

乳がん細胞におけるクロマチン制御因子FOXA1の多面的機能

山口 憲孝^{1,2}, 山口 直人²

1. クロマチン制御因子FOXA1

Forkhead box protein A1 (FOXA1) は、A～Sの19種類のサブファミリーから構成されるForkhead box型 (FOX) 転写因子ファミリーに属し、1～3の3種類からなるFOXAサブファミリーの一員である¹⁾。FOXA1は、初めに肝細胞におけるDNA結合タンパク質の一つとして同定され、hepatocyte nuclear factor-3 α (HNF-3 α) と名づけられた²⁾。その後、HNF-3 α がショウジョウバエのホメオティック遺伝子forkheadの産物と高い相同性を有するDNA結合ドメインを持つこと、類似したDNA結合ドメインを持つタンパク質が哺乳動物細胞に多数存在しファミリー (FOX型転写因子ファミリー) を形成することが明らかとなり、HNF-3 α はこのファミリーの一員としてFOXA1と名前を改められた^{1,3)}。FOXドメインは100個程度のアミノ酸によって構成されており、結晶構造解析から二つの大きなループを持つヘリックス・ループ・ヘリックスであることがわかり、二つの大きなループが翼のようにみえることから“winged-helix”と呼ばれている⁴⁾。さらに、FOXドメインの立体構造がリンカーヒストンH5の立体構造と類似していることがわかり⁴⁾、このことが手がかりとなって、FOXA1がリンカーヒストンと置き換わることによって凝縮したクロマチンを解くクロマチン制御因子として機能することが明らかとなった⁵⁾。

2. エストロゲン依存性乳がん細胞におけるFOXA1の役割

FOXA1と乳がん細胞との関連が初めて示されたのは、エストロゲン受容体 (ER α) による遺伝子発現機構の解析においてである⁶⁾。乳がん細胞の多くはER α を発現しており、女性ホルモンのエストロゲン依存的に増殖する。ER α は核内受容体の一種であり、リガンド結合により転写因子として機能する。ER α の結合コンセンサス配列 (estrogen response element: ERE) は決定されており、ゲノムDNA上に多数のEREが存在することがわかっているが、実際にER α が結合して遺伝子発現が誘導される部位は一部に限られている。この理由を明らかにするために、乳がん細胞株を用いたChIP-on-chip解析 (転写因子に結合したDNA断片をマイクロアレイによって解析する実験法) が行われ、ER α が結合するゲノムDNA配列の特徴が解析された。その結果、ER α が結合するゲノムDNA配列の近傍には、高頻度にFOXA1の結合コンセンサス配列 (forkhead-binding motif: FBM) が存在することが明らかとなったのである⁶⁾。実際にFOXA1の発現をノックダウンすると、ER α の標的遺伝子エンハンサー領域への結合と標的遺伝子の発現が抑制されたことから、FOXA1がER α の活性化に

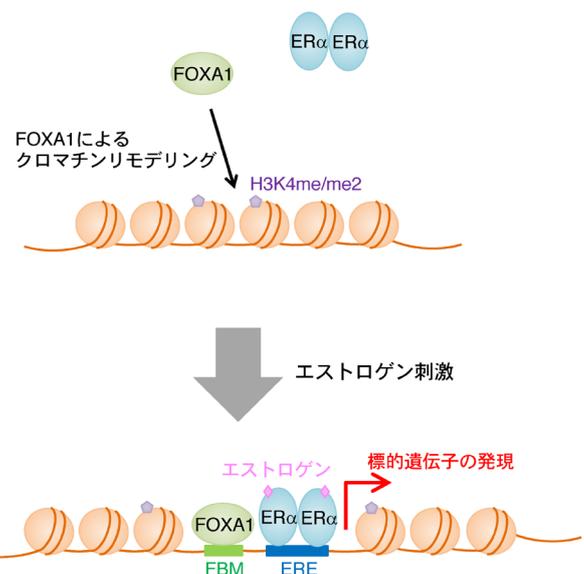


図1 FOXA1によるER α 活性化誘導機構

¹千葉大学大学院薬学研究院・分子心血管薬理学 (〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1)

²千葉大学大学院薬学研究院・分子細胞生物学 (〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1)

FOXA1 as a double-edged sword in breast cancer development
Noritaka Yamaguchi^{1,2} and Naoto Yamaguchi² (¹Department of Molecular Cardiovascular Pharmacology, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan, ²Laboratory of Molecular Cell Biology Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan)
本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910105

