現細胞ではフォーカス、コロニーを形成した。(スケールバー：1 mm)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

こることは、正常な *ERBB2* タンパク質の過剰発現である。17q12-21 アンプリコン中の 52 個の遺伝子について *wtERBB2* との協調的トランスフォーミング活性を調べるために、これらの遺伝子に対応するヒト cDNA を pMXs レトロウイルスベクターに挿入したプラスミドベクターを作製するとともに、トランスフォームしていない *wtERBB2* 恒常的発現 NMuMG (NMuMG-*ERBB2wt*) 細胞を作製した。CMV プロモーターで発現するレベルでは、前述のように *wtERBB2* は NMuMG をトランスフォームしない (図 5)。そこで、52 個の発現ベクターをまとめて Plat-E を用いてパッケージングし、産生されたウイルスを NMuMG-*ERBB2wt* に感染させ、トランスフォーメーションアッセイを行ったところ、感染から 1-2 週間後、29 個のフォーカスと 19 個のコロニーが形成された。形成されたフォーカス、コロニーを単離し、培養後、それぞれからゲノム DNA を抽出し、pMXs レトロウイルスベクター用のプライマーを用いて挿入された cDNA 断片を増幅した。それらを pBlueScript SK⁻ にサブクローニングし、塩基配列を決定することで形成されたフォーカスやコロニーのゲノム DNA に挿入された cDNA を同定した (表 6)。フォーカスで高頻度に挿入された上位 11 個の cDNA について、個別に NMuMG-*ERBB2wt* 細胞に導入し、フォーカスアッセイを行った。その結果、*HNF1B* (RefSeq: NM_000458) のみがフォーカスとコロニー形成能を示し、他の 10 個の遺伝子はトランスフォーミング活性を示さなかった。次に、*HNF1B* のトランスフォーミング活性が *ERBB2* 依存的かどうかを調べた。予想に反して、*HNF1B* は NMuMG-*ERBB2wt* だけではなく、NMuMG でもトランスフォーメーションを誘導した。このことから、*HNF1B* による NMuMG のトランスフォーメーションは *ERBB2* 非依存的であることが示された (図 6a)。しかしながら、*HNF1B* と *ERBB2VE* の共発現細胞が形成するフォーカスは足場依存性がさらに低くなり培養皿全面に盛り上がってくるようなフォーカスで、*HNF1B* 単独、*ERBB2VE* 単独で形成する細胞とは形態が著しく異なり、*HNF1B* と *ERBB2VE* の何かしらの相乗作用が考えられた。また同様に、*HNF1B* は *ERBB2VE* によって誘導される足場非依存的増殖能を著しく増強していた (図 6b, c, d)。形成されたコロニーの形態を比較したところ、*HNF1B* の単独発現によって形成されるコロニーは中が空洞で、いわゆる中空の球体のようなコロニーであり、*ERBB2wt* との共発現のコロニーは内部にも細胞が存在する充実性のコロニーであった。これに対し、*ERBB2VE* と *HNF1B* の共発現によって形成されるコロニーは

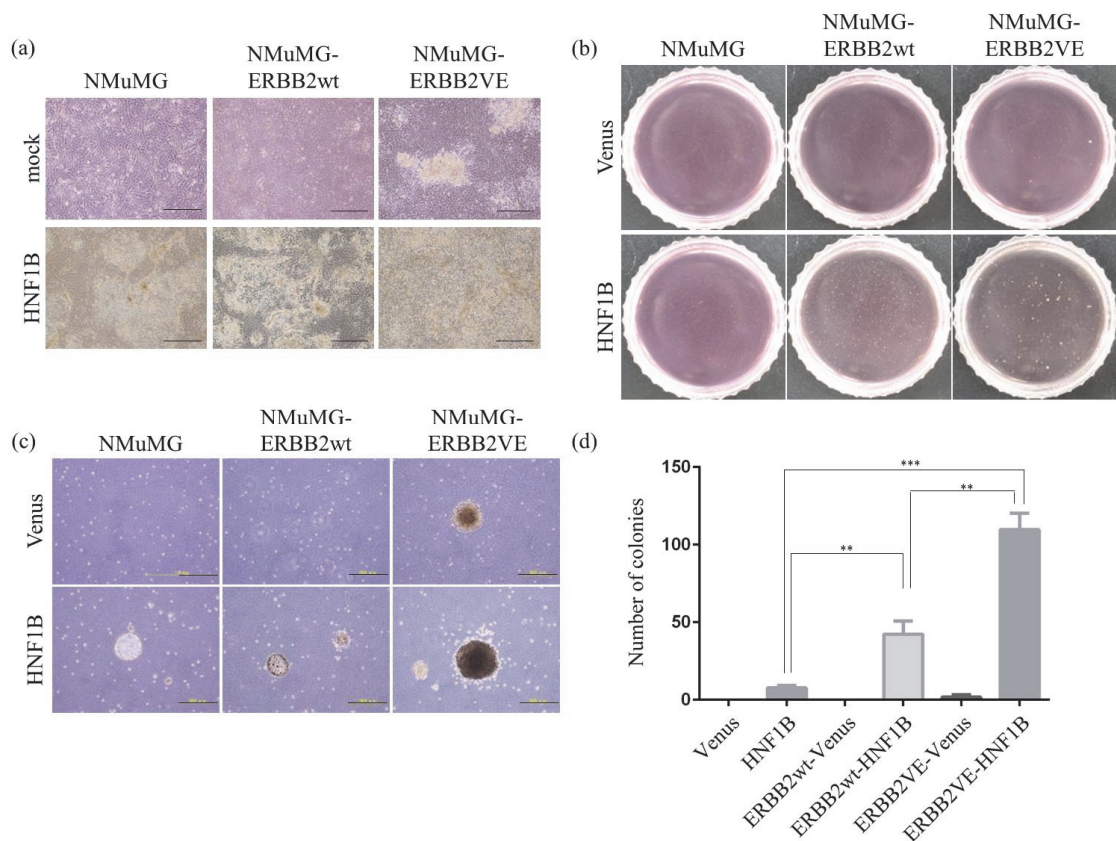


図 6. NMuMG 細胞における HNF1B のトランスフォーミング活性

(a) フォーカスフォーメーションアッセイ。NMuMG または野生型 ERBB2 発現 NMuMG、活性型 ERBB2VE 発現 NMuMG に Venus もしくは HNF1B レトロウイルスを感染させ、10 日間培養した。(スケールバー: 500 μm)

(b),(c) ソフトアガーアッセイ。(a)と同じ細胞を軟寒天(ソフトアガー)に埋め込み、30 日間培養した。(スケールバー: 500 μm) (n=3)

(d) ソフトアガーアッセイ。1 \times 10⁴ 個の細胞数を軟寒天に埋め込み、21 日培養した。各サンプル 3well ずつ直径 150 μm 以上のコロニーを計測し、グラフ化した。(**:p<0.01, ***:p<0.0005)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

トランスフォーメーションアッセイで一般的に観察される典型的なコロニーであり、*ERBB2wt* と *HNF1B* が共発現したコロニーや *ERBB2VE* 単独発現で得られたコロニーより大きく、数も多く観察された (図 6c, d)。以上のことから、*HNF1B* が *ERBB2* によって引き起こされた足場非依存的増殖能を増強していることが示された。

本研究では、まず、トランスフォーメーションにおける *HNF1B* 単独での機能を解析することにした。*HNF1B* はホメオボックス遺伝子ファミリーに属する転写因子を指令している。そこで、*HNF1B* タンパク質が転写因子として働くことがトランスフォーミング活性に必要であることを調べるために、*HNF1B* が DNA に結合するのに必要な 2 つのドメイン、すなわち POU ドメインとホメオドメイン (Wegner et al., 1993) をそれぞれ欠損させた変異遺伝子を作製した (図 7a, b)。いずれの変異も DNA 結合活性を失うことは既に報告されている (Verrijzer et al., 1992)。それらのトランスフォーミング活性を NMuMG 細胞を用いたフォーカスフォーメーションアッセイによって評価した結果、2 つの *HNF1B* 変異体 del-POU (del 136-187) と del-Homeo (del 235-310) は共に NMuMG に対するトランスフォーミング活性を喪失していた (図 7c)。このことから、*HNF1B* の過剰発現が引き起こすがん細胞の特徴の一つである「接触阻止の消失」が DNA 結合活性依存的であることが示された。

また、図 6 により *ERBB2* と *HNF1B* の協調性が確認されたことから、*ERBB2* タンパク質の発現とリン酸化状態を確認したところ、*ERBB2* 単独発現時と比較して *ERBB2VE* と *HNF1B* の共発現時において、*ERBB2* タンパク質の発現が増加傾向にあり Tyr1248 と Try1221/1222、Try877 のリン酸化が亢進していた (図 8)。

3.3. *HNF1B* による EMT と浸潤能の誘導

がん細胞のもう一つの特徴である「浸潤活性」を調べるために、不死化ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A を使用することにした。MCF10A はマトリゲルを基質とした三次元培養で乳腺の乳管を構造に類似した、極性を持つ中空の構造 (スフィア) を形成することや、*SNAI1* や *TWIST* などの EMT 誘導因子を発現させてコラーゲン/マトリゲルの混合ゲル中に埋め込むと突起を伸ばすことが報告されている細胞株で、浸潤能の評価に適した細胞である (Debnath et al., 2003; Doi et al., 2014)。興味深いことに、*HNF1B* を導入すると MCF10A は上皮細胞特有の敷石状構造が崩れ、線維芽細胞様の形態へと

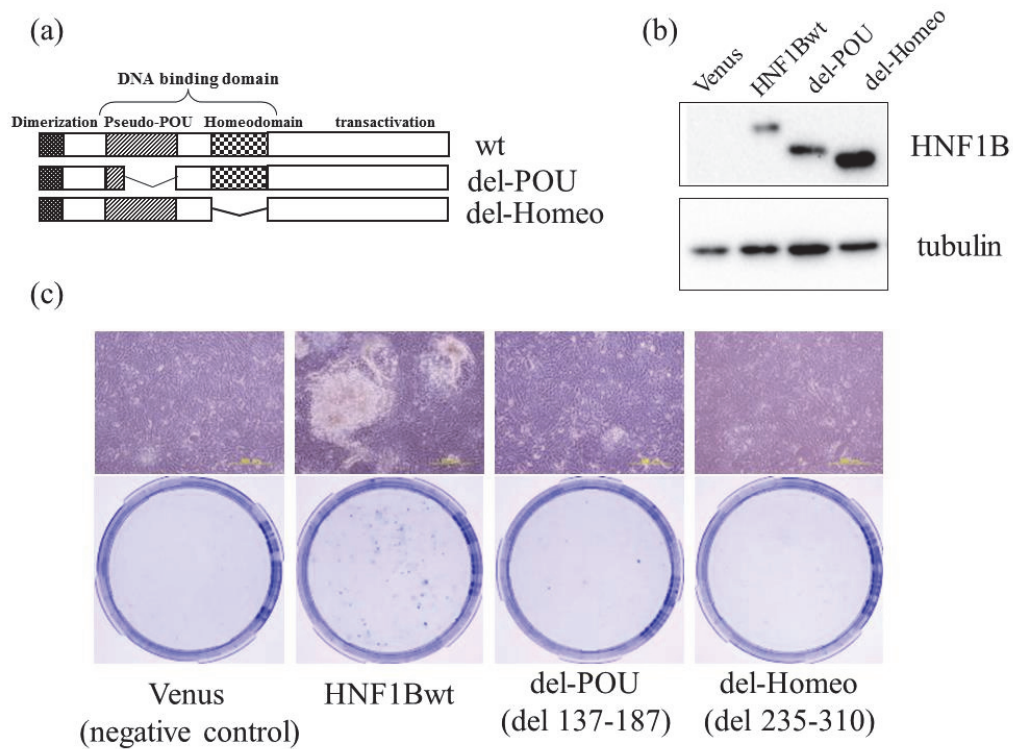


図 7. NMuMG 細胞における DNA 結合ドメイン欠損変異体 HNF1B のトランスフォーミング活性

(a) HNF1B のドメイン構造。DNA 結合ドメインをそれぞれ欠損させた変異体を作製した。

(b) 野生型 HNF1B と 2 つのドメイン欠損変異体のタンパク質発現。

(c) 野生型 HNF1B と変異体のフォーカスフォーメーションアッセイ。(スケールバー: 500 μm)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

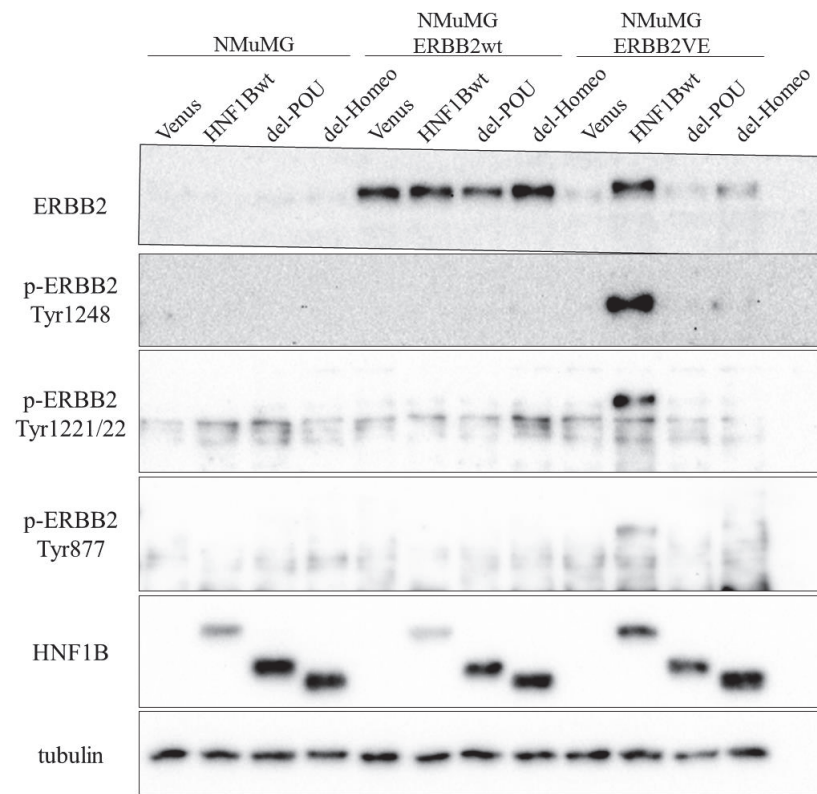


図 8. ERBB2 と HNF1B 共発現時の ERBB2 とリン酸化 ERBB2、HNF1B の発現

変化した (図 9a)。そこで、*HNF1B*によって EMT が誘導されるかどうかを調べるために、ウェスタンブロッティングによって EMT マーカーの発現レベルを検討した。その結果、*HNF1B*発現 MCF10A では上皮系マーカーである E-cadherin の発現が減少しており、間葉系マーカーである N-cadherin の発現が増加していた (図 9b)。形態変化とあわせて典型的な EMT の表現型を示しており、さらにこの表現型の変化は、先ほどのトランスフォーメーション同様、変異体の発現によっては引き起こされなかった。

EMT 誘導因子発現細胞をコラーゲン/マトリゲルの混合ゲル中に埋めると突起を伸ばすという浸潤の表現型を示す報告があることから (Doi et al., 2014; Seton-Rogers et al., 2004)、*HNF1B*にも同様の浸潤活性があるかどうかを *HNF1B*発現細胞をマトリゲル/コラーゲンの混合ゲルに埋め込んで調べた。野生型の *HNF1B* の発現は細胞浸潤を引き起こしたが、一方で、コントロールの細胞や *HNF1B*変異体発現細胞では浸潤の表現型は引き起こされなかった (図 9c)。核移行シグナルを融合させた蛍光タンパク質 mCherry を細胞核のマーカーとして発現させた MCF10A を用いて三次元培養を行い、細胞形態を観察したところ、1 つの細胞 (single-cell) が単体で伸長しているのではなく、細胞同士がまとまって浸潤している様子が多く観察された (図 9d)。この表現型の変化は他の EMT 誘導因子によって引き起こされるものと類似していた (Doi et al., 2014; Seton-Rogers et al., 2004)。以上の結果から、*HNF1B*は DNA 結合活性依存的に EMT と浸潤能を誘導すると結論付けた。

3.4. *HNF1B*による STAT3 のリン酸化の誘導

*HNF1B*によってどのようにトランスフォーメーション、EMT や浸潤能が引き起こされるかを調べるために、以下の 2 つの方法を用いて調べることにした。1 つ目は、がん関連シグナルの活性化をウェスタンブロッティングによって網羅的に調べること、2 つ目は、microarray 解析をすることによって *HNF1B*発現 MCF10A の遺伝子発現プロフィールから *HNF1B*の下流の標的遺伝子を同定すること、である。

1 つ目の解析として、*HNF1B*発現 NMuMG を用いてがん関連シグナル伝達分子のリン酸化をウェスタンブロッティングによって調べたところ、STAT3 のリン酸化が *HNF1B*発現細胞で増加していることを見出した (図 10a)。さらに、リン酸化された STAT3 は核に移行していることが確認された (図 10b)。STAT3 のリン酸化は NMuMG

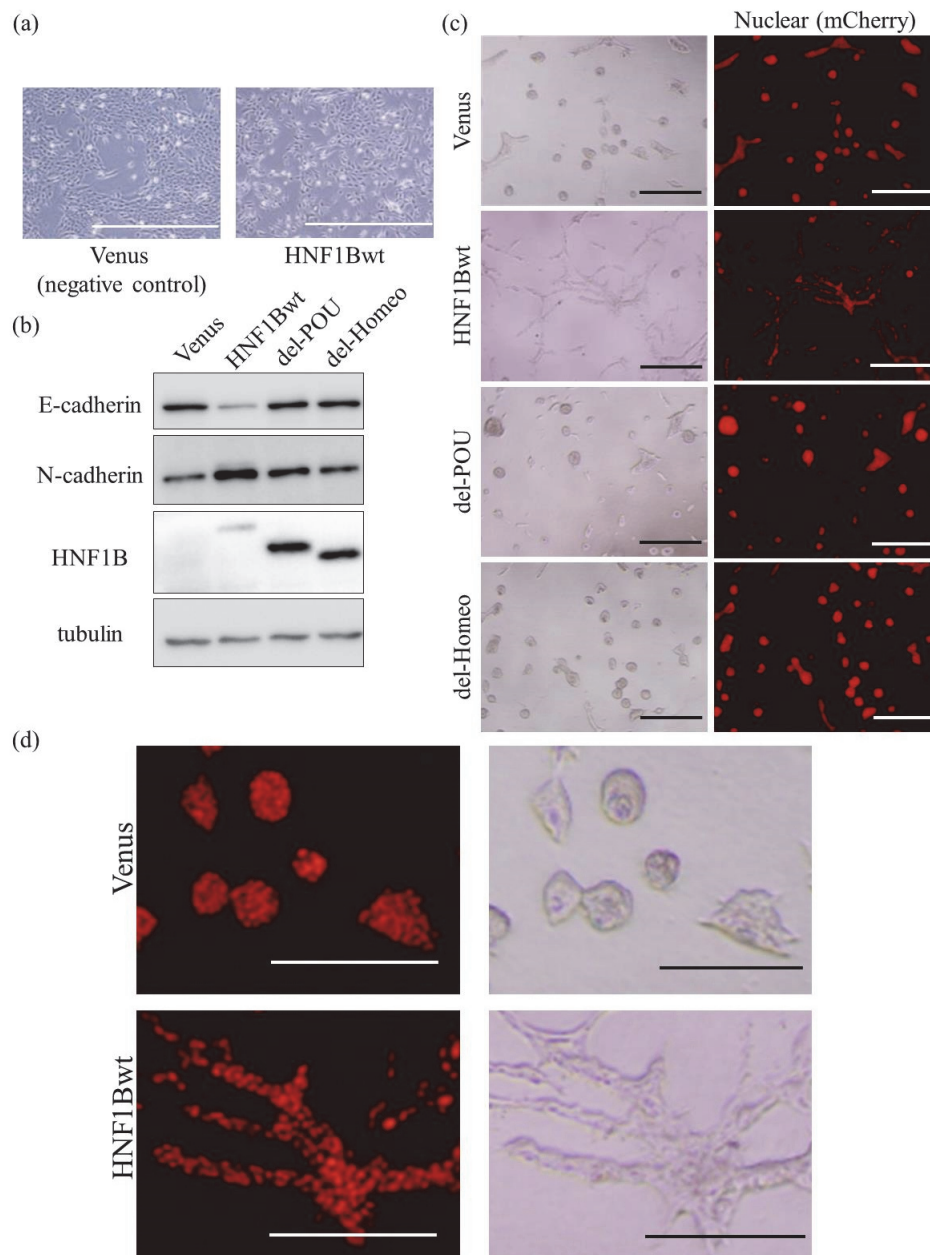


図 9. HNF1B 発現 MCF10A での EMT マーカーの発現と三次元培養

(a) HNF1B による MCF10A の形態変化。(スケールバー: 1 mm)

(b) 野生型 HNF1B と変異体 HNF1B 発現 MCF10A における EMT マーカーの発現。

(c) コラーゲン/マトリゲル混合ゲルでの MCF10A の三次元培養。右の画像は、核移行シグナルを融合させた赤色蛍光タンパク質 mCherry 発現 MCF10A の蛍光画像。(スケールバー: 500 μ m)

(d) (c)の拡大図 (スケールバー: 250 μ m)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

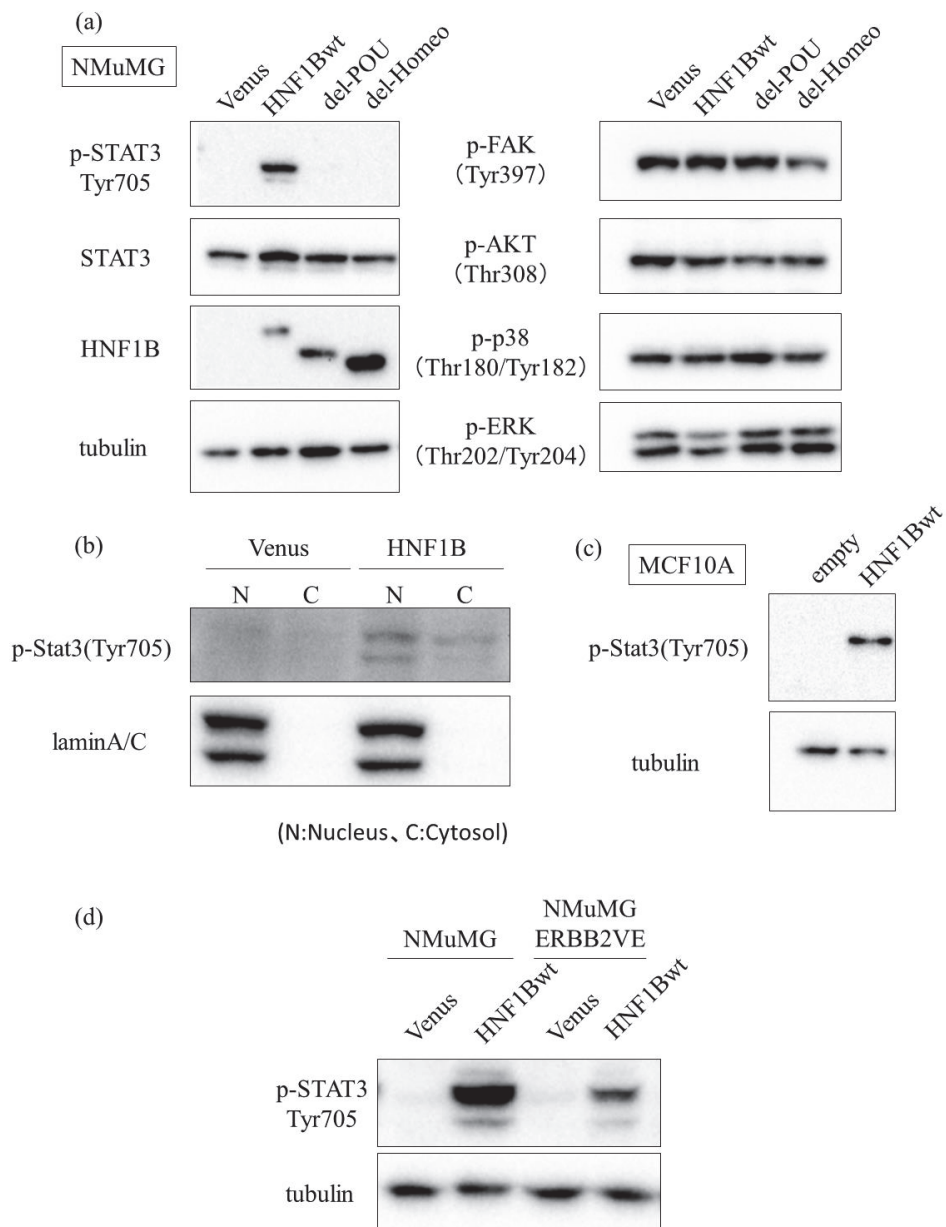


図 10. HNF1B 発現による STAT3 の活性化

(a) HNF1B 発現 NMuMG 細胞でのがん関連シグナルのリン酸化タンパク質の発現。

(b) HNF1B 発現 NMuMG 細胞での細胞質と核でのリン酸化 STAT3 の発現。

(c) HNF1B 発現 MCF10A 細胞におけるリン酸化 STAT3 の発現。

(d) ERBB2 と HNF1B 共発現時の NMuMG 細胞でのリン酸化 STAT3 の発現。

だけではなく、MCF10Aに *HNF1B* を発現させた際にも観察された (図 10c)。また、NMuMG 細胞において *ERBB2VE* との共発現時のリン酸化 STAT3 を確認したところ、リン酸化 STAT3 を確認することはできたが、*HNF1B* 単独発現時よりも減少していることが確認された (図 10d)。

そこで、JAK 阻害剤による STAT3 の活性化抑制と、RNAi による STAT3 のノックダウンによって *HNF1B* によって引き起こされるトランスフォーメーション(フォーカス形成)と EMT、浸潤能の誘導への STAT3 の関与を調べた。まず初めに、*HNF1B* 発現 MCF10A に種々の JAK 阻害剤を添加し、STAT3 のリン酸化の変化を調べた。用いた JAK 阻害剤 (Ruxolitinib、Tofacitinib、AG-490、NVP-BSK805)の中で、JAK1 と JAK2 の選択的阻害剤である Ruxolitinib が効果的に *HNF1B* による STAT3 のリン酸化を抑制することが示された (図 11a)。しかしながら、この阻害条件下における E-cadherin の発現を調べたところ、*HNF1B* による E-cadherin の減少を抑制することができなかった。NMuMG に Ruxolitinib を添加してフォーカスアッセイを行った。NMuMG でも STAT3 のリン酸化を抑制することが示されたが (図 11b)、フォーカスも阻害剤を加えない場合と同様に形成した (図 11c)。さらに、shRNA によって STAT3 をノックダウンし (図 12a)、その NMuMG 細胞を用いてフォーカスアッセイを行ったところ、コントロール shLuc と同様のフォーカスを形成した (図 12b)。これらのことから、*HNF1B* によって誘導されるフォーカス形成と EMT は STAT3 非依存的であることがわかった。

3.5. *HNF1B* による遺伝子発現ネットワーク

2 つ目の解析として、*HNF1B* 発現 MCF10A の遺伝子発現プロファイルを得るために、microarray 解析を行った。その結果、*HNF1B* の発現によって発現が up-regulate (> 4-fold) されている遺伝子が 81 個、down-regulate (< 0.25-fold) されているものが 67 個あった (表 7)。予想されたように、発現が変動している遺伝子の中には *ZEB2* や *TGFBI* など複数の EMT 関連因子が含まれていた。*HNF1B* 発現によってどのように EMT が引き起こされているかを調べるために、microarray によって得られた遺伝子発現プロファイルを用いて、過去に文献で報告されている相互作用がデータベース化された Metacore によってパスウェイ解析を行った。その結果、*HNF1B* により発現変

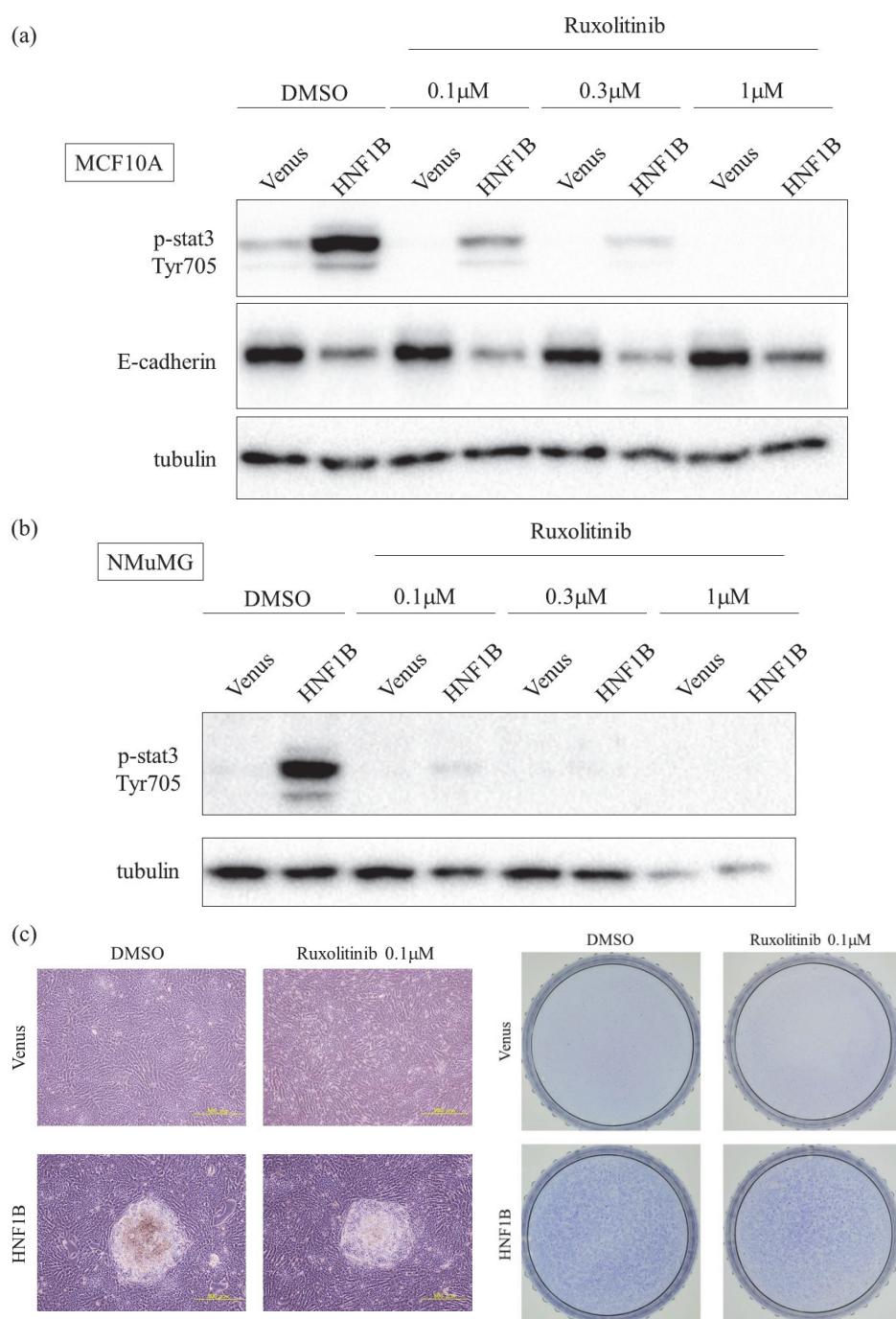


図 11. JAK 阻害剤による STAT3 の活性化抑制時の HNF1B の EMT 誘導能とフォーカス形成能

(a) MCF10A 細胞における JAK 阻害剤 Ruxolitinib 添加によるリン酸化 STAT3 と E-cadherin の発現。

(b) NMuMG 細胞における Ruxolitinib 添加によるリン酸化 STAT3 の発現。

(c) Ruxolitinib 添加でのフォーカスフォーメーションアッセイ。(Ruxolitinib 0.1 μ M) (フォーカスアッセイ 13 日目) (スケールバー: 500 μ m)

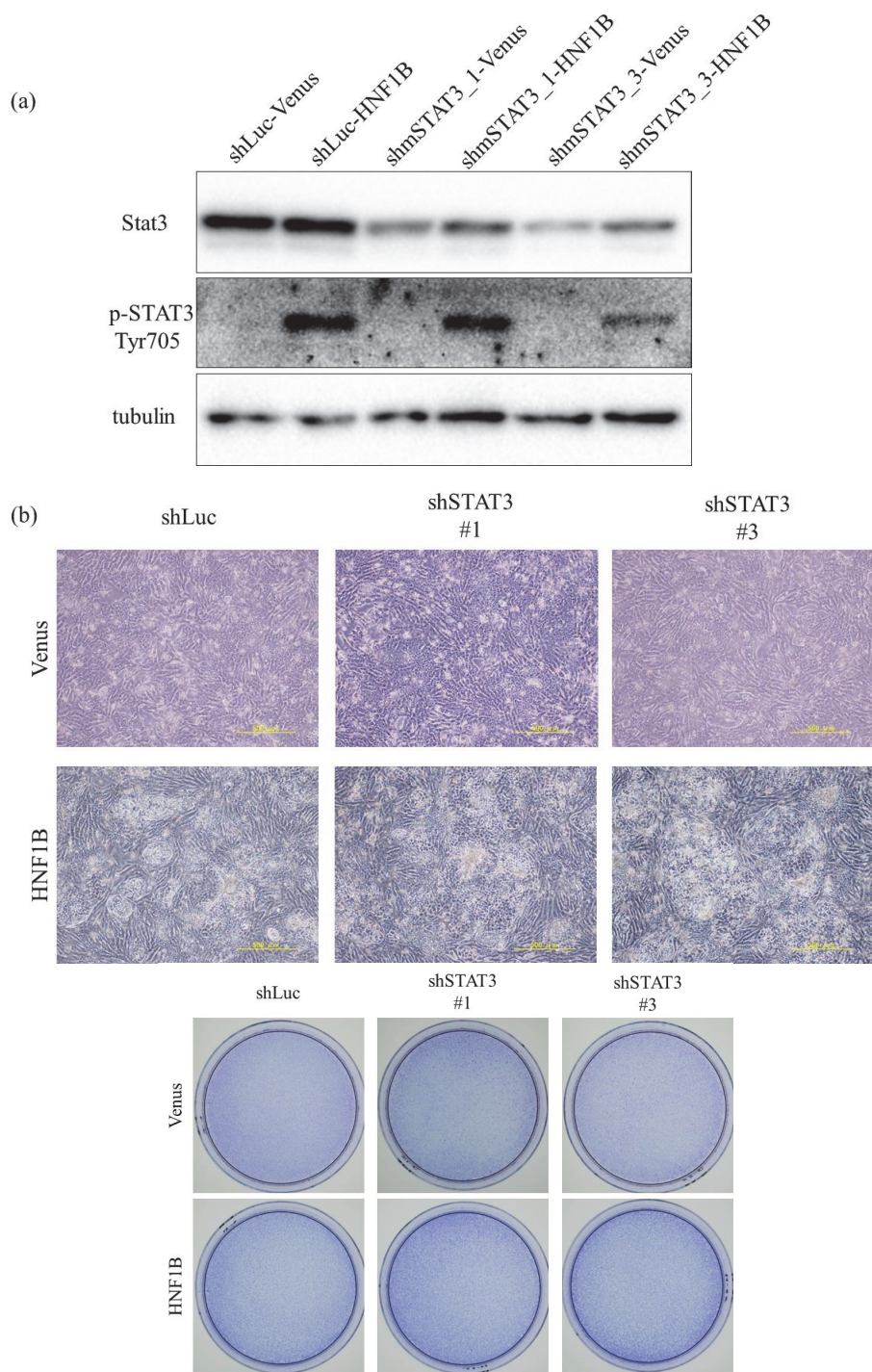


図 12. STAT3 の発現抑制時の HNF1B のフォーカス形成能

(a) shRNA による STAT3 のノックダウン NMuMG 細胞の STAT3 とリン酸化 STAT3 の発現。

(b) shRNA による STAT3 ノックダウン NMuMG 細胞のフォーカスフォーメーションアッセイ。(フォーカスアッセイ 10 日目) (スケールバー: 500 μ m)

動する遺伝子群が、p63 と ETS1 の下流因子群と高い頻度で一致しており (図 13)、*HNF1B*による p63 と ETS1 の制御が示唆された。

3.5.1. *HNF1B*による Δ Np63 と ETS1 の発現制御の可能性とその意義

転写因子 p63 は p53 遺伝子ファミリーの一員で 2 つのプロモーターと選択的スプライシングによって少なくとも 6 つのアイソフォーム (TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ , Δ Np63 α , Δ Np63 β , Δ Np63 γ)をコードしていることが知られている (図 14a)。これらのアイソフォームは *p21* や *Bax* などの細胞周期やアポトーシスに関わる標的遺伝子への転写活性が異なっており、 Δ Np63 は TAp63 や p53 のドミナントネガティブとして働くことが報告されている (Fomenkov et al., 2003; Lindsay et al., 2011; Little and Jochemsen, 2002)。その一方で、 Δ Np63 は N 末端側の転写活性化ドメイン (TA) 以外にも転写活性化ドメインを保持し、TAp63 や p53 の標的遺伝子や Δ Np63 特異的な標的遺伝子の転写を正に制御していることが報告されている (Dohn et al., 2001; Hibi et al., 2003; Moretti et al., 2010; Romano et al., 2007)。例として、ZEB1 や ZEB2 の発現抑制に関わる因子 mir-205 や HSP70 などが Δ Np63 によって促進的に転写制御されていることが報告されている (Tran et al., 2013; Wu et al., 2005)。このうち、 Δ Np63 α と β の欠失が MCF10A に EMT を誘導することが報告されている (Little and Jochemsen, 2002)。そこで、p63 のどのアイソフォームが発現変動しているかを調べるために、アイソフォーム特異的なプライマーを使用して定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を行った。その結果、 Δ Np63 と p63 α 、p63 β の mRNA の有意な減少 (0.22 倍、0.19 倍、0.21 倍、すべて $p < 0.001$) が確認された (図 14b)。さらに、p63 のすべてのアイソフォームを認識することができる抗体 (抗原 : aa 1-205) を用いることによって、タンパク質レベルで発現を確認し、見かけの分子量によりそれぞれのアイソフォームを同定した。その結果、*HNF1B* の発現によって Δ Np63 α と β のタンパク質量が大幅に減少していることが確認された (図 14c)。また、このデータより MCF10A で主要に発現しているアイソフォームが Δ Np63 α であることが確認できた。

もう一つのパスウェイの中心因子 ETS1 は、腫瘍の浸潤に必要とされるコラゲナーゼ I (MMP1) や IV (MMP2, MMP9)、ストロメライシン I (MMP3) のようなマトリックス分解酵素の発現を制御する転写因子として知られている

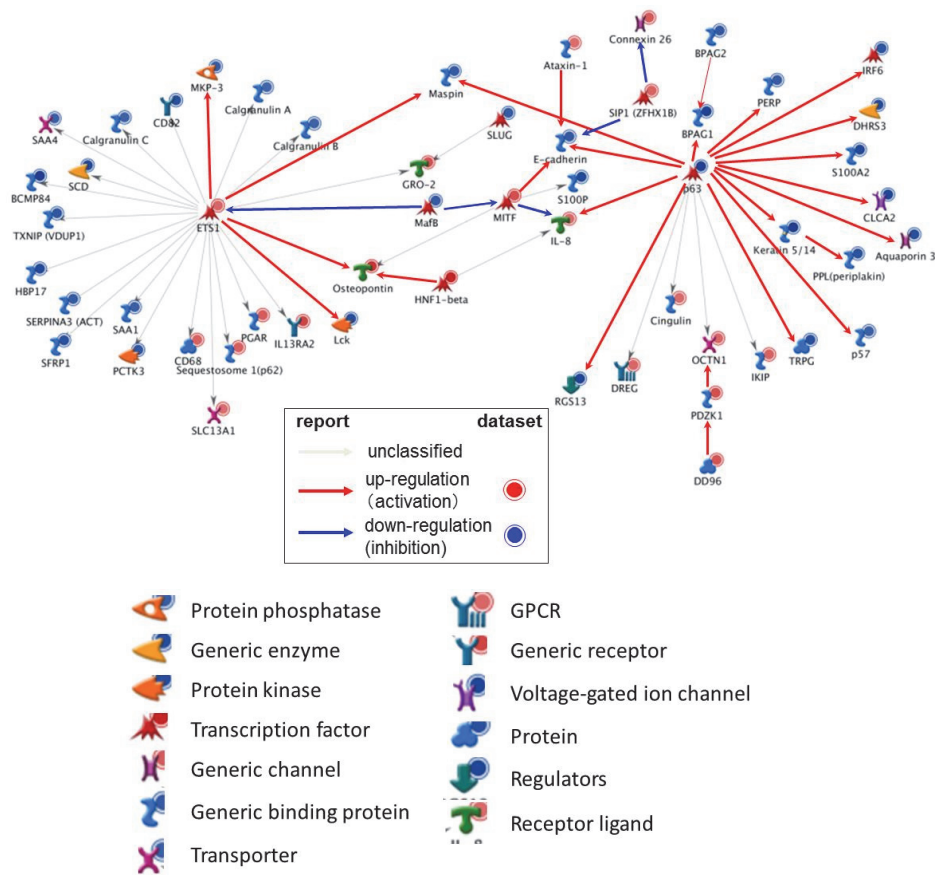


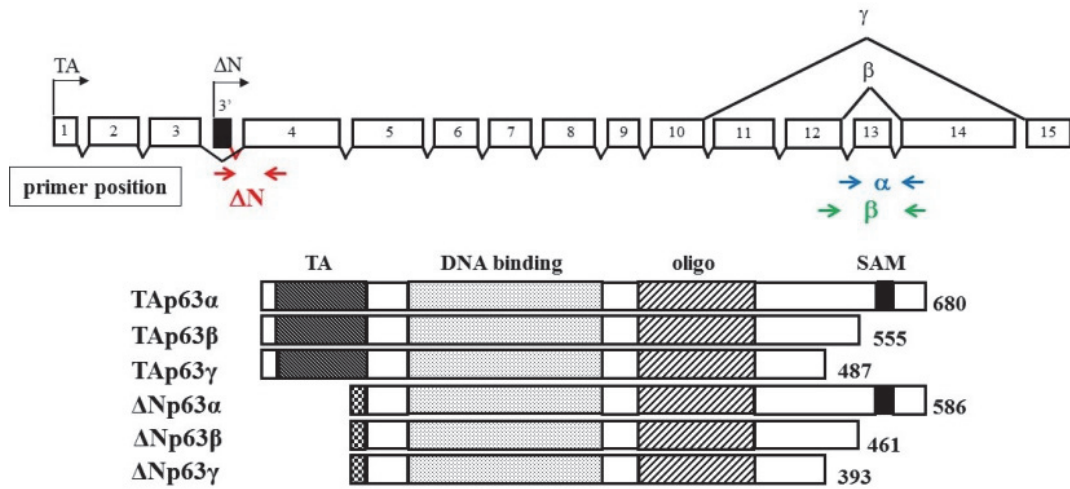
図 13. HNF1B による転写ネットワークの Metacore™ 解析

ETS1 と p63 の下流の標的遺伝子群の多くが発現変動している。

Microarray データの結果はタンパク質の右上に発現が up-regulate されていれば赤、down-regulate されていれば青で示されている。

矢印の色は過去に up-regulate に働くことが報告されているものは赤、down-regulate に働くものは青、相互作用に関する報告はあるものの機能が未知なものは灰色で示されている。

(a)



(c)

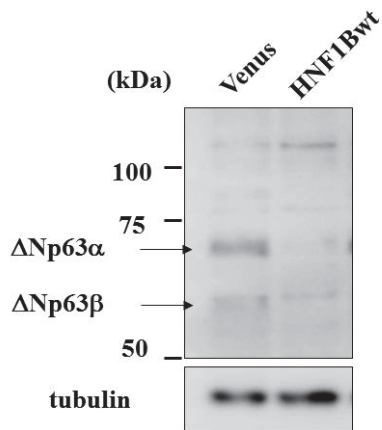


図 14. HNF1B 発現 MCF10A 細胞での EMT 関連遺伝子の発現

(a) TP63 の主な 6 つのアイソフォームと qRT-PCR に用いたプライマーの位置。

選択的スプライシングによって、αはエクソン 1-14、βはエクソン 1-12、14、γはエクソン 1-10,15 からなっている。TA 型とΔN 型はプロモーターの違いによって発現制御されている。