© 2019 公益社団法人日本生化学会

重要であることがわかった。これらのことから、FOXA1は、ER α 標的遺伝子のエンハンサー領域に結合し閉じたクロマチンを解いてER α の結合を促す“pioneer factor”として機能することが明らかとなった（図1）。また、FOXA1は、エンハンサー領域に多い4番目のリシン残基がメチル化やジメチル化されたヒストンH3（H3K4me, H3K4me2）に結合することがわかっており、これらのヒストン修飾を受けたエンハンサー領域のFBMを認識していると考えられている^{7,8)}。

FOXA1がER α の活性化に重要であることがわかったため、乳がん細胞におけるFOXA1の発現が解析された。その結果、エストロゲン依存性（ER α 陽性）乳がん細胞株のほぼすべてがFOXA1を発現していることがわかり、さらに、乳がん細胞株のFOXA1をノックダウンするとエストロゲン応答性が低下し、細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。細胞株のみならず、ヒト乳がん組織においても、ER α 陽性の乳がん組織ではFOXA1が高発現していることがわかり、FOXA1はER α 陽性の乳がんにおいてエストロゲン応答を促し細胞増殖を促進することが示された^{9,10)}。

3. エストロゲン非依存性乳がん細胞におけるFOXA1の役割

乳がん細胞株におけるFOXA1の発現解析の結果、エストロゲン非依存性（ER α 陰性）の乳がん細胞株において

もFOXA1の発現が認められた。これらの細胞におけるFOXA1発現をノックダウンしたところ、細胞増殖が低下する一方で、細胞の運動性が上昇することがわかった。遺伝子発現解析により、FOXA1のノックダウンによって間葉系乳がん細胞の遺伝子発現パターンを獲得することが示された⁹⁾。上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得して細胞の運動性や浸潤性が亢進する現象は上皮間葉転換（EMT）と呼ばれ、がん細胞の転移・浸潤を促進してがんの悪性化を導くことが知られている¹¹⁾。筆者らは、FOXA1は乳がん細胞のEMTを抑制する機能を有するのではないかと考え、解析を行った。まず、FOXA1陽性のヒト乳がん細胞株MCF7を用い、FOXA1発現をノックダウンにより抑制して上皮マーカーE-cadherinの発現を解析した。その結果、FOXA1ノックダウンによってE-cadherinの発現がmRNAレベルでは上昇する一方で、タンパク質レベルでは減少した。次に、代表的なEMT誘導転写因子SLUGの発現を解析したところ、FOXA1ノックダウンによってSLUGの発現がタンパク質レベル、mRNAレベルとも上昇した。SLUGをMCF7細胞に安定発現させたところ、FOXA1ノックダウンと同様にE-cadherinの発現がmRNAレベルでは上昇する一方で、タンパク質レベルでは減少した。以上より、FOXA1は、乳がん細胞においてSLUGの発現を抑制してEMTを阻害することが示された（図2a）。また、SLUGがタンパク質レベルでE-cadherinの発現を抑制することもわかり、現在、その分子機構について解析を進めている¹²⁾。