(c)TP63 アイソフォームのタンパク質発現。

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

(b)

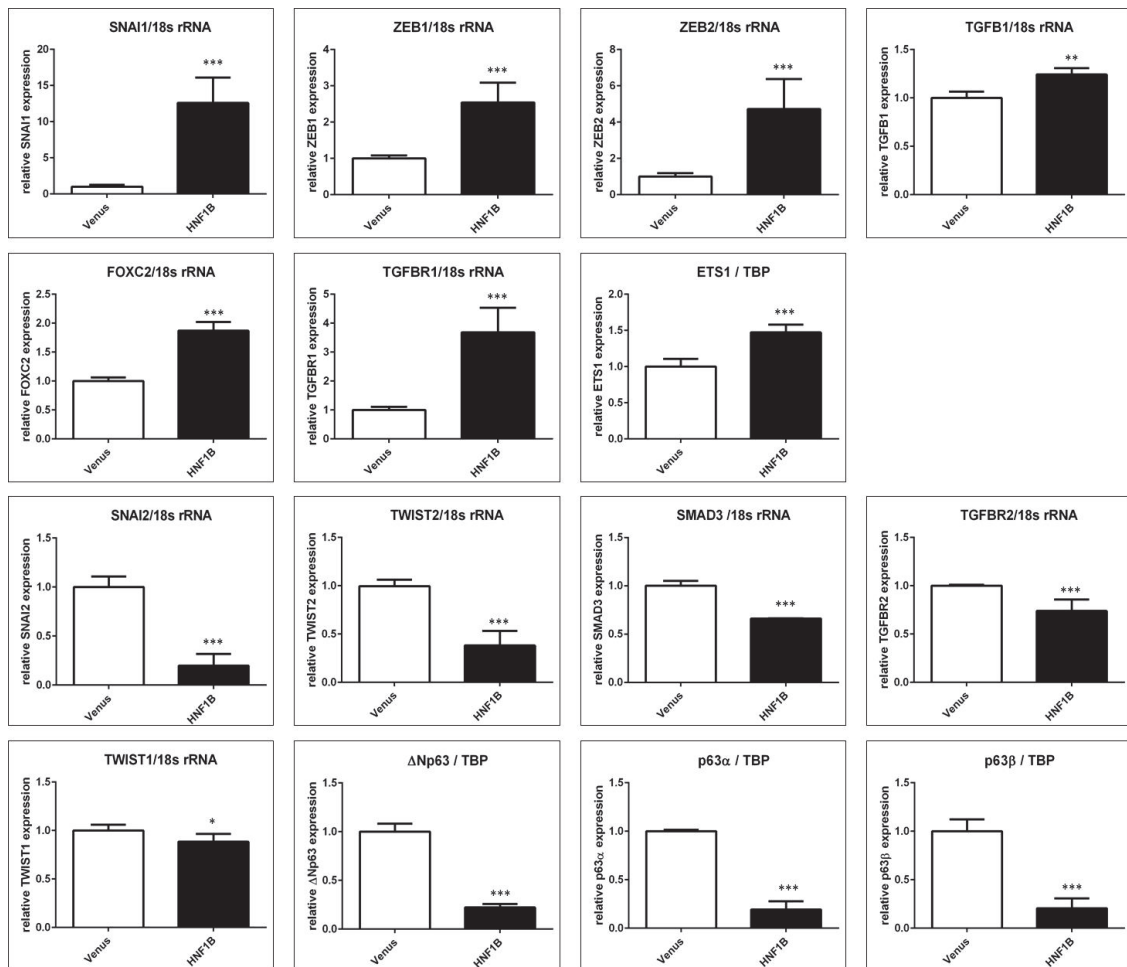


図 14. HNF1B 発現 MCF10A 細胞での EMT 関連遺伝子の発現

(b) qRT-PCR によって EMT 関連遺伝子と ETS1、TP63 の mRNA 発現量を計測した。

内在性コントロールは ETS1 と TP63 においては TBP、EMT 関連遺伝子においては 18s rRNA を用いた。(n=3) (*:p<0.05、 **:p<0.005、 ***:p<0.0005)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

(Behrens et al., 2001; Okuducu et al., 2006; Watabe et al., 1998)。また、 Δ Np63 α の発現が Id-3 依存的に ETS1 から MMP2 の経路を阻害することで、浸潤の抑制に働いていることが報告されている (Higashikawa et al., 2009)。このように、ETS1 にはがんの浸潤に関連している報告があり、 Δ Np63 α との関わりを示す報告もあることから、HNF1B の発現によって ETS1 の発現変化が起きているかどうかを qRT-PCR によって確認した。その結果、HNF1B 発現によって ETS1 の mRNA が有為に増加する (1.4 倍, $p < 0.001$) ことが確認された (図 14b)。ETS1 は他の遺伝子と比べて増加がわずかであったため、今回は解析をこれ以上行わなかった。

p63、ETS1 の既往研究と今回のデータより、HNF1B によって誘導される EMT の表現型に Δ Np63 α が関わっている可能性を考え、MCF10A から Δ Np63 α をクローニングし、 Δ Np63 α 発現ベクターを作製した。MCF10A 細胞に Δ Np63 α を発現させ、薬剤選択により MCF10A- Δ Np63 α 細胞を樹立した。HNF1B 発現によって Δ Np63 α の発現が減少することから、MCF10A- Δ Np63 α に HNF1B を発現させ、p63 と E-cadherin、N-cadherin の発現を調べたところ、 Δ Np63 α の発現は確認されたが、N-cadherin 発現がさらに増加し、HNF1B による EMT の誘導を抑制することができなかった (図 15)。これらの結果から、 Δ Np63 α は HNF1B による EMT に関与していないことが示された。

3.5.2. HNF1B による EMT 誘導因子の発現制御

HNF1B がどのようにして EMT や浸潤を引き起こしているかを解明するために、過去に EMT を誘導する因子として報告されている遺伝子 (Thiery et al., 2009) の発現変動を qRT-PCR によって網羅的に調べた。その結果、SNAI1 (12.8-fold)、ZEB1 (2.54-fold)、ZEB2 (4.73-fold)、FOXC2 (1.87-fold)、TGFB1 (3.69-fold)、TGFB2 (1.24-fold) mRNA の発現が増加していたが、その一方で、SNAI2 (0.20-fold)、TWIST2 (0.43-fold)、TGFB1 (0.74-fold)、TWIST1 (0.88-fold) の mRNA の発現は減少しており (図 14b)、マイクロアレイ解析との結果とほぼ一致する結果であった。

過去に、HNF1B の標的遺伝子はいくつか同定されている (Gong et al., 2009; Ma et al., 2007) が、これらの遺伝子の中に EMT の表現型に関連するようなものはなかった。しかし、発現変動がみられた EMT 関連遺伝子および E-cadherin の中に HNF1B の直接の標的遺伝子が存在する可能性を考え、転写因子の結合配列 (コンセンサス配列) が

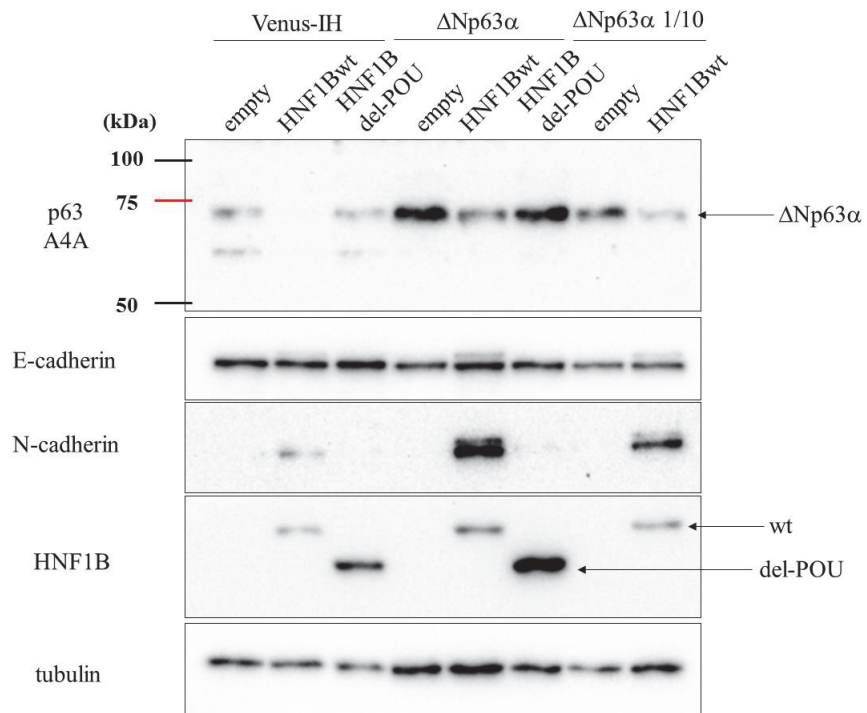


図 15. $\Delta Np63\alpha$ の強制発現時の MCF10A 細胞における EMT マーカーの発現
 $\Delta Np63\alpha$ 1/10はウイルス量を $\Delta Np63\alpha$ の1/10で感染し、選択を行った細胞である。

まとめられた JASPAR データベース (<http://jaspar.genereg.net/>)を用いて HNF1B によって発現変動した遺伝子の転写開始点から-2000bp+200bp の領域において HNF1B が結合するコンセンサス配列 (5'-TTAATNNTTAAC-3')を探索した。その結果、*CDH1* (E-cadherin)のプロモーターと予測される領域には HNF1B の結合配列は確認されず、*ZEB1*、*ZEB2*、*FOXC2*、*ΔNp63*のプロモーター領域と予測される領域に HNF1B が結合するコンセンサス配列に類似した配列 (相同性 80%以上) を同定した (図 16a, b, 表 8)。これらの領域に HNF1B が結合しているかどうかを調べるために、クロマチン免疫沈降 (ChIP)アッセイを行った。その結果、*ZEB2* (site1)と*ΔNp63* (site4)のプロモーターに HNF1B が結合することがわかった (図 16c, d, e)。他の候補の領域でも結合する傾向があったが、ネガティブコントロールとの差が有意ではなかったため、結合しないと判断した。これらの結果から、HNF1B は *TP63* 及び *ZEB2* 遺伝子の転写を直接制御している可能性が示唆された。そのため、*ZEB2* を RNAi によってノックダウンし、*HNF1B* 発現によって誘導される EMT と浸潤の表現型についてどのようになるか調べた。その結果、*ZEB2* をノックダウンすることで *HNF1B* によって減少した E-cadherin の発現量がコントロールと同等まで戻った (図 17a, b)。また、コラーゲン/マトリゲルでの浸潤の表現は完全に抑制することはできなかったが、有意に抑制した (図 17c)。このことから、*HNF1B* は *ZEB2* を介して EMT と浸潤能を誘導する可能性が示された。

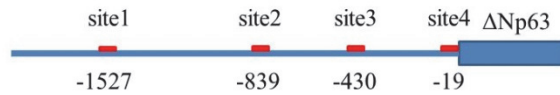
3.6. *HNF1B* による *ERBB2* 依存的腫瘍形成の促進

これまでに得た結果から、*HNF1B* はトランスフォーメーションだけではなく、がんの悪性化に関わる EMT や浸潤にも関わっていることが示された。そこで、*in vivo* 実験において、*HNF1B* の腫瘍形成能ならびに転移能を調べることにした。まず、*HNF1B* の造腫瘍能を確認するために、NMuMG-luc-HNF1B をヌードマウスの皮下 8 か所に移植し、造腫瘍アッセイを行った。結果として、8 か所すべてにおいて腫瘍の形成は認められなかった (図 18)。

次に、*HNF1B* のがんの悪性化への関与を調べるため、17q12-21 領域の driver 遺伝子である *ERBB2* に着目した。活性型変異体 *ERBB2VE* の発現によってトランスフォームさせた NMuMG-luc-ERBB2VE 細胞を *ERBB2* によってがん化した乳癌細胞のモ

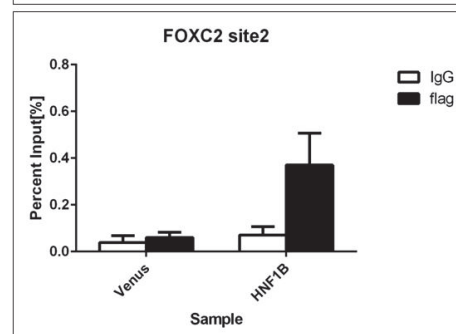
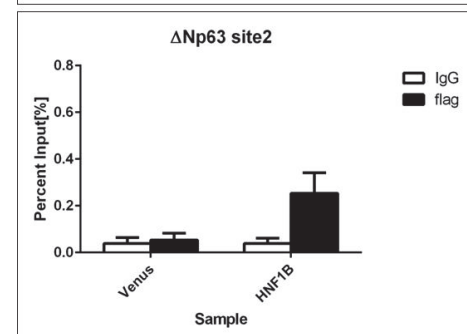
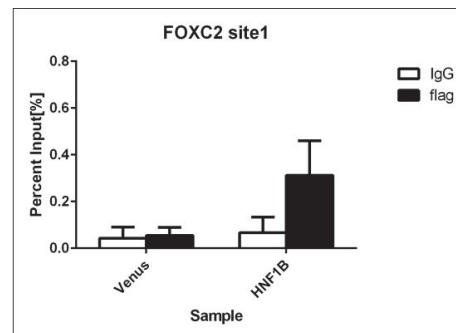
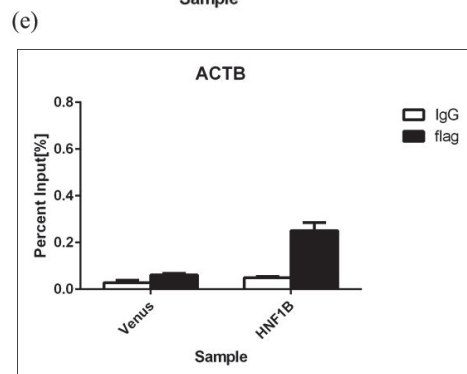
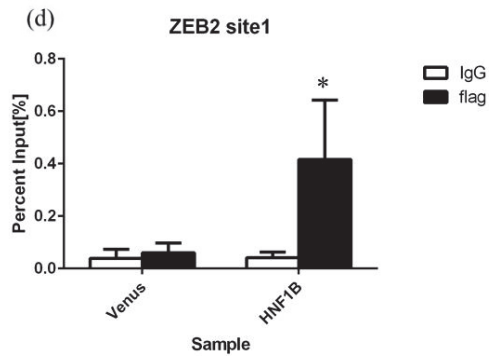
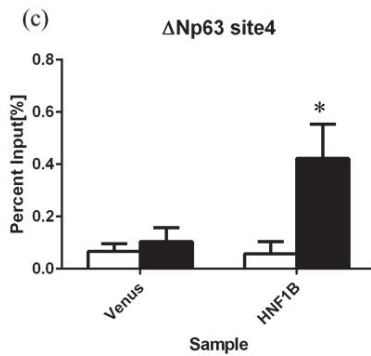
(a)

	site1	site2	site3	site4
Human:	-GTTAATTATAGG--CTAATCATTAC--CTAATTCTAAC--GGTATATATTAG-			
Rhesus:	-GTTAATTATAGG--CTCATCATTAC--CTAATTCTAAC--GGTATATATTAG-			
Mouse:	-GTTAACGTAAGG--TTAGTCATTAG--CTAATCTCTAAC--GGTATATATTAG-			
Dog:	-GTTAATTACAGT--TA-----TTT-----AATTACTAAC--GGTATATATTAG-			
Consensus:	-GTTAATNATTAAC-			



(b)

	site1	site2
Human:	-TTTATATTTTAC--TTAATAAATAAA--GTTAATCAAAAA-	
Rhesus:	-TTTATATTTTAC--TTAATAAATAAA--GTTAATCAAAAA-	
Mouse:	-GCTATATTTTAC--TTAATAAAGAA--GTTAATCAAAAA-	
Dog:	-TTTATGTTTCAC--ATTATAAAGAA--GTTAATCAAAAA-	
Consensus:	-GTTAATNATTAAC-	



(e)

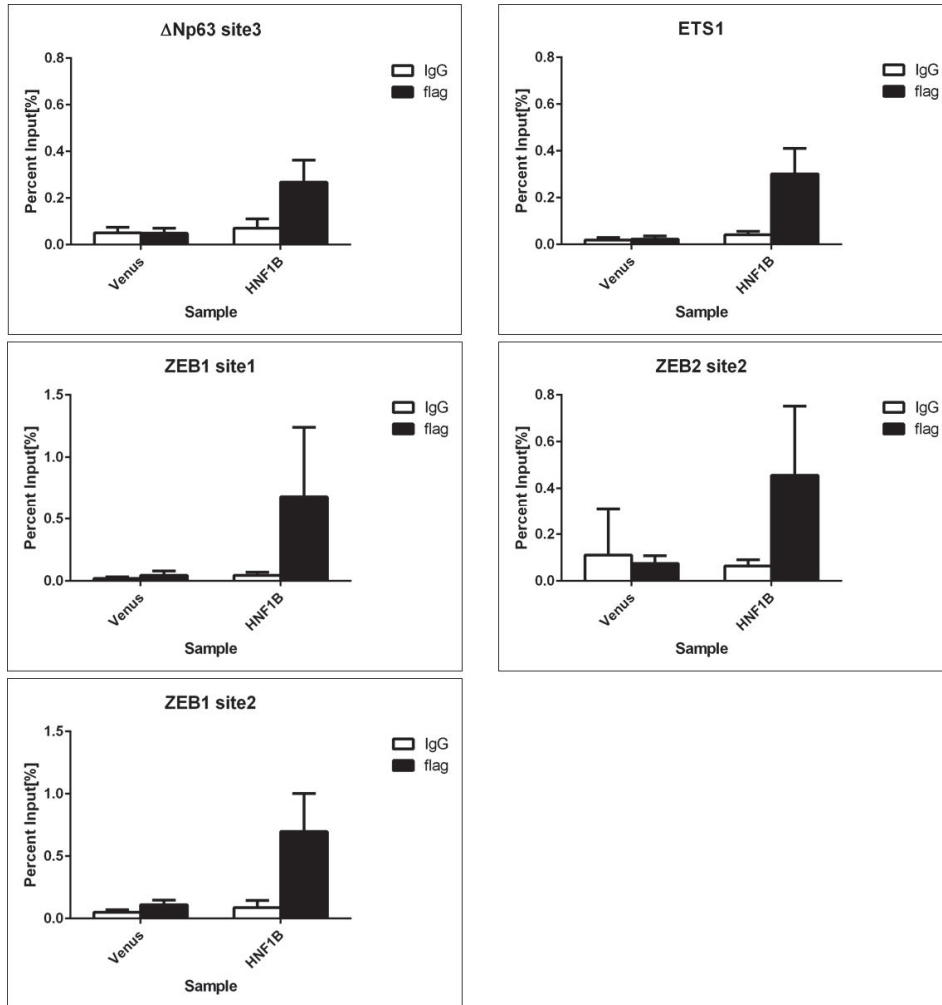


図 16. HNF1B はΔNp63 と ZEB2 の上流領域に結合する

(a), (c) 転写開始点から-2000bp の領域に HNF1B のコンセンサス配列が含まれていた。
(b), (d), (e) HNF1B の結合候補配列での MCF10A 細胞を用いての ChIP 解析。(n=3)
(ΔNp63 site4 と ZEB2 site1 は有意差があった。p<0.05。その他の候補配列は有意差がなく、ΔNp63 site1 に関しては解析することができなかった。)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

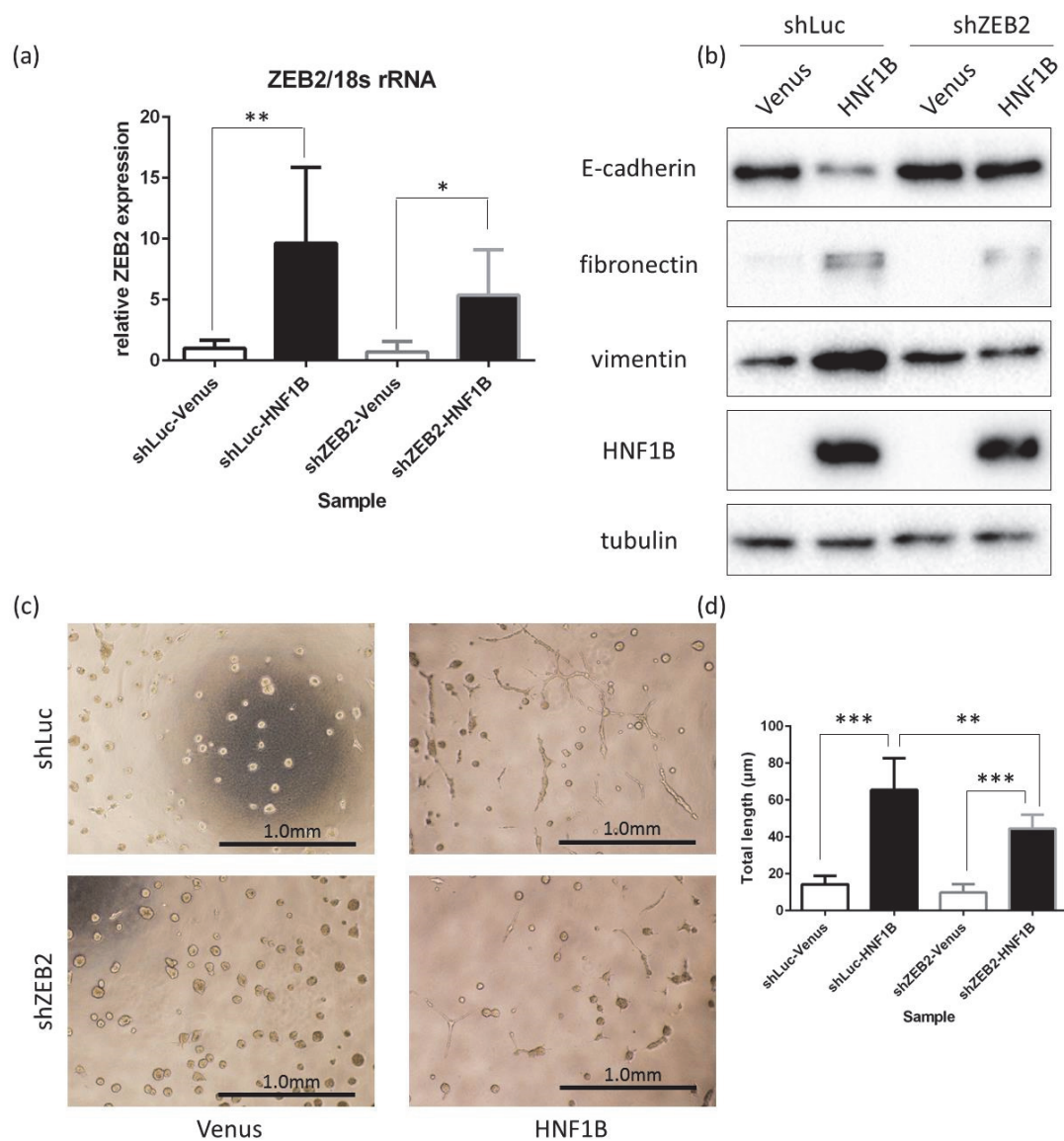


図 17. ZEB2 の発現抑制時の EMT マーカーの発現と浸潤の表現型

(a)ZEB2 発現抑制時の ZEB2mRNA 発現量。

(b)ZEB2 発現抑制時の EMT マーカー (E-cadherin、fibronectin、vimentin) の発現

(c)ZEB2 発現抑制時のコラーゲン/マトリゲル混合ゲルでの MCF10A の三次元培養。

(d)(c)の細胞が伸張している長さを定量化し、グラフ化した。(1 サンプルにつき 3well 行い、1well につき 3 視野ずつ画像を取得した。計 9 視野を定量化した。)

***: $p < 0.0001$ 、 **: $p < 0.005$ 、 *: $p < 0.05$

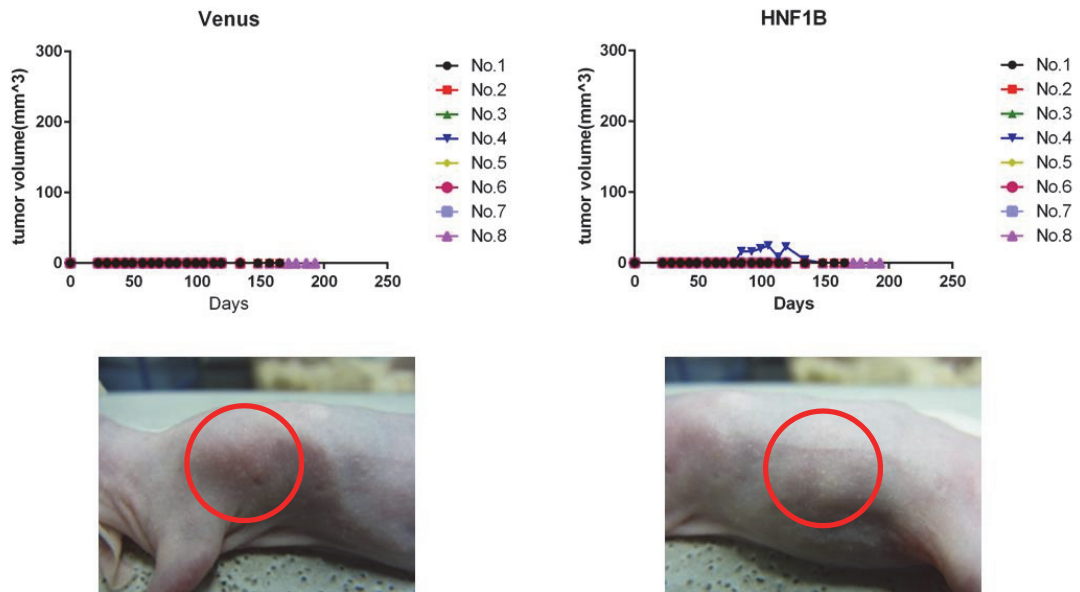


図 18. 皮下移植での造腫瘍アッセイ

1サンプルにつきヌードマウスの皮下8か所に移植して1週間に1回長軸と短軸をノギスによって計測し、193日間観察した。赤丸は移植した部位を示している。

デルとして用いることとし、*HNF1B*を発現させ、同所性移植と尾静脈移植の2つの転移アッセイによって評価を行った。転移アッセイを行う前にまず、NMuMG-luc-ERBB2VE細胞と*HNF1B*を発現させたNMuMG-luc-ERBB2VE細胞の*in vitro*での増殖速度を調べたところ、*HNF1B*の発現の有無による増殖速度の違いはなかった(図19a, b)。しかし、これらの細胞をfat padに移植したところ(同所性移植)、*HNF1B*を発現させたNMuMG-luc-ERBB2VE細胞の腫瘍形成能力は親株(NMuMG-luc-ERBB2VE細胞)と比べて大幅に亢進していた(図19c)。腫瘍が300 mm³以上になった時点で原発巣を切除し、経時観察を続けた結果、切除後4週間で親株の細胞を移植したマウスでも*HNF1B*発現NMuMG-luc-ERBB2VE細胞を移植したマウスでも、肺やリンパへの転移を確認したが、*ex vivo*イメージングにおいて肺でのluciferinの発光量に顕著な差があった(図19d, e, 表9)。転移巣を形成した肺をHE染色で染めたところ、*HNF1B*発現NMuMG-luc-ERBB2VE細胞によって形成された転移巣は親株よりも数が多かった(1つの肺あたり親株は平均6.5個、*HNF1B*は平均15.5個)。また、*HNF1B*発現NMuMG-luc-ERBB2VE細胞でのみ肺以外の脳や骨への転移が見られた(表9)。さらに、原発巣切除から2週間後には*HNF1B*発現NMuMG-luc-ERBB2VE細胞を移植したマウスのほとんどで肺への転移が観察された(親株は8匹中3匹、*HNF1B*は8匹中6匹)。*HNF1B*発現細胞を移植したマウスでは3匹が脳転移を起こしているが、そのうち2匹は原発巣切除後2週間で観察された。*HNF1B*発現による造腫瘍能力の増強や転移部位の違いがどのように引き起こされているかを調べるため、原発腫瘍の組織切片を作製し、増殖マーカーであるKi-67、血管内皮マーカーであるCD31、リンパ管内皮マーカーであるLYVEの発現を免疫染色にて確認した。その結果、*HNF1B*発現NMuMG-luc-ERBB2VE細胞によって形成された腫瘍においてKi-67陽性細胞が多い結果が得られた(図20a)。CD31の発現は腫瘍間でばらつきが多く、*HNF1B*発現の有無による違いはなかったが(図20b)、LYVEの発現は*HNF1B*発現によって減少していた(図20c)。この結果から、*HNF1B*はリンパ管や血管を強く誘導することではなく、*in vivo*での細胞増殖能を亢進することによって*ERBB2VE*による造腫瘍能を増強していることが示唆された。同所性移植の場合、原発巣における増殖能の違いによって血中に侵入する細胞数が異なってしまうことから、同じ細胞数が血中に侵入した際の結果を得るために、尾静脈移植を行った。尾静

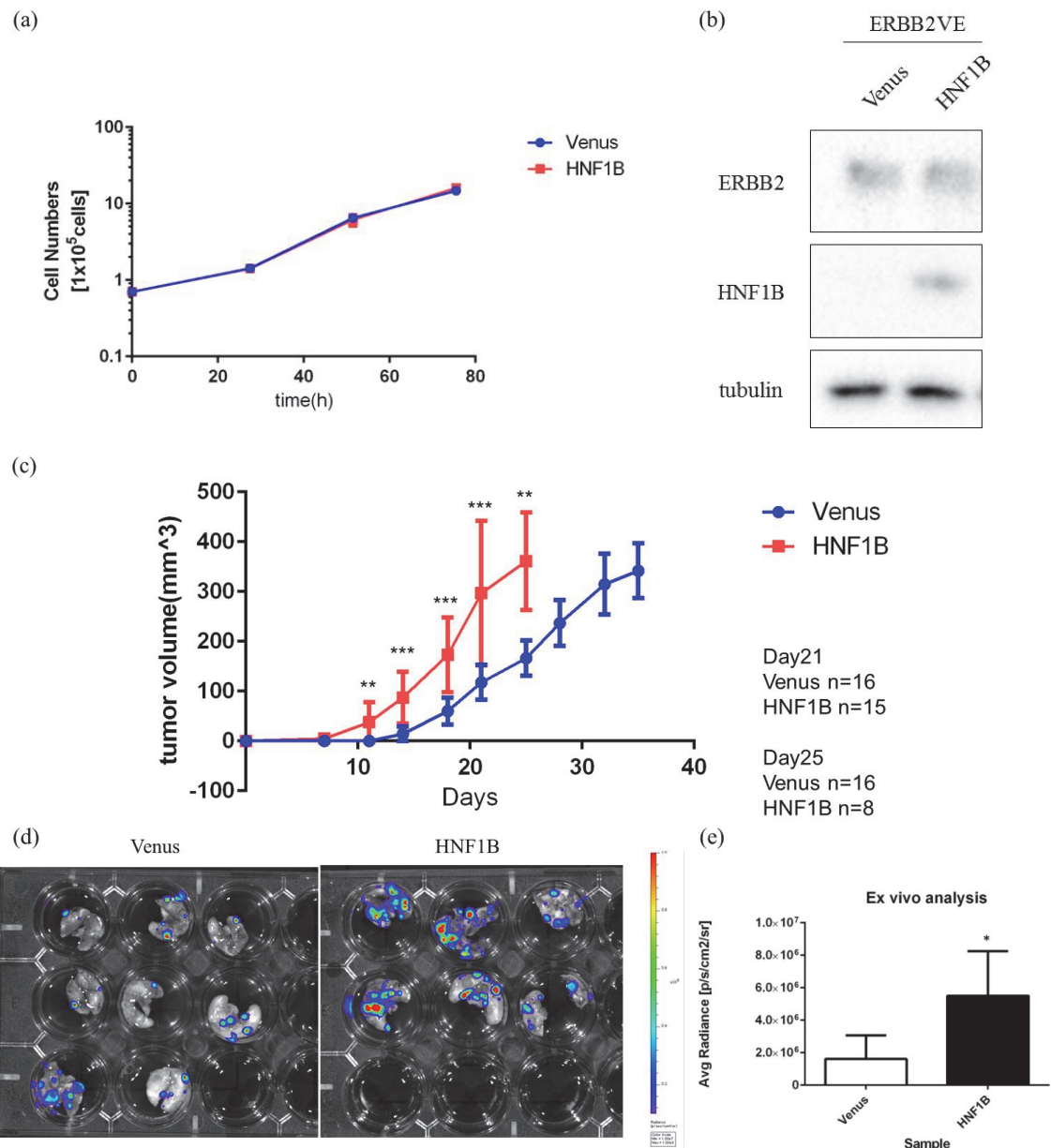


図 19. 同所性移植による造腫瘍能と転移能の評価 (NMuMG-luc-VE 使用)

(a) *in vitro*において、移植に使用する細胞の増殖速度を1サンプルにつき2wellずつ1日おきに3日間計測した。(n=2)

(b) 移植に用いた細胞の ERBB2 と HNF1B の発現。

(c) 移植後の原発巣における腫瘍体積を経時的に計測した。腫瘍体積が 300mm^3 を超えた時点で原発巣を切除した。(n=16) (**:p<0.005、***:p<0.0005)

(d) 原発巣切除後28日目に、肺を摘出しIVISによって *ex vivo*での肺の luciferin 発光を計測した。(Venus: n=8、HNF1B: n=6)

(e)(f)の発光強度を数値化した。(p<0.05) (Venus: n=8、HNF1B: n=6)

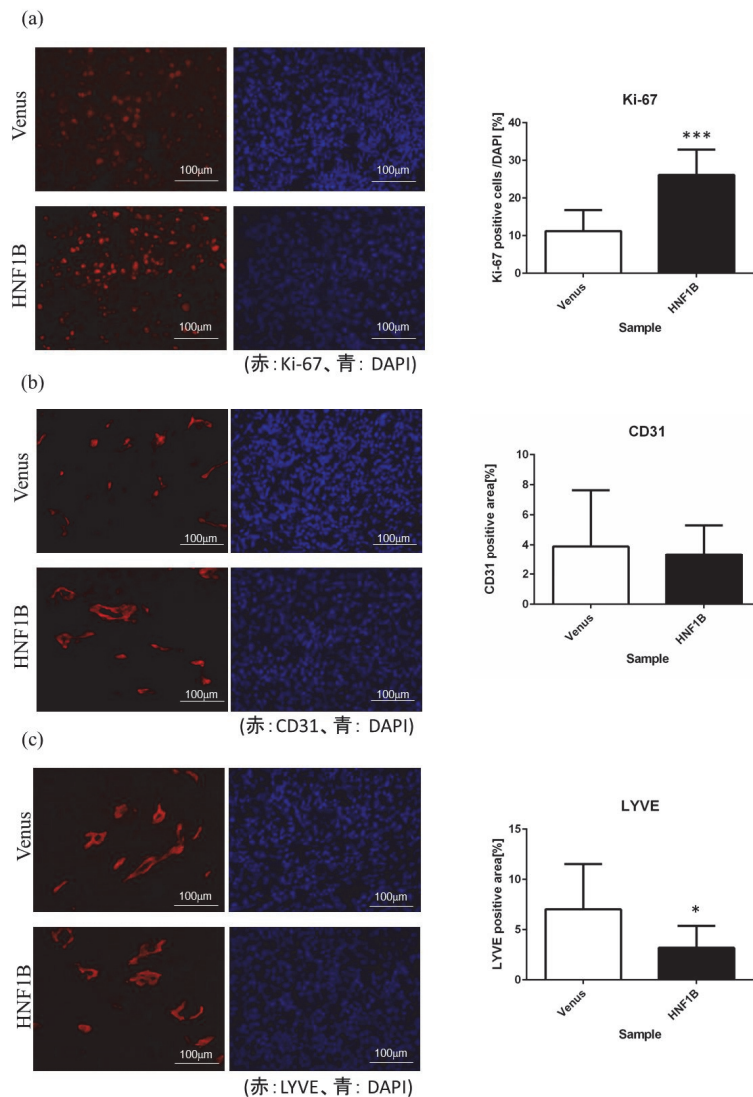


図 20. 原発腫瘍における免疫染色解析

Venus、HNF1Bそれぞれ形成された腫瘍5個を切片にし、それぞれの抗体で免疫染色した。1つの腫瘍につき3視野分を撮影した。

(a) Ki-67抗体による免疫染色。両方のサンプルとも15視野のKi-67陽性細胞数とDAPI陽性細胞数をImage Jによって計測し、Ki-67陽性細胞が占める割合を算出した。Venusが11%、HNF1Bが26%であった。(p < 0.0005)

(b) CD31抗体による免疫染色。両方のサンプルとも15視野のCD31陽性領域をImage Jによって計測した。Venusが3.90%、HNF1Bが3.34%となった。

(c) LYVE抗体による免疫染色。両方のサンプルとも15視野のLYVE陽性領域をImage Jによって計測した。Venusが7.02%、HNF1Bが3.19%となった。(p < 0.05)

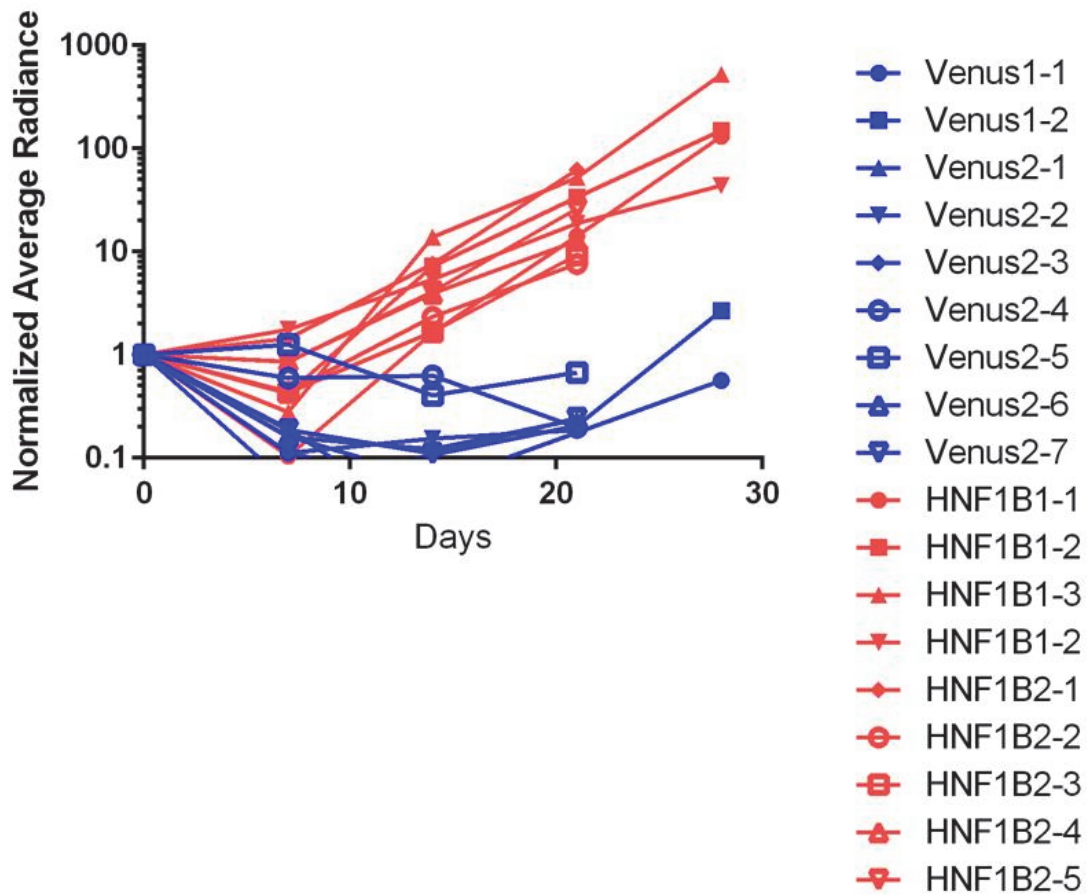
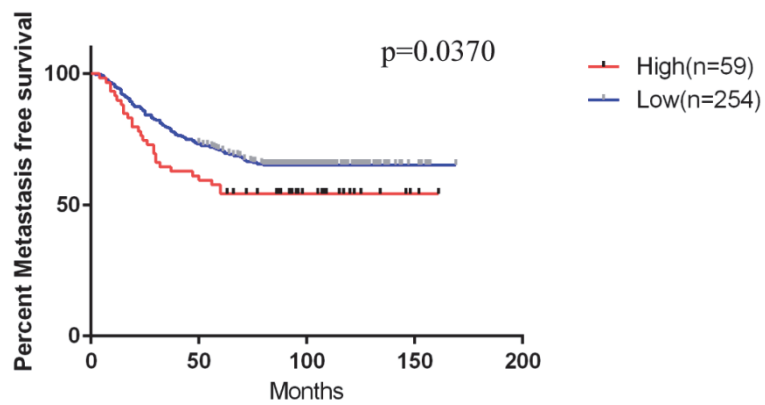


図 21. 尾静脈移植の肺での luciferin 発光の経時変化
 IVIS によって、1 週間に 1 回 luciferin 発光を計測し、4 週間にわたって観察した。Day0 の average radiance を 1 としている。(n=9) (青 : Venus、赤 : HNF1B)

Zhang et al. GSE10099



Hatzis et al. GSE25066

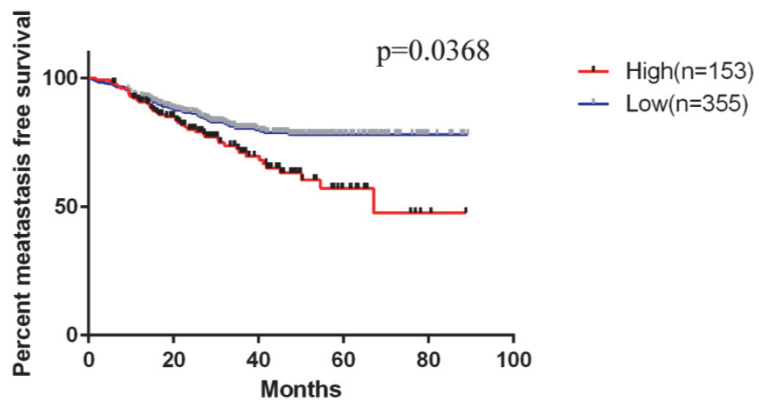


図 22. 乳がんにおける HNF1B 発現と予後の関係

13 個の乳がんのデータセットのうちこれら 2 つのデータセットにおいて HNF1B 高発現群と低発現群では、高発現群で有意に早く再発が見られる。(p<0.05)

(Mastui et al, FEBS Lett. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/1873-3468.12147 より引用)

脈移植においても同所性移植と同様にすべてのマウスで肺への転移は確認されたが、肺での発光強度に大きな差があった（図 21）。そして、*HNF1B* 発現 NMuMG-luc-ERBB2VE 細胞を打ち込んだマウスでのみ脳や骨への転移が確認された（表 10）。肺での luciferin 発光の経時観察によると、Day7 では発光強度は変わらなかったのに対し、Day14 から *HNF1B* 発現細胞を移植したマウスでの肺の luciferin 発光強度が増大していた。

以上の結果から、*HNF1B* がおそらくは *in vivo* での増殖促進によって、腫瘍形成能や転移能を亢進させることが示唆された。そこで、実際の臨床データすなわち、乳がん患者のデータセットを用いて *HNF1B* mRNA の発現と予後との相関性を調べたところ、*HNF1B* 過剰発現がん患者は転移、再発率が高いことが示された（図 22）。*HNF1B* が *ERBB2* の腫瘍形成能や転移能を促進することから、HER2 陽性乳がんの患者において *HNF1B* 過剰発現がん患者の予後が悪くなることを予想し、これらのデータセットから HER2 陽性乳がんの患者を抽出して検討したが、有為な差は見いだせなかった（data not shown）。