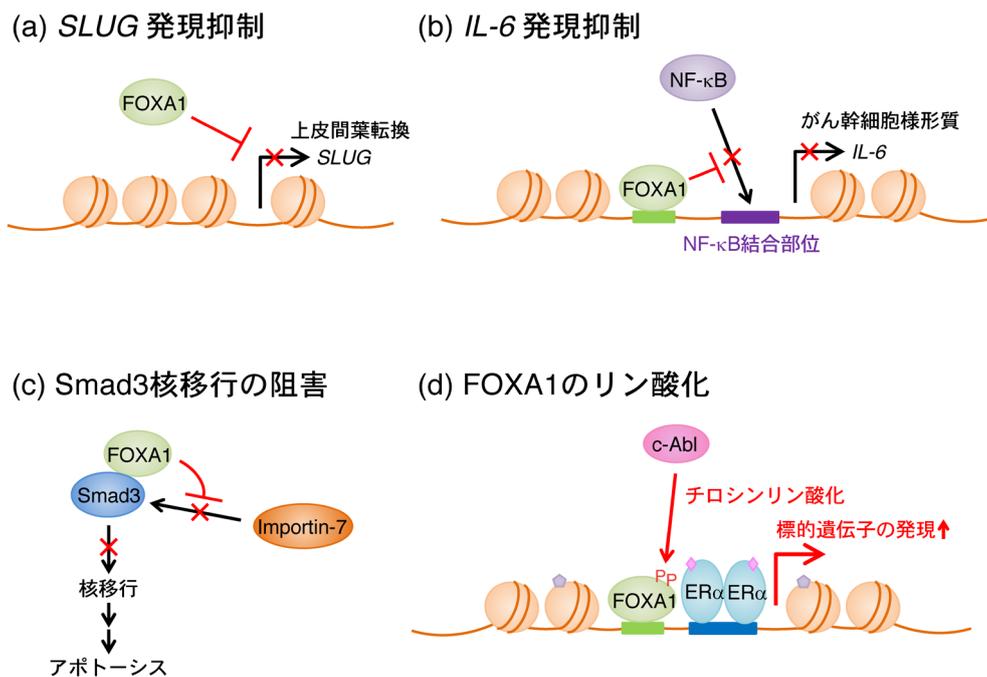


図2 FOXA1の新たな分子機能と制御機構

4. 乳がん細胞のタモキシフェン抵抗性獲得における FOXA1 の役割

エストロゲン依存性乳がんの治療には、乳がん細胞において ER α 阻害薬として作用するタモキシフェンが用いられる。しかしながら、長期治療後に抵抗性を獲得した乳がんが再発することが多く、抵抗性獲得の分子機構解明が必要とされている。筆者らは、FOXA1 がタモキシフェン抵抗性に関与しているのではないかと予想して解析を行った。まず、エストロゲン依存性の MCF7 細胞を用い、1 年以上タモキシフェン存在下に培養を行い、タモキシフェン存在下でも増殖能を有する耐性株 (TAM-R) を樹立した。TAM-R の ER α 発現を解析したところ、ER α 発現が減少し標的遺伝子の発現も低下していた。次に FOXA1 の発現を解析したところ、TAM-R では FOXA1 発現が減少していた。筆者らは、従来の解析によって、エストロゲン非依存性乳がん細胞では転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) が持続的に活性化し、細胞増殖を促進することを見いだしていたため¹³⁾、TAM-R における NF- κ B 活性化を調べた。その結果、TAM-R において NF- κ B が持続的に活性化し炎症性サイトカイン interleukin-6 (IL-6) の発現を誘導していることがわかった。TAM-R に FOXA1 を強制発現させると、IL-6 の発現が低下し、TAM-R の増殖も低下した。IL-6 は乳がん幹細胞様の形質維持に関わることが知られていたため、TAM-R の乳がん幹細胞様形質についてスフィア培養を行って解析したところ、確かに TAM-R では IL-6 依存的に乳がん幹細胞様形質を獲得していることがわかった。次に、IL-6 発現における FOXA1 の役割を解析したところ、FOXA1 は NF- κ B シグナルの活性化には影響しないものの、IL-6 エンハンサー領域への NF- κ B の結合を阻害し、NF- κ B による IL-6 の発現を抑制することがわかった (図 2b)。以上より、乳がん細胞における FOXA1 の発現消失が、IL-6 の発現誘導を介して乳がん幹細胞様形質やタモキシフェン抵抗性に関与することが明らかとなった¹⁴⁾。

5. 乳がん細胞における FOXA1 による TGF- β 誘導性アポトーシスの抑制

サイトカインの一つである transforming growth factor- β (TGF- β) は、正常上皮細胞にはアポトーシスを誘導してがん抑制的に作用することが知られている。しかし、がん細胞はこの TGF- β 誘導性アポトーシスに抵抗性を示し、この抵抗性のがんの進展に関与していると考えられている。正常乳腺細胞は TGF- β によるアポトーシスに感受性を示し、マウスでは Tgf- β 3 が乳腺の退縮に関与することが知られているが、乳がん細胞は TGF- β によるアポトーシスに抵抗性を持つことがわかっている¹⁵⁾。筆者らは、この抵抗性に

FOXA1 が関与しているのではないかと予想して解析を行った。まず、MCF7 細胞に対して FOXA1 をノックダウンして TGF- β により刺激したところ、コントロール細胞では認められなかったアポトーシスが FOXA1 ノックダウン細胞では顕著に認められた。TGF- β により活性化する転写因子 Smad3 をノックダウンしたところ、FOXA1 をノックダウンした MCF7 細胞のアポトーシスが抑制された。また、FOXA1 をノックダウンした MCF7 細胞では、TGF- β 刺激による Smad3 標的遺伝子の発現が顕著に増加していた。そこで、Smad3 の活性化について解析したところ、FOXA1 ノックダウンによって TGF- β 刺激による Smad3 のリン酸化は影響されないものの、Smad3 の核移行が亢進することがわかった。FOXA1 と Smad3 の相互作用を解析したところ、FOXA1 は Smad3 に結合し、TGF- β 刺激による Smad3 と核移行受容体 Importin-7 との相互作用を抑制することがわかった (図 2c)。これらのことから、FOXA1 は、乳がん細胞において Smad3 の核移行を阻害することによって TGF- β 刺激によるアポトーシスを抑制していることが明らかとなった¹⁶⁾。