3.7. ホメオボックス遺伝子のトランスフォーミング活性

17q12-21 アンプリコンのスクリーニングとは別に、HER2 陽性乳がんで過剰に発現している 641 個の遺伝子について、NMuMG-ERBB2wt 細胞を用いて同様なスクリーニングを行ったところ、トランスフォーミング遺伝子としてホメオボックス遺伝子の *EMX1* を同定した（図 23a）。*EMX1* も *HNF1B* と同様に *ERBB2* 非依存的にトランスフォーム活性を持っていた。さらに、以前からホメオボックス遺伝子とがんとの関連性が示唆されていること（Cillo et al., 1999; Haria and Naora, 2013）から、ホメオボックス遺伝子のがんにおける重要性をより包括的に理解するため、他のホメオボックス遺伝子単独でのトランスフォーミング能を NMuMG によるフォーカスアッセイによって調べることにした。235 個のホメオボックス遺伝子の中から乳がんで高発現しているものを中心に 22 種類のホメオボックス遺伝子（*HOXB3*, *DLX3*, *ZHX2*, *PHTF1*, *ZHX1*, *HOXC10*, *ADNP*, *HOXC6*, *HOXB7*, *HOXC4*, *HOXB5*, *HOXB9*, *HOXB6*, *HOXC8*, *HOXB13*, *DLX4*, *HOXC11*, *BARHL1*, *CERS6*, *MEIS2*, *PITX3*, *DLX1*）を個別に NMuMG に導入し、フォーカスアッセイを行ったところ、5 つのホメオボックス遺伝子

(*DLX1*, *DLX3*, *DLX4*, *HOXC4*, *HOXB13*)が NMuMG をトランスフォームした (図 23d)。*DLX1* や *DLX3* が形成するフォーカスは細胞が幾層にも重なりながらも周りに伸びていくような形態を示し、特に、*DLX3* は形態変化が顕著であった。*DLX4* や *HOXB13* は扁平状の細胞形態が特徴的であり、*HOXC4* は細胞の接着性が弱く運動性の高い形態が特徴的であった。また、*HNF1B* だけではなく、*EMX1* 発現細胞においても DNA 結合活性依存的に *STAT3* のリン酸化が起きていた (図 23b) ことから、これらの遺伝子発現細胞において *STAT3* のリン酸化を調べたところ、トランスフォーミング活性を示す 5 つの遺伝子のうち *DLX4*, *HOXC4*, *HOXB13* では *STAT3* のリン酸化が顕著に亢進していることが確認された (図 23c)。

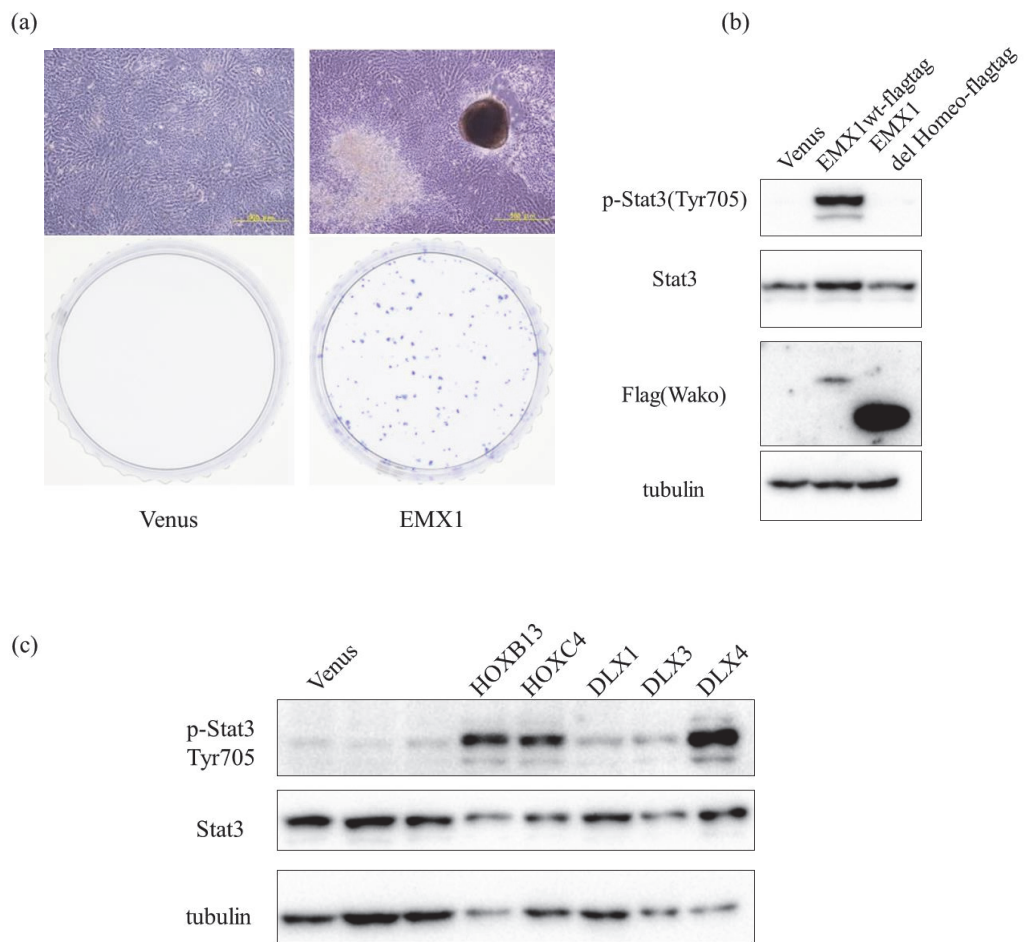


図 23. HNF1B 以外のホメオボックス遺伝子におけるトランスフォーミング活性
 (a) EMX1 発現細胞のフォーカスフォーメーションアッセイ。(12 日目)(スケールバー：
 500 μ m)
 (b) EMX1 発現細胞でのリン酸化 STAT3 の発現。
 (c) トランスフォーミング活性を持つ 5 つのホメオボックス遺伝子発現細胞でのリン酸化
 STAT3 の発現。(Venus の右横 2 つのレーンは別実験で導入した MITF と SPP1 発
 現細胞である。)

(d)

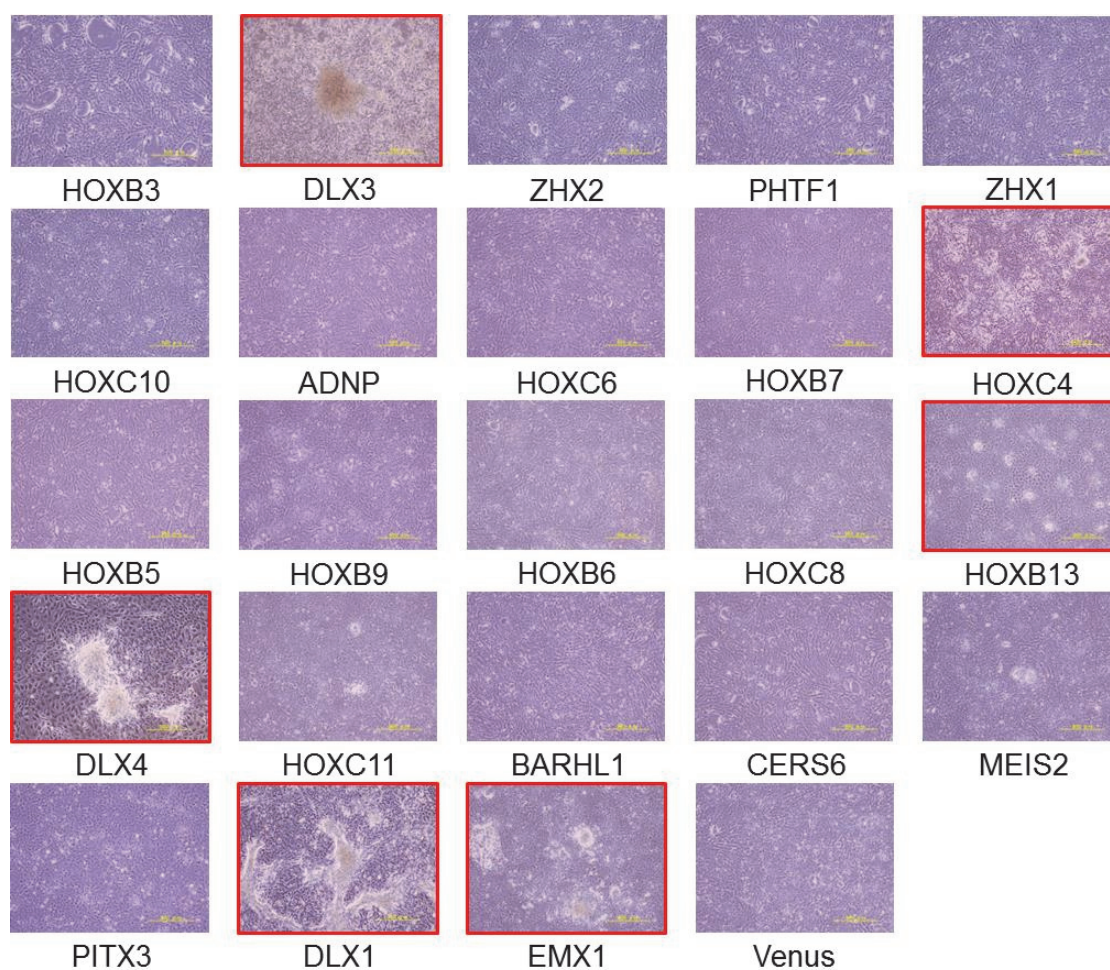


図 23. HNF1B 以外のホメオボックス遺伝子におけるトランスフォーミング活性
(d) 22 種類のホメオボックス遺伝子のフォーカスフォーメーションアッセイ。(20 日目)
(スケールバー : 500 μm)

4. 考察

4.1. NMuMG 上皮細胞を用いることの意義

乳がんを含む多くのがんは上皮細胞から発生することから、上皮細胞株 NMuMG を用いてスクリーニングを行い、17q12-21 の遺伝子増幅領域の 52 個の遺伝子の中から *HNF1B* を同定した。この遺伝子は同じ領域の遺伝子を対象とした NIH3T3 を用いたスクリーニングでは同定されなかった。一方で、NIH3T3 を用いたスクリーニングで *ERBB2* と協調してトランスフォーメーションを増強する遺伝子として *GRB7* が同定された (Saito et al., 2012) が、NMuMG を用いたスクリーニングでは *GRB7* を同定できなかった。実際に、同一のアンプリコンから異なる細胞のスクリーニングによって同定されてきた *GRB7* や *RARA* を NMuMG-ERBB2wt に発現させてもフォーカスは形成されなかった。これらの結果から、レシピエント細胞に異なる細胞を使用することで、異なるがん遺伝子を同定できることが分かった。接触阻止の消失には細胞間接着の減弱、破綻が重要だとする報告がある (Takai et al., 2008) ことから、上皮細胞は細胞間接着制御に関わる遺伝子によって接触阻止の消失をともなうフォーカス形成が起こりやすいことが考えられる。今回同定した *HNF1B* は EMT を誘導することから、細胞間接着に重要な E-cadherin の減少が起こることが、フォーカス形成を起こす一つの条件であると考えられる。したがって、*HNF1B* のように EMT の誘導をともなう遺伝子は、NIH3T3 のような線維芽細胞ではなく、NMuMG のような上皮細胞を用いることで同定が可能なのかもしれない。上皮系細胞を用いたスクリーニングを行うことは今まで同定されてこなかったがん遺伝子やがん関連遺伝子を同定するのに有効な手段であることが言える。

4.2. 本スクリーニング法の改善点

本研究に用いたスクリーニング法は、これまでの cDNA ライブラリーを用いるスクリーニング法と異なり、対象とする遺伝子を自由に選択することができる。さらに、cDNA ライブラリーでは各遺伝子の発現量の差によりライブラリー中に含まれる各遺伝子由来の発現ベクターの量が桁違いに異なるが、本法では、各遺伝子間でほぼ同程度の導入効率と発現 (すくなくとも mRNA の) が期待される。これらのことが本法の最

大の利点である。結果として、遺伝子増幅領域にある 52 個の遺伝子の cDNA クローンを用いてフォーカスアッセイを行うことにより *HNF1B* を同定することができたが、スクリーニング時に単離した 29 フォーカスのうち 7 フォーカスでしか *HNF1B* を検出することができなかった。この結果から、*HNF1B* 以外にもがん遺伝子が存在する可能性が残されている。本手法では、挿入された cDNA の同定方法として、ゲノム PCR によるサブクローニングを行い、1 フォーカスあたり平均異なる 5 個のクローンの配列決定を行った。私がスクリーニングを行った後に、当研究室では microarray 解析による cDNA の同定が行われた。この方法では、導入されたヒト由来 cDNA の発現をヒト遺伝子用の microarray で検出する。この手法によると組換えレトロウイルスによって 1 つの細胞に挿入され、発現する遺伝子は少なくとも十数個に上ると推測された (Inagaki *et al.*, Kochi *et al.*, unpublished data)。それ故、今回絞りこんだ 11 個の遺伝子以外にトランスフォーミング活性を持った遺伝子が存在している可能性がある。また、今回は 52 個の遺伝子を同時に導入したため、導入効率のばらつきにより解析していない遺伝子も存在すると考えられる。にもかかわらず、表 7 にみられるように多くの遺伝子が頻度の差はあるが同定されていることから、cDNA クローンをを用いる本手法は、従来の cDNA ライブラリーを用いるよりは個別の遺伝子の機能を調べる系になっていたと考えられる。なお、microarray を用いて発現量の差で判断する方法でも、発現量の低いものを見落とす可能性があり、確実にすべての導入遺伝子を同定することは難しい。それゆえ、一つ一つの遺伝子を導入して機能を調べるのが最も有効な方法である。当研究室で、この個別遺伝子の導入と 96 ウェルフォーマットでのトランスフォーメーションによる個別遺伝子の評価系が確立されている。

4.3. アンプリコンのスクリーニングの意義

遺伝子増幅は染色体上のある領域の遺伝子のコピー数が増加する現象であり、ショウジョウバエの卵巣の発生など、通常の個体発生で重要とされる生理学的プログラムとして知られている (Matsui *et al.*, 2013)。しかしながら、遺伝子増幅は発生だけではなく、固形腫瘍でもたびたび観察される現象であり、腫瘍形成や腫瘍の悪性化にも関わっている。例えば、17q12-21 のアンプリコンに存在する *ERBB2* の過剰発現や 2p24 のアンプリコンに存在する *MYCN* の増幅はがん患者の予後との相関があることが報告されて

いる (Albertson, 2006; Savelyeva and Schwab, 2001; Yamamoto et al., 2011)。最近、我々の研究室は本研究で対象とした 17q12-21 アンプリコンに存在する 2 つの遺伝子のがんとの関連性を報告した。1 つは、*ERBB2* と協調的に働くことでトランスフォームを引き起こす *GRB7* である (Saito et al., 2012)。もう 1 つは、*ERBB2* 非依存的に EMT や浸潤を引き起こす *RARA* である (Doi et al., 2014)。*RARA* は単独で EMT を誘導するという、*ERBB2* とは独立に働く遺伝子である点で、*GRB7* とは性質が異なる。本研究では同じ 17q12-21 アンプリコンから *HNF1B* を同定した。*HNF1B* は *in vitro* で *ERBB2* 非依存的に接触阻止の消失を誘導するとともに、*ERBB2* 依存的に足場非依存的増殖能を増強し、造腫瘍性・転移能の増強を示した (図 6a, b, c, 19, 21)。足場非依存的増殖能の増強に関しては、*HNF1B* 単独によって形成されるコロニーは中が空洞のスフィア状のコロニーであり、*ERBB2* と *HNF1B* の共発現によって形成されるコロニーは中が詰まったコロニーであることから、アポトーシスシグナルが *HNF1B* 単独時には働き、共発現時にはアポトーシスの制御が破たんしている可能性が考えられる。しかし、本研究ではアポトーシスシグナルの解析について行っていないため、今後検討する必要がある。また、図 8 のように *HNF1B* と *ERBB2VE* の共発現によって *ERBB2* の発現増加が起き *ERBB2* のリン酸化が誘導されることから、*ERBB2* の活性化がコロニー形成や腫瘍形成能、転移に関わっている可能性が十分に考えられる。しかしながら、コロニー形成能が同様に促進されている野生型の *ERBB2* との共発現において *ERBB2* の活性化がみられないこと、典型的な *ERBB2* の下流シグナルである *AKT* や *ERK* の活性がみられなかったことから、これら以外のシグナルが関わっていることが考えられる。

図 19 の NMuMG-*ERBB2VE*-*HNF1B* 発現細胞では *ERBB2* の発現が図 8 のように増加していない。これら 2 つの実験で異なる点として、NMuMG-*ERBB2VE* 細胞に *HNF1B* をレトロウイルスによる感染によって導入した後の薬剤選択の有無である。薬剤選択を行った後に lysate を回収し、発現を確認した図 8 では *ERBB2* の発現が増加しており、薬剤選択をせずにウイルス感染後短時間で lysate を回収した図 19 では発現増加が確認されなかった。その理由として以下の 3 つが考えられる。1 つ目は、薬剤選択によって生き残った *HNF1B* 発現細胞の中に増殖速度に差があり、その増殖速度が *ERBB2VE* 発現量に依存している。2 つ目は、*HNF1B* がレトロウイルスベクター由来

の ERBB2VE の転写活性を増強している。3つ目は、HNF1B が活性型 ERBB2 の発現を安定化する。例えば、活性型 ERBB2 に結合し、分解に関わる遺伝子として c-Cbl が報告されているが(Klapper et al., 2000)、このような遺伝子の発現制御に HNF1B が関わり、ERBB2 の分解抑制を介して ERBB2 の発現増加や ERBB2 のリン酸化(活性化)の促進が誘導された可能性が考えられる。図 8 と図 19 において結果に違いがあることから、これらの仮説の中でも 2 つ目のレトロウイルスベクター由来の ERBB2VE の転写に HNF1B が関わっている可能性は低いと考えられる。なぜなら、この仮説は薬剤選択関係なく ERBB2VE の発現が増加することが考えられるからである。その他の 2 つの仮説については今後検討する必要がある。

GRB7 や *RARA* も *in vivo* における機能を検証する必要があるものの、一つの遺伝子増幅領域のなかに複数の遺伝子が発がんや悪性化に関わる遺伝子が存在することは、遺伝子増幅により発がんや悪性化がより短期間に進むことを意味する。がんが複数の遺伝子の変異によって多段階に進むことを考えれば、遺伝子増幅による複数の遺伝子の過剰発現は、がん化における重要で特徴的な性質であるといえる。実際に、他のアンプリコンにおいても、*PAK1* や *YAP*、*CCND1* を含む多くの driver 遺伝子やその driver 遺伝子と協調的に働く遺伝子が同定されている (Lorenzetto et al., 2014; Matsui et al., 2013; Shrestha et al., 2012)。例えば、14q13.3 アンプリコンでは、転写因子である *TTF1* と *NKX2-1*、*PAX9* が協調することで肺癌の増殖を促進することが報告されており (Kendall et al., 2007)、*CCND1* は *EMSY* や *PAK1* と共に増幅し、*CCND1* と *EMSY* は一方の増幅よりも共に増幅している方が予後が悪いとの報告がある (Brown et al., 2010)。これらの結果は、一般的にアンプリコンには複数の driver がん遺伝子や協調的な遺伝子が存在する可能性を示唆するものである。したがって、driver 遺伝子が同定されていないアンプリコンは勿論のこと、driver 遺伝子がすでに同定されているアンプリコンにおいても、アンプリコンにある個々の遺伝子を個別に解析することが、発がんに関連する遺伝子を同定する上で効率的で重要な戦略であるといえる。

4.4. *HNF1B* の転写制御によるトランスフォーム活性と EMT 誘導

本研究では、*HNF1B* が腫瘍形成と悪性化の二つの面で活性をもつことを示した。一つは NMuMG におけるフォーカス形成能であり (図 6)、もう一つは EMT や浸潤の表

現型を誘導する活性である (図 9)。EMT の異常な活性化は細胞浸潤や転移を引き起こし、腫瘍の悪性化を加速することが報告されている (Higashikawa et al., 2009; Lindsay et al., 2011)。HNF1B タンパク質の 2 つの DNA 結合ドメインをそれぞれ欠損させた変異体 del-POU (del 137-187) と del-Homeo (del 235-310) はトランスフォーミング活性と EMT 誘導能の両方を欠いていた (図 7, 9b, c)。これらの結果はトランスフォーミング活性と EMT 誘導能が HNF1B による転写制御を介していることを示している。HNF1B は腎臓や肝臓、膵臓、他の上皮組織において組織特異的に遺伝子発現を制御しており、胎児期に発現し、これら組織の発生に関わるホメオボックス遺伝子である。HNF1B の DNA 結合ドメインは POU ドメインとホメオドメインの 2 つあり、それぞれ 5'-NNCAT-3' と 5'-TAAT-3' を認識し、結合することができる (Wegner et al., 1993)。しかしながら、それぞれのドメイン単独での結合性は非常に弱く、協調した場合の数十倍以下の親和性しかない (Verrijzer et al., 1992)。これら 2 つのドメインが協調することで HNF1B のコンセンサス配列である 5'-GTTAATNATTAAC-3' に強く結合することができる (Gong et al., 2009)。この仕組みについては、これら 2 つのドメインがそれぞれ隣接した主溝でお互い DNA を挟んで向き合う形で DNA に接触し、単独での三次元構造とは違った構造を形成することから全く異なる配列を認識することができるのではないかと考えられている (Verrijzer et al., 1992; Wegner et al., 1993)。また、HNF1B の機能には転写活性と転写抑制の両方の報告があるが、複合体を形成する co-activator (PCAF や CBP) や co-repressor (HDAC) によって機能が異なることが報告されている (Barbacci et al., 2004)。本研究では、HNF1B が DNA 結合ドメイン依存的に JAK-STAT3 シグナル経路を活性化していること (図 10) と EMT や浸潤に関わる遺伝子の発現を制御していることが示され (図 14b)、さらに、HNF1B が *ZEB2* と $\Delta Np63$ 遺伝子上流の領域に結合することから直接の標的遺伝子であることが示唆された (図 16)。TP63 のアイソフォームのうち TAp63 と $\Delta N p63$ は 2 つのプロモーターによって転写制御されている。これら 2 つの転写開始点は三番染色体の 189,349,216 (TA p63) と 189,507,449 ($\Delta N p63$) であり、約 160,000bp 離れていることから全く異なる転写制御を受けていることが考えられる。したがって本研究で調べた $\Delta N p63$ の転写開始点の -2000bp から +200bp の領域は TA p63 の転写制御に関わる可能性が低いと思われる。現段階では、これらのがん関連シグナルの活性化や EMT 誘導因子の発現変動

のどれが *HNF1B* によって誘導されるトランスフォーメーションや EMT に必要かどうかを結論することはできなかった。実際、阻害剤や RNAi による STAT3 シグナルの抑制では *HNF1B* のトランスフォーミング活性や EMT 誘導を抑制することができず (図 11, 12)、 $\Delta Np63\alpha$ の強制発現によっても EMT の表現型を抑制することができなかった (図 15)。*ZEB2* や *SNAI1* など複数の EMT 誘導因子に発現の変動があり、これらも含めた redundant な遺伝子発現調節がトランスフォーメーションと EMT 誘導を起こすかもしれない。今回 ChIP アッセイにより *ZEB2* や $\Delta Np63$ の上流域に HNF1B 結合部位を見いだしたので、*ZEB2* についても抑制して EMT がおさえられるかどうかを検討したところ、*ZEB2* のノックダウンによって E-cadherin の発現が元に戻り、コラーゲン/マトリゲルへの浸潤に関しては完全には抑制することができなかったものの、浸潤能を減弱させることはできた (図 17)。これらのことから、*HNF1B* によって引き起こされる EMT や浸潤の表現型に *ZEB2* が関与していることが示された。

E-cadherin の発現は *ZEB2* や *SNAI1*、*SNAI2* などが E-cadherin プロモーター上の E-box に結合し、転写を抑制することで制御していることが報告されている (Berx and van Roy, 2009; Peinado et al., 2004) が、*ZEB2* のノックダウン実験から、今回の実験系では多くの EMT 誘導因子の中で主として *ZEB2* が E-cadherin 制御に関与していると考えられる。EMT 誘導因子は他の EMT 誘導因子による転写制御によって発現が制御されるなど複雑なネットワークを形成している (Thiery et al., 2009)。そのため、単独の EMT 誘導因子の抑制もしくは発現により、表現型が見られるかどうかを調べるだけでなく、複数の遺伝子を同時に調節する方法を試す必要がある。なお、予測したプロモーター領域は -2000bp から +200bp という範囲だったため、この領域外で結合する場合は検討できていない。今回 microarray 解析によって得た遺伝子発現プロファイルによると、*HNF1B* の下流で大きく発現変動している遺伝子は 148 個あった (表 7) が、より網羅的に標的遺伝子を同定するためには HNF1B に結合する DNA 配列を直接的に同定することのできる ChIP-seq 法による解析を検討する必要がある。

4.5. ホメオボックス遺伝子のがんにおける意義

4.5.1. ホメオボックス遺伝子と STAT3 リン酸化の関連性

HNF1B はホメオボックス遺伝子スーパーファミリーに属している。ホメオボックス

遺伝子スーパーファミリーは235遺伝子（機能を持っている遺伝子）からなっており、ANTPやHNF、TALEなど、11クラスに分けることができ、そこからさらに*Hox1*や*Cdx*、*Pax*、*Dlx*などの102種類のファミリーに分けられる（Holland et al., 2007）。がんでその発現が亢進している遺伝子や、抑制されている遺伝子、転座による融合遺伝子の存在など、いくつかのホメオボックス遺伝子はがんと関連性が報告されている（表 11）（Abate-Shen, 2002; Haria and Naora, 2013; Holland et al., 2007; Samuel and Naora, 2005; Shah and Sukumar, 2010）。例えば、*ZEB1*や*ZEB2*、*GSC*などはEMT関連因子としてがんの進行に関わることがよく知られているが、そのほかにも*LHX1* はアポトーシスや血管新生、細胞増殖の経路を制御しているがん遺伝子として知られており、*HOXB7* は EGFR 経路を活性化することで腫瘍形成に関わっているという報告がある（Dormoy et al., 2011; Jin et al., 2011; Thiery et al., 2009; Wang et al., 2014）。本研究では、*HNF1B*をトランスフォーミング遺伝子とEMT誘導因子として同定するとともに、23種類のホメオボックス遺伝子のトランスフォーミング活性を調べて、*EMX1*を含む6つのホメオボックス遺伝子がトランスフォーミング活性をもつことを示した（図 23）。興味深いことに、これらの遺伝子のうち5つの遺伝子がSTAT3の活性化を引き起こしていた。STAT3はJAK-STATシグナルのシグナル伝達因子の1つとして知られている転写因子である。IL-6などのサイトカインやEGFなどの増殖因子がそれぞれの受容体に結合すると、JAKの活性化が誘導される。活性化したJAKは受容体のリン酸化を引き起こし、そこにSTAT3がSH2ドメインを介して結合すると、JAKによってSTAT3がリン酸化される（Wendt et al., 2014）。リン酸化されたSTAT3は核に移行して下流の標的遺伝子を誘導する。標的遺伝子には*CCND1* (cyclinD1)などの細胞周期制御因子や*Bcl-2* (B-cell CLL/lymphoma 2)などの抗アポトーシスに働く因子、がんの浸潤に必要とされる*MMPs* (matrix metalloproteases)などがある（Huang, 2007）。過去の報告では、恒常的に2量体化を形成するSTAT3の活性化変異体を細胞に導入すると、腫瘍が形成されたとの報告もあり、がん遺伝子として注目されている（Bromberg et al., 1999; Huang, 2007; Zhou et al., 2014）。また、前述のように腫瘍形成だけではなく、腫瘍の浸潤に必要なである*MMPs*の発現やがん幹細胞 (circulating tumor cells , CTC)の維持に必要なとされる*SOX2* (sex determining region Y-box 2)の発現、*SNAI1*や*SNAI2*などのEMT関連因子の発現を制御しており、がんの悪性化への関わりが多く報告されている

(Bromberg et al., 1999; Chanmee et al., 2014; Huang, 2007; Wendt et al., 2014)。また、*SOCS3* (suppressor of cytokine signaling 3)はSTAT3の受容体への結合やJAK自体のキナーゼ活性の阻害、STAT3やJAKのユビキチン化、分解を制御することでSTAT3を抑制することが知られている (Wendt et al., 2014)。過去に*HNF1B*の直接の標的遺伝子としてこの*SOCS3*が同定されており、HNF1Bによってdown-regulateすることが報告されている (Ma et al., 2007)。これらのことから、今回のHNF1Bの発現によって誘導される表現型がSTAT3を介している可能性が示唆された。にもかかわらず、shRNAによるSTAT3 mRNAの抑制、JAK阻害剤によるSTAT3のリン酸化の阻害のどちらによっても、*HNF1B*のフォーカス形成能やEMT誘導能を抑制することはできなかった。さらに、図 10に示したように、*ERBB2*と*HNF1B*の共発現において、STAT3のリン酸化は確認されたものの、*HNF1B*単独発現時よりも減少していることから、STAT3が関与している可能性は低くなった。しかしながら、これまでの報告と複数のフォーカス形成能をもつホメオボックス遺伝子で高確率に活性化されている点から、ホメオボックス遺伝子とSTAT3の関連性について特に*in vivo*での造腫瘍能や転移能に関連している可能性を考え、引き続き検討する。

4.5.2. トランスフォーミング活性をもつホメオボックス遺伝子の特徴

本研究で、トランスフォーミング活性を調べた22のホメオボックス遺伝子と*HNF1B*、*EMX1*のホメオドメインの配列を比較することで、トランスフォーメーション、STAT3の活性化を引き起こすホメオボックス遺伝子に共通した特徴があるかどうかを調べた。ホメオボックス遺伝子スーパーファミリーはANTPやHNF、TALEなどの11クラスに分類される (Holland et al., 2007)。ホメオドメイン配列の類似性に基づいて系統樹を作成したところ、トランスフォーミング活性を示した遺伝子のうち、*HNF1B*以外、すべてANTPクラスであった (図 24)。今回調べたホメオボックス遺伝子がANTPクラスのものに偏っていたので (24遺伝子中16個)、この結果だけではホメオボックス遺伝子の属しているクラスやファミリーががんとの関連性に重要であるかどうかはわからない。しかしながら、同じファミリーに属するホメオボックスタンパク質は類似のDNA配列に結合しやすいと考え、共通の機構 (標的遺伝子) を介してトランスフォーメーションを起こすことが考えられる。しかしながら、*HNF1B*のようにPOUドメインと

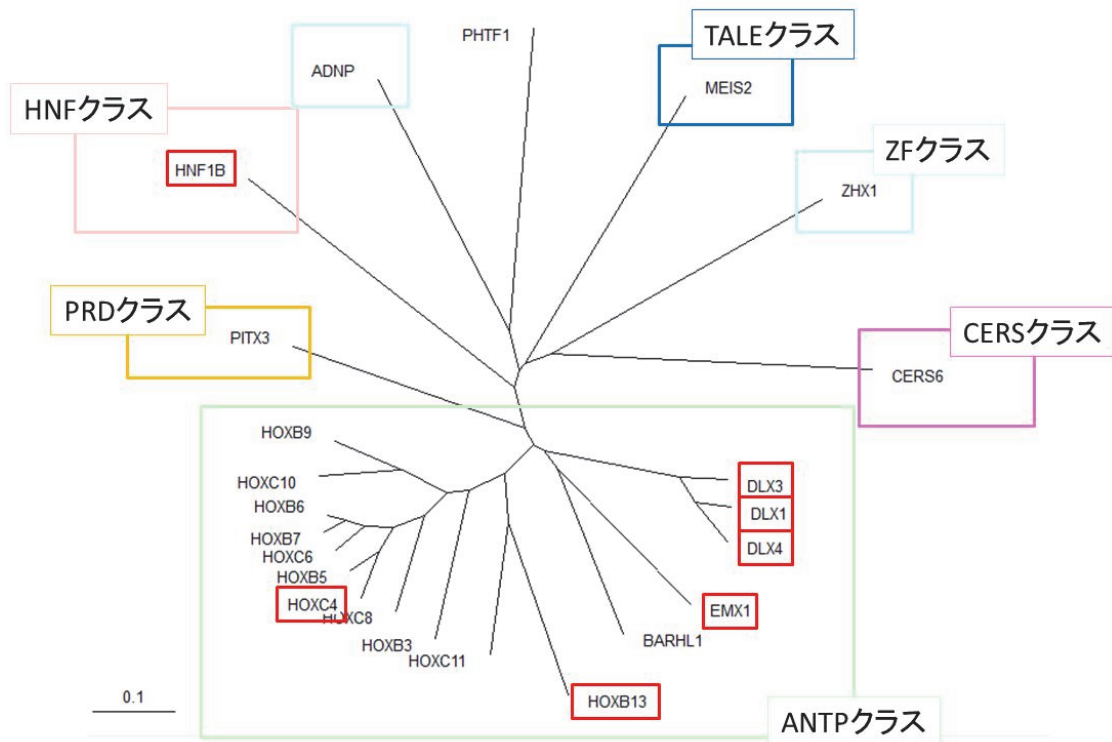


図 24. ホメオボックス遺伝子の系統樹

今回トランスフォーミング活性を調べたホメオボックス遺伝子のホメオドメインの配列の相同性を clustalw (Larkin et al., 2007)によって調べ、系統樹を作製した。

ホメオドメインが協調することでDNAに結合するファミリーや、本研究ではトランスフォーミング活性を調べることができなかったPAXのようにホメオドメイン以外にpairedドメインを保持しているファミリーなど、ファミリーごとにDNA結合ドメインとして機能するドメインが異なっているものもある(Abate-Shen, 2002)。これらのホメオボックスタンパク質も同様の標的遺伝子をもつのか、興味深い。

ところで、HOXファミリー内でも、がん促進的なものと抑制的なものが知られている。HOXファミリーのいくつかは共通のDNA配列に結合できるが、それらの中でもDNA結合への親和性が若干異なっている(Pellerin et al., 1994)。そのため、がん促進的なHOXタンパク質が発現することによって、同じ結合配列に結合するがん抑制的なHOXタンパク質を追いだして、転写の活性/抑制、結果的に、がん促進/抑制のスイッチを切り替える可能性も考えられる。今後、トランスフォーミング活性をもつホメオボックスタンパク質間でのトランスフォーミング活性や標的遺伝子の違いなどを解析していくことはホメオボックス遺伝子とがんの関連性を理解するために重要なことであると思われる。

4.5.3. ホメオボックス遺伝子の発現組織とトランスフォーミング活性について

ホメオボックス遺伝子は組織の発生に関わる遺伝子として、発生時の細胞増殖や運動能を制御するといった機能を持つことで組織形成を行っている。これまでに、発生初期に発現し、分化後に発現がなくなるホメオボックス遺伝子はがん促進的に、逆に、発生初期に発現がなく、分化後に発現してくるホメオボックス遺伝子はがん抑制的に働くといった傾向があると言われている (Abate-Shen, 2002; Haria and Naora, 2013)。実際、細胞増殖を促進的に制御することで組織を形成する遺伝子が本来働かない時期(分化した組織)に働くのであれば、ホメオボックス遺伝子が未分化状態を作り出し、がんのように細胞増殖能が異常になった表現型を引き起こす可能性が考えられる。しかしながら、造血系細胞の分化に関わることが知られているホメオボックス遺伝子HOXA9では、白血病や卵巣がんではがん促進的に働くものの、乳がんではがん抑制的に働くという全く異なる報告がされており (Haria and Naora, 2013)、発現する時期だけではがん促進的かがん抑制的かを決定することはできないと思われる。発現する組織などその遺伝子を取り巻く様々な因子(例えば、共役因子の発現の違いなど)によってがんにおける機能

が変わってくる可能性がある。これらのことから、他のまだ解析されていないホメオボックス遺伝子についても、がんの種類に応じた適切な細胞を用いて評価することが今後のがんにおける研究において重要であることが考えられる。本研究のように *in vitro* の評価に使える各臓器や組織ごとのレシピエント細胞は多くなく、また、トランスフォームしていない不死化細胞を樹立することも簡単ではないが、本研究はレシピエント細胞の充実ががん遺伝子の探索と機能評価には必要であることを示している。

4.6. がん転移における *HNF1B* の機能

本研究で行った同所性移植と尾静脈移植によって、*HNF1B* が *ERBB2* による造腫瘍能や転移能を増強することが示された (図 19, 21)。*HNF1B* 発現細胞によって形成された原発巣はコントロールよりも Ki-67 陽性細胞が増加していた (図 20a)。このことから、*HNF1B* が転移部位において *ERBB2* によってがん化した細胞の増殖を促進することによって造腫瘍能の増強に関わっていることが示唆された。*in vitro* における増殖速度に違いは見られなかったが、*in vitro* でもソフトアガーアッセイなど軟寒天中に埋め込んだアッセイでは *HNF1B* の発現によって *ERBB2* の増殖能の増強が確認された。これまでに言われているように *in vitro* における軟寒天中のコロニー形成能は造腫瘍能と相関することがここでも成り立っているといえる。

がんの転移にはリンパ行性転移 (リンパ管を通して転移する) と血行性転移 (血管を通して転移する) があり、現在これらの転移はリンパ節への転移が認められるか、骨髄への転移が認められるかによって判断されている。乳がんではどちらの転移も認められているが、特にリンパ節転移が認められた患者は予後が悪いことが報告されている (Cianfrocca and Goldstein, 2004)。しかし、本研究で対象とした *ERBB2* 陽性乳がんは予後が悪いものの、リンパ行性転移への偏りは報告されておらず、どちらの転移も起こることが考えられている (Solá et al., 2011)。本研究では、*HNF1B* の発現によってリンパ管内皮細胞や血管内皮細胞の数の増加がみられなかったことから (図 20b, c)、*HNF1B* が転移のプロセスの一つである血管新生やリンパ管新生を促進するとは考えにくく、また、転移自体も血行性である可能性は高いがどちらの転移であるかはわからない。また、尾静脈移植における肺転移巣の経時観察で、Day14 から luciferin の発光にコントロールとの差が出始めたことが確認された (図 21) ことから、*HNF1B* は

ERBB2 による転移能を、転移のプロセスの中でも後半のプロセスである血管外浸潤や遠方臓器への生着、転移巣でのコロニー形成に関わることで促進していることが示唆される。また、同所性移植だけではなく、尾静脈移植においても *HNF1B* 発現細胞は脳や骨に転移した。コントロール細胞ではこれらの部位への転移は認められないことから、*HNF1B* が単に転移の後半部分のプロセスを促進しているだけではない可能性も考えられる。がん細胞が脳へ転移するには血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) を通過しなければならない。BBB の通過に関与する因子としては、糖鎖修飾に関わる因子である *ST6GALNAC5* や *microRNA181c* が報告されている (Bos et al., 2009; Tominaga et al., 2015)。*microRNA181c* はがん細胞から分泌されるエクソソームに含まれており、内皮細胞の *PDPK1* の発現を抑制することによって細胞間接着を弱め、がん細胞が BBB を通過できるように働いている (Tominaga et al., 2015)。*microRNA* の発現については本研究では未検討であり、マイクロアレイ解析による mRNA 発現データでは、*ST6GALNAC5* の発現に変化は見られなかったため、*HNF1B* 発現による脳転移に関連する因子については今のところ明らかではない。

また、骨転移に重要な因子としては、骨損傷を引き起こすリシロキシダーゼ *LOX* が報告されている (Cox et al., 2015)。*HNF1B* 発現細胞では *LOX* がコントロール細胞と比べて 2.6 倍増加していることが確認された。この結果から、本研究において観察された *HNF1B* 発現による骨転移には *LOX* が関わる可能性が示唆された。*microRNA* の発現も含めて標的遺伝子のさらに詳細な探索・解析が必要である。

4.7. 予後因子としての *HNF1B* の意義

本研究によって、*HNF1B* が腫瘍の悪性化に関わっていることが示唆された。実際、*HNF1B* の過剰発現は化学療法に抵抗性を持つ卵巣がんの明細胞腺癌 (OCCC) や、すい臓がんでの予後との相関性が報告されている (Kim et al., 2008; Senkel et al., 2005)。そして、乳がんにおいても *HNF1B* の発現とがんの再発率に相関性があることが確認された (図 22)。これらの結果は *HNF1B* ががんの悪性化の重要な因子であることを示唆している。2008年にManiらが、EMT誘導因子がトランスフォームした細胞のがん幹細胞化を促進すると報告した (Mani et al., 2008)。しかしながら、すべてのEMT誘導因

子がコロニー形成能、がん幹細胞化を促進するわけではない (Kumazawa *et al.*, unpublished data)。がん幹細胞は自己複製能力を持っており、抗がん剤に対する耐性や転移能が高いことなどから悪性度の高いがんとの関連性があるといわれている (Chanmee *et al.*, 2014; Dey *et al.*, 2010; Mani *et al.*, 2008)。また、最近ではEMT誘導により腫瘍が抗がん剤への抵抗性を示すことが報告されており (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015)、EMTとがん幹細胞の関連性は高くなっている。CD44^{high}/CD24^{low}の画分は幹細胞様の特徴を持った細胞を含んでおり、がんにおいてはCD44^{high}/CD24^{low}の画分にはtumor initiating細胞が存在すると言われており (Chanmee *et al.*, 2014; Dey *et al.*, 2010; Mani *et al.*, 2008)。このように、CD44はがん幹細胞マーカーとしての報告が多いが、CD44のノックダウンによって腫瘍形成能 (tumor initiation)や転移能が抑制されることから、がん幹細胞化への関与を示唆する報告もある (Godar *et al.*, 2008; Hiraga *et al.*, 2013)。CD44は*HNF1B*の標的遺伝子の1つであることが報告されており (Akasaka *et al.*, 2013)、HER2陽性乳がんにおいてSTAT3の活性化ががん幹細胞化を促進し、薬剤耐性を獲得するとの報告もある (Chung *et al.*, 2014)。本研究によって、HNF1BがEMTを誘導すること、ERBB2によってがん化した細胞の造腫瘍能力や転移能力を増強していることが示されたことから、HNF1B発現によるSTAT3の活性化やCD44の発現がERBB2過剰発現乳がんにおいてがん幹細胞化を促進し、薬剤耐性を獲得した悪性度の高い腫瘍へと導いている可能性が考えられる。がん幹細胞における*HNF1B*の機能を解明することも重要な課題である。

HNF1Bは転写因子であるためDNA結合活性の阻害剤の作製が難しい点などにおいてがん治療の直接の標的にはなることは難しいが、私の解析を含めたこれまでの研究から*HNF1B*はがんの悪性化に関わっている可能性が高い。*in vivo*や薬剤耐性におけるSTAT3の関連性も含め、今後*HNF1B*の下流のシグナル、標的遺伝子を解析していくことで、新たな治療や診断につながる可能性がある。

結論

本研究では、上皮細胞株である NMuMG を用いたトランスフォーメーションアッセイを確立し、そのアッセイを用いたスクリーニングにより、17q12-21 アンプリコンに存在する 52 個の遺伝子からホメオボックス遺伝子である *HNF1B* をトランスフォーミング遺伝子として同定した。*HNF1B* に関して、次のことを明らかにした。

- ① 単独でのフォーカス、コロニー形成能を有する。
- ② *ERBB2* による足場非依存的増殖能や造腫瘍能、転移能を促進する。
- ③ *HNF1B* のトランスフォーミング活性および EMT 誘導能、浸潤能は DNA 結合活性依存的である。
- ④ *TP63* や *ETS1* などの多くの EMT 誘導因子の遺伝子発現の制御を行っている。
- ⑤ *ZEB2* と $\Delta Np63$ が *HNF1B* に直接的に制御される可能性がある。
- ⑥ *ZEB2* が *HNF1B* による EMT や浸潤の誘導に関与している。
- ⑦ 疫学的解析から *HNF1B* が乳がんの予後に関与する可能性がある。

以上のことから、図 24 のようなモデル図を提案した。

さらに、22 種類のホメオボックス遺伝子のトランスフォーミング活性を調べ、*EMX1* を含む 6 つのホメオボックス遺伝子がトランスフォーミング活性をもつことを明らかにし、発がんと悪性化におけるホメオボックス遺伝子の解析の重要性を示した。

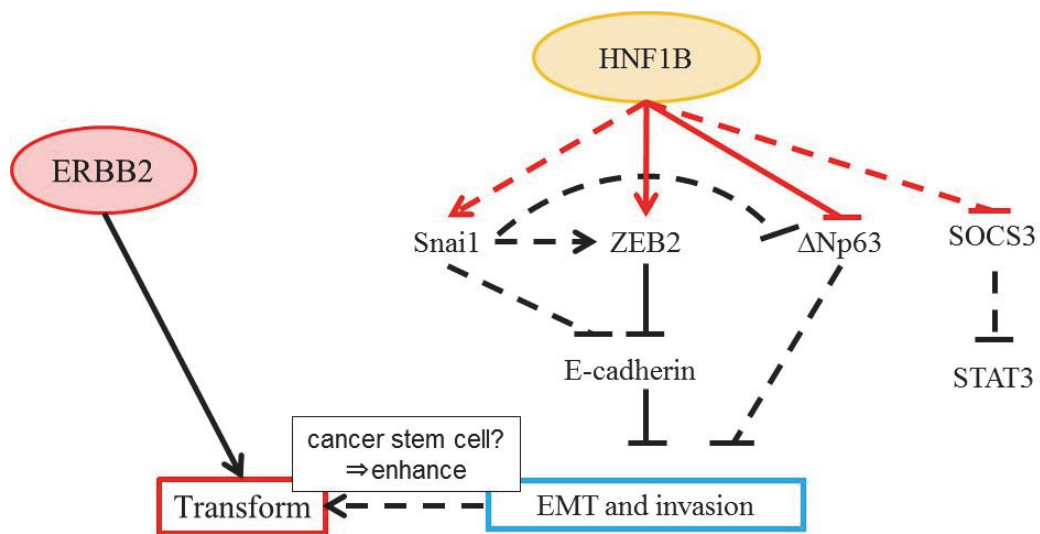


図 25. HNF1B によるトランスフォーメーションと EMT、浸潤の誘導のモデル図（本研究で明らかにした経路を実線で表している）

参考文献

- Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat. Rev. Cancer* *2*, 777–785.
- Akasaka, J., Uekuri, C., Shigetomi, H., Koike, M., and Kobayashi, H. (2013). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 β and its physiological importance in endometriosis. *Biomed. Reports* *1*, 13–17.
- Akiyama, T., Matsuda, S., Namba, Y., Saito, T., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1991). The transforming potential of the c-erbB-2 protein is regulated by its autophosphorylation at the carboxyl-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 833–842.
- Albertson, D.G. (2006). Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* *22*, 447–455.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* *215*, 403–410.
- Arcila, M.E., Chaft, J.E., Nafa, K., Roy-Chowdhuri, S., Lau, C., Zaidinski, M., Paik, P.K., Zakowski, M.F., Kris, M.G., and Ladanyi, M. (2012). Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* *18*, 4910–4918.
- Barbacci, E., Chalkiadaki, A., Masdeu, C., Haumaitre, C., Lokmane, L., Loirat, C., Cloarec, S., Talianidis, I., Bellanne-Chantelot, C., and Cereghini, S. (2004). HNF1 β /TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 3139–3149.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C., and Weinberg, R.A. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* *45*, 649–657.
- Beevers, A.J., Damianoglou, A., Oates, J., Rodger, A., and Dixon, A.M. (2010). Sequence-dependent oligomerization of the Neu transmembrane domain suggests inhibition of “conformational switching” by an oncogenic mutant. *Biochemistry* *49*, 2811–2820.
- Behrens, P., Rothe, M., Wellmann, a, Krischler, J., and Wernert, N. (2001). The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J. Pathol.* *194*, 43–50.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a003129.
- Bos, P.D., Zhang, X.H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, X., Minn, A.J.,

- Vijver, M. Van De, Gerald, W.L., Foekens, J.A., et al. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* *459*, 1005–1009.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* *98*, 295–303.
- Brown, L.A., Johnson, K., Leung, S., Bismar, T.A., Benítez, J., Foulkes, W.D., and Huntsman, D.G. (2010). Co-amplification of CCND1 and EMSY is associated with an adverse outcome in ER-positive tamoxifen-treated breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* *121*, 347–354.
- Cadiñanos, J., and Bradley, A. (2007). Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system. *Nucleic Acids Res.* *35*, e87.
- Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* *331*, 1559–1564.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. *6*, 1670–1690.
- Cho, H., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* *421*, 756–760.
- Chung, S.S., Giehl, N., Wu, Y., and Vadgama, J. V (2014). STAT3 activation in HER2-overexpressing breast cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell traits. *Int. J. Oncol.* *44*, 403–411.
- Cianfrocca, M., and Goldstein, L.J. (2004). Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* *9*, 606–616.
- Cillo, C., Faiella, A., Cantile, M., and Boncinelli, E. (1999). Homeobox genes and cancer. *Exp. Cell Res.* *248*, 1–9.
- Cox, T.R., Rumney, R.M.H., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., et al. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* *522*, 106–110.
- Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* *30*, 256–268.
- Dey, M., Ulasov, I. V, and Lesniak, M.S. (2010). Virotherapy against malignant

glioma stem cells. *Cancer Lett.* *289*, 1–10.

Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., Aaronson, S.A., Paolo, P., Fiore, D., and Segatto, O. (1987). *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* *237*, 178–182.

Dohn, M., Zhang, S., and Chen, X. (2001). p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* *20*, 3193–3205.

Doi, A., Ishikawa, K., Shibata, N., Ito, E., Fujimoto, J., Yamamoto, M., Shiga, H., Mochizuki, H., Kawamura, Y., Goshima, N., et al. (2014). Enhanced expression of retinoic acid receptor alpha (RARA) induces epithelial-to-mesenchymal transition and disruption of mammary acinar structures. *Mol. Oncol.* *9*, 355–364.

Dormoy, V., Béraud, C., Lindner, V., Thomas, L., Coquard, C., Barthelmebs, M., Jacquemin, D., Lang, H., and Massfelder, T. (2011). LIM-class homeobox gene *Lim1*, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Oncogene* *30*, 1753–1763.

Egeblad, M., Rasch, M.G., and Weaver, V.M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 697–706.

Espina, V., and Liotta, L.A. (2011). What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? *Nat. Rev. Cancer* *11*, 68–75.

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.

Fomenkov, A., Huang, Y.-P., Topaloglu, O., Brechman, A., Osada, M., Fomenkova, T., Yuriditsky, E., Trink, B., Sidransky, D., and Ratovitski, E. (2003). P63 alpha mutations lead to aberrant splicing of keratinocyte growth factor receptor in the Hay-Wells syndrome. *J. Biol. Chem.* *278*, 23906–23914.

Fujimoto, J., Shiota, M., Iwahara, T., Seki, N., Satoh, H., Mori, S., and Yamamoto, T. (1996). Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4181–4186.

Godar, S., Ince, T. a, Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F., et al. (2008). Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* *134*, 62–73.

- Gong, Y., Ma, Z., Patel, V., Fischer, E., Hiesberger, T., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2009). HNF-1beta regulates transcription of the PKD modifier gene Kif12. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 41–47.
- Haria, D., and Naora, H. (2013). Homeobox Gene Deregulation: Impact on the Hallmarks of Cancer. *Cancer Hallm.* *1*, 67–76.
- Hatzis, C., Pusztai, L., Valero, V., Booser, D.J., Esserman, L., Lluch, A., Vidaurre, T., Holmes, F., Souchon, E., Wang, H., et al. (2011). A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA* *305*, 1873–1881.
- Hibi, K., Fujitake, S., Takase, T., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S., Shirane, M., and Nakao, A. (2003). Identification of S100A2 as a target of the DeltaNp63 oncogenic pathway. *Clin. Cancer Res.* *9*, 4282–4285.
- Higashikawa, K., Yoneda, S., Tobiume, K., Saitoh, M., Taki, M., Mitani, Y., Shigeishi, H., Ono, S., and Kamata, N. (2009). DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* *124*, 2837–2844.
- Hiraga, T., Ito, S., and Nakamura, H. (2013). Cancer Stem-like Cell Marker CD44 Promotes Bone Metastases by Enhancing Tumorigenicity, Cell Motility, and Hyaluronan Production. *Cancer Res.* *73*, 4112–4122.
- Holland, P.W.H., Booth, H.A.F., and Bruford, E. a (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol.* *5*, 47.
- Huang, S. (2007). Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1362–1366.
- Hynes, N.E., Jaggi, R., Kozma, S.C., Ball, R., Muellener, D., Wetherall, N.T., Davis, B.W., and Groner, B. (1985). New acceptor cell for transfected genomic DNA: oncogene transfer into a mouse mammary epithelial cell line. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 268–272.
- Iqbal, N., and Iqbal, N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol. Biol. Int.* *2014*, 852748.
- Ishikawa, K., Akiyama, T., Ito, K., Semba, K., and Inoue, J. (2009). Independent stabilizations of polysomal Drg1/Dfrp1 complex and non-polysomal Drg2/Dfrp2 complex in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *390*, 552–556.

- Ito, E., Honma, R., Yanagisawa, Y., Imai, J., Azuma, S., Oyama, T., Ohwada, S., Akiyama, T., Nomura, N., Inoue, J., et al. (2007). Novel clusters of highly expressed genes accompany genomic amplification in breast cancers. *FEBS Lett.* *581*, 3909–3914.
- Jang, M., Kim, E., Choi, Y., Lee, H., Kim, Y., Kim, J., Kang, E., Kim, S.-W., Kim, I., and Park, S. (2012). FGFR1 is amplified during the progression of in situ to invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res.* *14*, R115.
- Jin, K., Kong, X., Shah, T., Penet, M.-F., Wildes, F., Sgroi, D.C., Ma, X.-J., Huang, Y., Kallioniemi, A., Landberg, G., et al. (2011). The HOXB7 protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 2736–2741.
- Kendall, J., Liu, Q., Bakleh, A., Krasnitz, A., Nguyen, K.C.Q., Lakshmi, B., Gerald, W.L., Powers, S., and Mu, D. (2007). Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16663–16668.
- Kim, L., Liao, J., Zhang, M., Talamonti, M., Bentrem, D., Rao, S., and Yang, G.-Y. (2008). Clear cell carcinoma of the pancreas: histopathologic features and a unique biomarker: hepatocyte nuclear factor-1beta. *Mod. Pathol.* *21*, 1075–1083.
- Kim, S.Y., Jung, S.-H., Kim, M.S., Baek, I.-P., Lee, S.H., Kim, T.-M., Chung, Y.-J., and Lee, S.H. (2015). Genomic differences between pure ductal carcinoma in situ and synchronous ductal carcinoma in situ with invasive breast cancer. *Oncotarget* *6*, 7597–7607.
- Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003). Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* *31*, 1007–1014.
- Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., and Yarden, Y. (2000). Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* *60*, 3384–3388.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* *23*, 2947–2948.
- Lindsay, J., McDade, S.S., Pickard, A., McCloskey, K.D., and McCance, D.J. (2011). Role of DeltaNp63gamma in epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* *286*, 3915–3924.

- Little, N.A., and Jochemsen, A.G. (2002). p63. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *34*, 6–9.
- Lorenzetto, E., Brenca, M., Boeri, M., Verri, C., Piccinin, E., Gasparini, P., Facchinetti, F., Rossi, S., Salvatore, G., Massimino, M., et al. (2014). YAP1 acts as oncogenic target of 11q22 amplification in multiple cancer subtypes. *Oncotarget* *5*, 2608–2621.
- Ma, Z., Gong, Y., Patel, V., Karner, C.M., Fischer, E., Hiesberger, T., Carroll, T.J., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2007). Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20386–20391.
- Mani, S. a, Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Martin, G.S. (2004). The road to Src. *Oncogene* *23*, 7910–7917.
- Matsui, A., Ihara, T., Suda, H., Mikami, H., and Semba, K. (2013). Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *Biomol. Concepts* *4*, 567–582.
- Moretti, F., Marinari, B., Lo Iacono, N., Botti, E., Giunta, A., Spallone, G., Garaffo, G., Vernersson-Lindahl, E., Merlo, G., Mills, A.A., et al. (2010). A regulatory feedback loop involving p63 and IRF6 links the pathogenesis of 2 genetically different human ectodermal dysplasias. *J. Clin. Invest.* *120*, 1570–1577.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* *7*, 1063–1066.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R., and Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* *54*, 105–115.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* *20*, 87–90.
- Okuducu, A.F., Zils, U., Michaelis, S.A.M., Michaelides, S., and von Deimling, A. (2006). Ets-1 is up-regulated together with its target gene products matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in atypical and anaplastic meningiomas. *Histopathology* *48*, 836–845.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 365–375.

- Pellerin, I., Schnabel, C., Catron, K.M., and Abate, C. (1994). Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on the hox cluster. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 4532–4545.
- Quail, D.F., and Joyce, J. a (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* *19*, 1423–1437.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* *300*, 149–152.
- Romano, R.-A., Birkaya, B., and Sinha, S. (2007). A functional enhancer of keratin14 is a direct transcriptional target of deltaNp63. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 1175–1186.
- Saito, M., Kato, Y., Ito, E., Fujimoto, J., Ishikawa, K., Doi, A., Kumazawa, K., Matsui, A., Takebe, S., Ishida, T., et al. (2012). Expression screening of 17q12-21 amplicon reveals GRB7 as an ERBB2-dependent oncogene. *FEBS Lett.* *586*, 1708–1714.
- Samuel, S., and Naora, H. (2005). Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur. J. Cancer* *41*, 2428–2437.
- Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M.R., and Cooper, C.S. (2010). A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 59–64.
- Savelyeva, L., and Schwab, M. (2001). Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Lett.* *167*, 115–123.
- Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, K.K., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2013). Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell* *24*, 130–137.
- Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 6497–6501.
- Senkel, S., Lucas, B., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* *1731*, 179–190.
- Seton-Rogers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2004). Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming

growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1257–1262.

Shah, N., and Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 361–371.

Shrestha, Y., Schafer, E.J., Boehm, J.S., Thomas, S.R., He, F., Du, J., Wang, S., Barretina, J., Weir, B.A., Zhao, J.J., et al. (2012). PAK1 is a breast cancer oncogene that coordinately activates MAPK and MET signaling. *Oncogene* *31*, 3397–3408.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* *244*, 707–712.

Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007).

Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* *448*, 561–566.

Solá, M., Margelí, M., Castellá, E., Julian, J.F., Rull, M., Gubern, J.M., Mariscal, A., Barnadas, A., and Fraile, M. (2011). Prognostic value of hematogenous dissemination and biological profile of the tumor in early breast cancer patients: a prospective observational study. *BMC Cancer* *11*, 252.

Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., and Chang, E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* *300*, 143–149.

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 603–615.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871–890.

Tominaga, N., Kosaka, N., Ono, M., Katsuda, T., Yoshioka, Y., Tamura, K., Lötvall, J., Nakagama, H., and Ochiya, T. (2015). Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat. Commun.* *6*, 6716.

Tran, M.N., Choi, W., Wszolek, M.F., Navai, N., Lee, I.-L.C., Nitti, G., Wen, S., Flores, E.R., Siefker-Radtke, A., Czerniak, B., et al. (2013). The p63 protein isoform Δ Np63 α inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *J. Biol. Chem.* *288*, 3275–3288.

- Valastyan, S., and Weinberg, R. a (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* *147*, 275–292.
- Verrijzer, C.P., Alkema, M.J., van Weperen, W.W., Van Leeuwen, H.C., Strating, M.J., and van der Vliet, P.C. (1992). The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *EMBO J.* *11*, 4993–5003.
- Wang, X., He, C., and Hu, X. (2014). LIM homeobox transcription factors, a novel subfamily which plays an important role in cancer (review). *Oncol. Rep.* *31*, 1975–1985.
- Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S., and Fujinaga, K. (1998). The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int. J. Cancer* *77*, 128–137.
- Wegner, M., Drolet, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1993). POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* *5*, 488–498.
- Weinberg, R.A. (2014). *The Biology of Cancer*.
- Wendt, M.K., Balanis, N., Carlin, C.R., and Schiemann, W.P. (2014). STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *Jak-Stat* *3*, e28975.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., and Searson, P.C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 512–522.
- Wu, G., Osada, M., Guo, Z., Fomenkov, A., Begum, S., Zhao, M., Upadhyay, S., Xing, M., Wu, F., Moon, C., et al. (2005). DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res.* *65*, 758–766.
- Yamamoto, T., Nishida, T., Miyajima, N., Kawai, S., Ooi, T., and Toyoshima, K. (1983). The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* *35*, 71–78.
- Yamamoto, T., Saito, M., Kumazawa, K., Doi, A., Matsui, A., Takebe, S., Amari, T., Oyama, M., and Semba, K. (2011). ErbB2 / HER2 : Its Contribution to Basic Cancer Biology and the Development of Molecular Targeted Therapy. *Breast Cancer – Carcinog. Cell Growth Signal. Pathways* 139–170.
- Yusa, K., Zhou, L., Li, M.A., Bradley, A., and Craig, N.L. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 1531–1536.

Zhang, Y., Martens, J.W.M., Yu, J.X., Jiang, J., Sieuwerts, A.M., Smid, M., Klijn, J.G.M., Wang, Y., and Foekens, J. a (2009). Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer. *Cancer Res.* *69*, 3795–3801.

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.

Zhou, X., Ren, Y., Liu, A., Han, L., Zhang, K., Li, S., Li, P., Li, P., Kang, C., Wang, X., et al. (2014). STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* *31*, 2173–2180.

謝辞

本研究に関わった全ての方、とくに仙波研究室の皆様には非常に感謝しております。本研究の上皮細胞を用いたスクリーニングという大変興味深いテーマや、多くの学会への参加や総説を書くなどといった貴重な経験を積む機会を与えてくださり、いつも温かい目で見守りご指導くださった仙波憲太郎先生に大変感謝いたします。また、実験の相談やデータの解釈など多くのことに対して適切なアドバイスをくださった藤元次郎先生に感謝いたします。学部4年時から今まで実験の基礎を教えてくださいました石川公輔先生、ウイルス作製方法について教えてくださいました石田尚臣先生、細胞培養などを教えてくださいました玉村さくらさん、データについて様々なアドバイスをくださった山本瑞生さん、研究室の母親的立場で私たちの実験を支えてくださった仙波久美子さんに感謝いたします。学部4年からともに研究に取り組み、卒業した今でも私を励ましてくれる熊澤健太郎君、斉藤諒君、武部汐里さん、土井綾乃さんには実験の技術的な面も含め色々とお世話になり、ありがとうございます。そして、卒業し、社会人として活躍している後輩のみなさん、現在研究室で共に研究を行っている後輩の学生さんにも多くの場面で支えていただき、感謝しております。加えて、本研究をまとめた論文に関わった共同研究者の方々として伊藤恵美先生、また発現ベクターリソースについては五島直樹先生、そして福島プロジェクト代表者として渡辺慎哉先生にもお世話になりました。当論文の査読をしてくださり、常日頃から叱咤激励をしてくださる合田亘人先生、並びに大木理恵子先生に感謝いたします。最後に長い間、どんな時でも支えてくれた家族の皆に感謝の言葉を述べさせていただきます、ありがとうございました。

仙波研究室 松井貴香

表 1. HNF1B 変異体作製プライマーとΔNp63αのクローニング用プライマー

配列	
HNF1B-delPOU Forward	CAGAGTTCTGGAAATATGACAGACAAAAGCA
HNF1B-delPOU Reverse	CTGGGGGATGTTGTGTTGCTG
HNF1B-delHomeo Forward	CAAAAGCTGGCCATGGACGC
HNF1B-delHomeo Reverse	GTTGCGGCGCATCTTCTTGTT
ΔNp63α Forward	AGGCTGCCACCATGTTGTACCTGGAAAACAATGCCCAGAC
ΔNp63α Reverse	AGCTGGGTTCGGTGGTTCACTCCCCCTCCTCTTTGATGCGC

表 2. shSTAT3 のターゲット配列

ターゲット配列		
shSTAT3#1	CCTAgCTTTGTGGTTtCAGgT GTGTGCTGTCC ATCTGGAACCACAAAGTTAGG	3'UTR
shSTAT3#2	CCTGgGTTGAATTgTCAGtTT GTGTGCTGTCC AAGCTGATAATTCAACTCAGG	CDS
shSTAT3#3	CGACTTTGgTTTCAAtTACgA GTGTGCTGTCC TTGTAGTTGAAATCAAAGTCG	CDS
shSTAT3#4	GGCCATCCTAAGCACAAA tcaagaga TTTGTGCTTAGGATGGCCC	3'UTR
shSTAT3#5	CTTCAGACCCGCCAACAAA tcaagaga TTTGTTGGGCGGGTCTGAAG	CDS

表 3. 抗体の使用条件

抗体名	メーカー	型番	ブロッキングバッファー	希釈率
anti-alpha-tubulin DM1A	Sigma	T9026	5%脱脂粉乳/TBS	1:20000
	BD			
anti-HNF-1 beta (BD)	Transduction Laboratories	612504	5%脱脂粉乳/TBS	1:2000
anti-HNF-1 beta (自作)			5%脱脂粉乳/TBS	1:2000
	BD			
anti-E-cadherin	Transduction Laboratories	610182	5%脱脂粉乳/TBS	1:4000
	BD			
anti-N-cadherin	Transduction Laboratories	610921	5%脱脂粉乳/TBS	1:2000
anti-p63[4A4]	Santa Cruz	sc-8431	5%脱脂粉乳/TBS	1:2000
anti-Stat3	Cell signaling Technology	9139	5%脱脂粉乳/TBS	1:2000
anti-phospho Stat3 Tyr705	Cell signaling Technology	9145	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-ERBB2	Cell signaling Technology	2165	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho ERBB2 Tyr877	Cell signaling Technology	2241	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho ERBB2 Tyr1221/1222	Cell signaling Technology	2243	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho ERBB2 Tyr1248	Cell signaling Technology	2247	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho FAK Tyr397	Cell signaling Technology	3283	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho Akt Thr308	Cell signaling Technology	2965	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho p38 Thr180/Tyr182	Cell signaling Technology	9211	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000
anti-phospho ERK Thr202/Tyr204	Cell signaling Technology	4370	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:1000

抗体名	メーカー	型番	ブロッキングバッファー	希釈率
anti- DYKDDDDK tag	和光純薬工業	044-309 51	5%脱脂粉乳/TBS	1:2000
anti-phospho Stat1 Ser727	Cell signaling Technology	9177	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Stat2 Tyr690	Cell signaling Technology	4441	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Stat3 Ser727	Cell signaling Technology	9134	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Stat6 Tyr641	Cell signaling Technology	9361	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Jak1 Tyr1022/1023	Cell signaling Technology	3331	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Jak2 Tyr1007/1008	Cell signaling Technology	3771	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho TyK2 Tyr1054/1055	Cell signaling Technology	9321	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Akt Ser473	Cell signaling Technology	4060	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho p38 MAPK Thr180/Tyr182	Cell signaling Technology	9215	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho FAK Tyr576/577	Cell signaling Technology	3281	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Src Family Tyr416	Cell signaling Technology	6943	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Smad1/5/8 Ser463/465, Ser426/428, Ser463/465	Cell signaling Technology	9511	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Smad2 Ser465/467	Cell signaling Technology	3101	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Smad3 Ser423/425	Cell signaling Technology	9520	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho B-Raf Ser445	Cell signaling Technology	2696	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000

抗体名	メーカー	型番	ブロッキングバッファー	希釈率
anti-phospho c-Raf Ser259	Cell signaling Technology	9421	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho c-Raf Ser338	Cell signaling Technology	9427	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Rb Ser780	Cell signaling Technology	3590	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho SAPK/JNK Thr183/Tyr185	Cell signaling Technology	9255	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho mTOR Ser2448	Cell signaling Technology	5536	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho p70 S6 kinase Thr389	Cell signaling Technology	9234	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho Shc Tyr239/240	Cell signaling Technology	2434	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho PTEN Ser380	Cell signaling Technology	9551	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho GSK3a/b Ser21/9	Cell signaling Technology	9331	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho CREB Ser133	Cell signaling Technology	9198	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-phospho c-Jun Ser73	Cell signaling Technology	3270	5%ウシ血清アルブミン /0.1% Triton X-100/TBS	1:2000
anti-rabbit IgG もしくは anti-mouse IgG	GE Healthcare	NA934, NA931		1:4000
anti-Ki67	Thermo Fisher	18-0191 Z	1% ヤギ血清/0.1% Triton X-100/PBS	1:100
anti-LYVE	Angio Bio	11-034	1% ヤギ血清/0.1% Triton X-100/PBS	1:100
anti-CD31	BD Pharmingen	550274	1% ヤギ血清/0.1% Triton X-100/PBS	1:100
Alexa Flour 568 goat anti-Rat IgG もしくは mouse IgG、Rabbit IgG	Thermo Fisher	A-11077, A-11004, A-11011		1:500

表 4. qR-PCR 用プライマー

標的遺伝子	配列	Primer position
TP63 ΔN (exons 3' -4, no 1-3) Forward	GAAAACAATGCCCAGACTCAA	3',4
TP63 ΔN (exons 3' -4, no 1-3) Reverse	TGCGCGTGGTCTGTGTT	3',4
TP63 α (exons 10-14, no 15) Forward	TCAGTTTCTTAGCGAGGTTG	12-13,14
TP63 α (exons 10-14, no 15) Reverse	ATTTTCAGACTTGCCAGATC	12-13,14
TP63 β (exons 10-12, 14,no 13 or 15) Forward	AGCATTGTCAGGATCTGG	12,14
TP63 β (exons 10-12, 14,no 13 or 15) Reverse	GAGATGAGAAGGGGAGGA	12,14
ETS1 Forward	GTTAATGGAGTCAACCCAGC	
ETS1 Reverse	GGGTGACGACTTCTTGTTTG	
TBP Forward	CACGAACCACGGCACTGATT	
TBP Reverse	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC	

表 5. ChIP qPCR 用プライマー

プロモーター領域	配列
ZEB1 site1 Forward	GCATTGAGGATGAATGCAGA
ZEB1 site1 Reverse	TTTTCTTGGGCATTTTGAGAA
ZEB1 site2 Forward	CCAATACTCCGGTCACGTTT
ZEB1 site2 Reverse	CTCCACCTCCTTCGAATA
ZEB2 site1 Forward	GTGCCTGACCCATGTTGAA
ZEB2 site1 Reverse	CCCACCCATCACAGATAAA
ZEB2 site2 Forward	CTGTGCTCAGCATCCTCAA
ZEB2 site2 Reverse	CACTTCCAGGGGAATTTTT
Δ Np63 site2 Forward	TTCGTACCAAGGCCAGATTC
Δ Np63 site2 Reverse	GCACGTGATGCATCTATGTAAA
Δ Np63 site3 Forward	TGGATTTGCGTACTCTCTCCT
Δ Np63 site3 Reverse	CCACGATTTACAGAAGGCATTT
Δ Np63 site4 Forward	TCCATTGGAGTGGAGGAGTC
Δ Np63 site4 Reverse	CCCCGAGACCCTTACAATATG
FOXC2 site1 Forward	GAGCCTGGAAACTCCCTGTT
FOXC2 site1 Reverse	CCCAGGTGTAATGGATTCAAA
FOXC2 site2 Forward	GCGTTTGCTTTGAATCCATTA
FOXC2 site2 Reverse	TCCCAAAGACCTTGTAAGTAGCA
ETS1 site2 Forward	TTTCTGCCTAAAACCTTTTCAGTCCAT
ETS1 site2 Reverse	AAACAATTAAATGGGAATATAGAAAAGA
ACTB Forward	TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG
ACTB Reverse	CGTAGATGGGCACAGTGTGGGTG

表 6. アンプリコン 17q12-21 の遺伝子 52 個とその出現頻度

Symbol	出現頻度 (フォーカス)	出現頻度 (コロニー)	出現頻度 (計)
TCAP	14	6	20
THRA	10	1	11
PGAP3	9	12	21
DUSP14	8	5	13
RARA	8	1	9
PCGF2	7	7	14
HNF1B	7	6	13
CACNB1	7	1	8
GRB7	7	0	7
TNS4	6	2	8
STARD3	6	1	7
CSF3	5	4	9
KRT24	4	2	6
PLXDC1	3	4	7
RAPGEFL1	3	4	7
TADA2A	3	2	5
C17orf78	3	1	4
RPL23	3	1	4
MED24	3	1	4
ORMDL3	2	3	5
C17orf37	2	2	4
DDX52	2	0	2
PSMB3	2	0	2
PNMT	2	0	2
PSMD3	2	0	2
KRT25	2	0	2
RPL19	1	2	3
PPP1R1B	1	1	2
MSL1	1	1	2
CWC25	1	0	1
ERBB2	1	0	1
LOC100131821	1	0	1

Symbol	出現頻度 (フォーカス)	出現頻度 (コロニー)	出現頻度 (計)
SMARCE1	1	0	1
NR1D1	0	4	4
IKZF3	0	2	2
IGFBP4	0	1	1
TMEM99	0	1	1
SYNRG	0	0	0
MRPL45	0	0	0
SOCS7	0	0	0
SRCIN1	0	0	0
MLLT6	0	0	0
PIP4K2B	0	0	0
LASP1	0	0	0
FBXL20	0	0	0
MED1	0	0	0
GSDMB	0	0	0
GSDMA	0	0	0
WIPF2	0	0	0
CDC6	0	0	0
CCR7	0	0	0
KRT28	0	0	0
シーケンス数	137	78	215
フォーカス、コロニー数	29	19	48

表 7. HNF1B 発現細胞において 4 倍以上発現変動した遺伝子 (up-regulate)

Name	Genbank ID	control	HNF1B	HNF1B-control
FGB	NM_005141	-1.5479	5.6369	7.1848
HNF1B	NM_000458	-0.8599	6.2707	7.1306
SERPINE2	NM_006216	0.0266	6.4481	6.4215
DEFB103B	NM_018661	-0.0097	5.9824	5.9921
AKR1C1	NM_001353	-0.996	4.0174	5.0134
SPP1	NM_000582	-4.1873	0.7677	4.955
AKR1C3	NM_003739	-1.376	3.3607	4.7367
UGT1H	U42604	-1.5794	2.5717	4.1511
ADAMTS1	NM_006988	-1.412	2.6887	4.1007
ASRGL1	NM_025080	-1.6163	2.4585	4.0748
PALMD	NM_017734	-0.4869	3.5874	4.0743
RGS2	NM_002923	0.1052	4.0889	3.9837
CYR61	NM_001554	-2.7898	1.1259	3.9157
SLC17A1	NM_005074	0.0518	3.7765	3.7247
TNFAIP6	NM_007115	0.3082	3.8937	3.5855
MAP1B	AK055112	-3.8877	-0.3544	3.5333
BATF3	NM_018664	-1.2083	2.0305	3.2388
C12orf75	NM_207376	-1.0934	2.1358	3.2292
KDEL3	NM_006855	-1.8489	1.3592	3.2081
CSGALNACT1	NM_018371	0.1136	3.2477	3.1341
MITF	NM_000248	0.0809	3.1854	3.1045
PDZK1	NM_002614	-1.0837	1.953	3.0367
HPGD	NM_000860	-0.8963	2.1084	3.0047
CXCL2	NM_002089	1.8452	4.8013	2.9561
FNIP2	AK057981	-0.1753	2.7645	2.9398
GLDC	NM_000170	-1.0676	1.8462	2.9138
THBS1	NM_003246	0.065	2.8589	2.7939
HLA-DQB1	NM_002123	-1.9048	0.8442	2.749
MGLL	NM_007283	-0.4511	2.2703	2.7214
PDZK1IP1	NM_005764	2.4783	5.1944	2.7161
NNMT	NM_006169	2.2181	4.91	2.6919
UCA1	AK024303	-3.3642	-0.6828	2.6814

Name	Genbank ID	control	HNF1B	HNF1B-control
UBASH3B	NM_032873	-0.7534	1.8397	2.5931
HNF4G	NM_004133	0.0708	2.6151	2.5443
BAMBI	NM_012342	-0.1229	2.3867	2.5096
KCNJ15	NM_002243	0.2784	2.7741	2.4957
TM4SF1	NM_014220	-1.5302	0.9526	2.4828
SDC2	NM_002998	-2.9689	-0.5072	2.4617
DLC1	NM_006094	-1.9394	0.5153	2.4547
RBPMS	NM_006867	-0.5193	1.8877	2.407
ARL4C	NM_005737	-2.4448	-0.0414	2.4034
RALGPS2	NM_152663	-0.0708	2.3154	2.3862
HS3ST1	NM_005114	-0.1179	2.2631	2.381
HLX	NM_021958_(2)	-2.388	-0.0147	2.3733
PLA2G16	NM_007069	-2.0361	0.2889	2.325
DCBLD2	NM_080927	0.136	2.4477	2.3117
TGFBR1	AK002171	-1.113	1.1872	2.3002
HABP4	NM_014282	-2.0612	0.2231	2.2843
ANGPTL4	NM_016109	2.8488	5.1168	2.268
GJB2	NM_004004	3.4619	5.723	2.2611
S1PR3	NM_005226	-0.584	1.6751	2.2591
UGDH	NM_003359	-1.8271	0.424	2.2511
FGL1	NM_004467	-1.8057	0.437	2.2427
CNKSR3	NM_173515	-0.96	1.2817	2.2417
COL4A1	NM_001845	-0.2603	1.9812	2.2415
SELM	NM_080430	-1.1873	1.0513	2.2386
AFP	NM_001134	-5.8877	-3.6874	2.2003
FN1	NM_002026	-3.7179	-1.5197	2.1982
PAM	NM_000919	-1.0267	1.1666	2.1933
NEO1	NM_002499	-1.1633	1.0223	2.1856
CCBE1	AK055243	2.7315	4.9171	2.1856
DDX10	NM_004398	-1.0392	1.1431	2.1823
CD163L1	NM_174941	-1.0267	1.1418	2.1685
ASB3	NM_016115	-0.8298	1.3218	2.1516
TPM1	NM_000366	-0.6759	1.4625	2.1384

Name	Genbank ID	control	HNF1B	HNF1B-control
BICC1	XM_166699	0.0221	2.1598	2.1377
FXVD2	NM_001680	-1.2331	0.8951	2.1282
LNPEP	NM_005575	-0.6518	1.4651	2.1169
FST	NM_006350_(2)	-1.0517	1.0527	2.1044
GABARAPL1	NM_031412	-2.2879	-0.2044	2.0835
PCDH7	NM_002589	-2.0676	0.0028	2.0704
DAPK1	NM_004938	-2.3721	-0.3141	2.058
IL6	NM_000600	0.0533	2.1037	2.0504
NFKBIZ	NM_031419	-0.4742	1.5663	2.0405
COL4A2	NM_001846	-0.0236	2.0115	2.0351
FGFR1	NM_000604	-0.3428	1.6846	2.0274
SYDE1	NM_033025	-0.2897	1.7318	2.0215
NPBWR1	NM_005285	0.7407	2.7563	2.0156
GREB1L	XM_064620	-0.4243	1.5892	2.0135
FSTL1	NM_007085	-2.2879	-0.2819	2.006

表 7. HNF1B 発現細胞において 4 倍以上発現変動した遺伝子 (down-regulate)

Name	Genbank ID	control	HNF1B	HNF1B-control
MED24	NM_014815	3.0049	0.9735	-2.0314
DUSP6	NM_001946	0.4862	-1.5663	-2.0525
ABCG1	NM_004915	0.623	-1.4425	-2.0655
PERP	NM_022121	3.6043	1.5356	-2.0687
IFI16	NM_005531	1.8758	-0.2061	-2.0819
C3	NM_000064	2.1463	0.0569	-2.0894
ASNS	NM_001673	1.0722	-1.0206	-2.0928
MAFB	NM_005461	1.9368	-0.1746	-2.1114
GLUL	NM_002065	1.115	-1.0001	-2.1151
SCNN1G	NM_001039	2.9908	0.8731	-2.1177
SERPINA3	NM_001085	-1.7689	-3.8881	-2.1192
IL20RB	NM_144717	3.7597	1.6311	-2.1286
PTAFR	NM_000952	1.5515	-0.5793	-2.1308
ESRP1	BC019932_(2)	2.9563	0.8221	-2.1342

Name	Genbank ID	control	HNF1B	HNF1B-control
SERPINB5	NM_002639	3.392	1.2539	-2.1381
COL17A1	NM_000494	4.7747	2.6283	-2.1464
CDH1	NM_004360	1.5174	-0.6369	-2.1543
RAET1E	NM_139165	3.4475	1.2811	-2.1664
SLPI	NM_003064	3.663	1.4918	-2.1712
PI3	NM_002638	4.1489	1.9739	-2.175
NUPR1	NM_012385	2.0389	-0.1421	-2.181
C9orf64	NM_032307	-0.6662	-2.8562	-2.19
CHAC1	NM_024111	1.3217	-0.9154	-2.2371
TXNIP	NM_006472	0.5205	-1.7303	-2.2508
CDK18	XM_053746	0.8837	-1.3844	-2.2681
CCNA1	NM_003914	3.1685	0.8982	-2.2703
SMOC1	NM_022137	0.1206	-2.1598	-2.2804
SLC6A9	NM_006934	1.0686	-1.2538	-2.3224
SCNN1B	NM_000336	3.845	1.5204	-2.3246
IRF6	NM_006147	3.4248	1.0962	-2.3286
LPHN1	NM_014921	-0.0901	-2.4465	-2.3564
NTSR1	NM_002531	2.8789	0.5174	-2.3615
PPL	NM_002705	1.078	-1.3322	-2.4102
MTSS1	AK027015	1.7895	-0.6234	-2.4129
PLXND1	AK026388	0.3976	-2.0534	-2.451
SFRP1	NM_003012	4.7982	2.3429	-2.4553
SIX6	NM_007374	3.1133	0.6307	-2.4826
SNAI2	NM_003068_(2)	2.5619	0.0569	-2.505
AQP3	NM_004925	1.0236	-1.4867	-2.5103
CD82	NM_002231	1.5577	-0.9543	-2.512
SH3RF2	AK058046	2.0984	-0.4445	-2.5429
C10orf58	NM_032333	1.1695	-1.3768	-2.5463
TSC22D3	NM_004089	1.4154	-1.1828	-2.5982
LAD1	NM_005558	3.2313	0.6146	-2.6167
DHRS3	NM_004753	0.302	-2.3544	-2.6564
TRIM29	NM_012101	3.4682	0.7863	-2.6819
TIMP3	NM_000362	1.0931	-1.6189	-2.712

Name	Genbank ID	control	HNF1B	HNF1B-control
DSG3	NM_001944	4.924	2.2021	-2.7219
FGFBP1	NM_005130	4.0154	1.2763	-2.7391
S100A2	NM_005978	6.1549	3.407	-2.7479
SCD	NM_005063	0.0737	-2.7255	-2.7992
TP63	NM_003722	1.896	-0.9072	-2.8032
S100P	NM_005980	0.6991	-2.1088	-2.8079
C16orf92	AK058133	3.9067	1.0401	-2.8666
INPP5D	NM_005541	2.2607	-0.6256	-2.8863
CLCA2	NM_006536	4.5353	1.6227	-2.9126
RNF144B	NM_182757	1.596	-1.3581	-2.9541
DST	NM_001723	3.9914	0.9291	-3.0623
SLC37A2	CTONG3006623.1_1	3.6866	0.5858	-3.1008
CSTA	NM_005213	4.3703	1.2588	-3.1115
FAT2	NM_001447	3.2323	0.0499	-3.1824
KRT14	NM_000526	4.7716	1.4423	-3.3293
S100A14	NM_020672	5.1792	1.8336	-3.3456
KRT15	NM_002275	0.9538	-2.6414	-3.5952
TNNI2	NM_003282	3.6199	-0.0118	-3.6317
FXD3	NM_005971	3.5675	-0.155	-3.7225

表 8. 各遺伝子のプロモーター領域での HNF1B のコンセンサス配列に類似した配列

遺伝子名	site	コンセンサス配列に類似した配列	転写開始点より
ZEB1	1	CCAATAAATAAC	-1581
	2	TTATAAATTAAC	-1228
ZEB2	1	TTTATATTTTAC	-1851
	2	TTAATAAATAAA	-1801
	3	TTTTTGATTAAC	-1012
ΔNp63	1	CCTATAATTAAC	-1527
	2	CTAATCATTTAC	-839
	3	CTAATTTCTAAC	-430
	4	CTAATATATACC	-19
FOXC2	1	TTAATCATCAAC	-935
	2	CAAATAATTAAT	-928
	3	TTAATGAGTGAT	-806
ETS1	1	TCAAAAATTAAC	-1806
	2	TTACTCTTTAAT	+154

表 9. 同所性移植からの転移アッセイにおける部位別転移巣の形成率

	Metastasis site	Day7	Day14	Day21	Day28
Venus	Brain	0/8	0/8	0/8	0/8
	Bone	0/8	0/8	0/8	0/8
	Lymphnode	0/8	1/8	1/8	1/8
	Lung	0/8	3/8	3/8	8/8
HNF1B	Brain	0/8	2/8	3/8	1/6
	Bone	0/8	0/8	2/8	0/6
	Lymphnode	0/8	1/8	1/8	1/6
	Lung	0/8	6/8	6/8	6/6

表 10. 尾静脈移植時の部位別転移巣の形成率

Metastasis site	Venus	HNF1B
Brain	0/9	4/9
Bone	0/9	5/9
Lung	9/9	9/9

表 11. がんとの関連性が報告されているホメオボックス遺伝子

Down-regulated

CDX2

HOXC4

HOXA5

HOXA9

HOXA10

HOXD10

BARX2

NKX3.1

NKX6.2

ALX3

HOPX

PITX1

VentX

CUX1

Up-regulated

GBX2

HOXA1

HOXA7

HOXA9

HOXA10

HOXB7

HOXB13

HOXC6

HOXC8

HOXC10

DLX4

DLX5

MSX1

NANOG

PAX2

NKX2.1

PAX9

LHX1

Up-regulated

SIX1

MEIS1

ZEB1

ZEB2

GSC

Translocation-induced fusion

NUP98-HOXA9

NUP98-HOXA11

NUP98-HOXC11

NUP98-HOXD11

NUP98-HOXA13

NUP98-HOXD13

E2A-PBX1

FKHR-PAX3

FKHR-PAX7

PPAR γ 1-PAX8

Inversion-induced fusion

HOXA10

HOXA11

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 松井 貴香 印

(2016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	<ol style="list-style-type: none"> 1. ○<u>A. Matsui</u>, J. Fujimoto, K. Ishikawa, E. Ito, N. Goshima, S. Watanabe, K. Semba, “Hepatocyte nuclear factor 1 beta (<i>HNF1B</i>) induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition”, <i>FEBS Letters</i>, 2016, doi: 10.1002/1873-3468.12147 2. M. Saito, Y. Kato, E. Ito, J. Fujimoto, K. Ishikawa, A. Doi, K. Kumazawa, <u>A. Matsui</u>, S. Takebe, T. Ishida, S. Azuma, H. Mochizuki, Y. Kawamura, Y. Yanagisawa, R. Honma, J. Imai, H. Ohbayashi, N. Goshima, K. Semba, S. Watanabe., “Expression screening of 17q12–21 amplicon reveals GRB7 as an ERBB2-dependent oncogene”, <i>FEBS Letters</i>, 586(12), 1708–1714., 2012
総説	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>A. Matsui</u>, T. Ihara, H. Suda, H. Mikami, K. Semba, “Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer”, <i>Biomol. Concepts</i>, 4(6), 567–582, 2013 2. T. Yamamoto, M. Saito, K. Kumazawa, A. Doi, <u>A. Matsui</u>, S. Takebe, T. Amari, M. O. and K. Semba., <i>ErbB2/HER2: Its Contribution to Basic Cancer Biology and the Development of Molecular Targeted Therapy.</i>, Breast Cancer-Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways (Gunduz, M., Ed), ISBN: 978-953-307-714-7, InTech, 139-170, 2011
講演	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>松井貴香</u>、藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎，“上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”，第 74 回日本癌学会学術総会，2015，名古屋，ポスター 2. <u>松井貴香</u>、藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎，“上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”，第 37 回日本分子生物学会年会，2014，横浜，ポスター 3. <u>Atsuka Matsui</u>, Jiro Fujimoto, Kentaro Semba, “Identification and functional analysis of HNF1B as a Novel Oncogene”, POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF CELL SIGNALING, 2014, SanDiego, poster 4. <u>松井貴香</u>、藤元次郎、仙波憲太郎 “上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”，第 2 回低酸素研究会，2014，東京，口頭（YIA 受賞） 5. <u>松井貴香</u>、藤元次郎、仙波憲太郎，“上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”，第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会，2013，京都，ポスター 6. <u>Atsuka Matsui</u>, Kentaro Semba, “Identification of a novel oncogene by systematic screening using NMuMG immortalized epithelial cells and a full length cDNA expression library.”, American Association for cancer research-Advances in Breast Cancer Research, 2011, San Francisco, CA, poster 7. <u>松井貴香</u>、齊藤諒、藤元次郎、大竹徹、伊藤恵美、澤田直樹、今井順一、和栗聡、渡辺慎哉、仙波憲太郎，“上皮系細胞と全長 cDNA を用いてのスクリーニングによる新規癌遺伝子の同定と機能の解析”，第 74 回日本癌学会学術総会，2011，名古屋，口頭