6. FOXA1 のチロシンリン酸化によるエストロゲンシグナルの増強

筆者らは、c-Src や c-Abl などの非受容体型チロシンキナーゼの核内における役割について解析を行っている。ホスホプロテオーム解析によって c-Abl の核内基質の探索を行い、c-Abl の新規基質として FOXA1 を同定した。主要なリン酸化部位を解析したところ、ヒストン結合部位である C 末端の二つのチロシン残基 (Tyr429, Tyr464) であることがわかった。内在性にエストロゲンシグナルを持たないヒト子宮頸がん細胞株 HeLa を用いて ER α と FOXA1 を安定発現し、エストロゲンシグナルを再構築して FOXA1 のチロシンリン酸化の役割について調べた。その結果、二つのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した FOXA1 の非リン酸化体の安定発現ではエストロゲンシグナルが抑制される一方で、グルタミン酸に置換した FOXA1 の擬似リン酸化体の安定発現ではエストロゲンシグナルが亢進した。さらに、FOXA1 の擬似リン酸化体は、ヒストン H3 との結合が増加することがわかった (図 2d)。これらのことから、c-Abl によって FOXA1 はチロシンリン酸化され、ヒストン H3 との結合が増加してエストロゲンシグナルが増強されることが示された¹⁷⁾。

7. 結語および今後の課題

乳がん細胞において、FOXA1 は ER α の pioneer factor として機能することが広く知られている一方で、筆者らや他グループの解析によって、FOXA1 が多面的な機能を持つこ

とが明らかとなってきた。FOXA1の阻害はエストロゲンシグナルの抑制により乳がん治療に役立つと考えられてきたが、FOXA1の阻害がEMT誘導や乳がん幹細胞様形質・薬剤抵抗性の獲得につながると考えられ、一時的にはがん抑制効果が認められても長期的にはがん悪性化に寄与する可能性があり、FOXA1のエストロゲンシグナルに対する機能を特異的に抑制する手段を確立する必要がある。FOXA1によるEMTや乳がん幹細胞様形質の抑制には、FOXA1によりSLUGやIL-6の発現抑制が関わっており、このような遺伝子発現抑制因子としてのFOXA1の分子機能については不明な点が多く残されており、今後解析を進める必要がある。また、FOXA1によるSmad3の核移行の抑制については、FOXA1が細胞質においてSmad3と結合する可能性が示されており、核内にとどまらないFOXA1の細胞質における機能についても今後解析すべき重要な課題である。

謝辞

本稿において概説した研究にご協力いただいた千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学の構成員に感謝いたします。

文 献

- Golson, M.L. & Kaestner, K.H. (2016) Fox transcription factors: from development to disease. *Development*, **143**, 4558–4570.
- Lai, E., Prezioso, V.R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R.H., & Darnell, J.E. Jr. (1990) HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev.*, **4**, 1427–1436.
- Lai, E., Prezioso, V.R., Tao, W.F., Chen, W.S., & Darnell, J.E. Jr. (1991) Hepatocyte nuclear factor 3 α belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head. *Genes Dev.*, **5**, 416–427.
- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., & Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364**, 412–420.
- Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., & Zaret, K.S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell*, **9**, 279–289.
- Carroll, J.S., Liu, X.S., Brodsky, A.S., Li, W., Meyer, C.A., Szary, A.J., Eeckhoutte, J., Shao, W., Hestermann, E.V., Geistinger, T.R., et al. (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*, **122**, 33–43.
- Bernardo, G.M. & Keri, R.A. (2012) FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Biosci. Rep.*, **32**, 113–130.
- Lupien, M., Eeckhoutte, J., Meyer, C.A., Wang, Q., Zhang, Y., Li, W., Carroll, J.S., Liu, X.S., & Brown, M. (2008) FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell*, **132**, 958–970.
- Bernardo, G.M., Bebek, G., Ginther, C.L., Sizemore, S.T., Lozada, K.L., Miedler, J.D., Anderson, L.A., Godwin, A.K., Abdul-Karim, F.W., Slamon, D.J., et al. (2013) FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells. *Oncogene*, **32**, 554–563.
- Yamaguchi, N., Ito, E., Azuma, S., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J., Tatsuta, K., Inoue, J., et al. (2008) FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **365**, 711–717.
- Chaffer, C.L., San Juan, B.P., Lim, E., & Weinberg, R.A. (2016) EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **35**, 645–654.
- Anzai, E., Hirata, K., Shibazaki, M., Yamada, C., Morii, M., Honda, T., Yamaguchi, N., & Yamaguchi, N. (2017) FOXA1 Induces E-Cadherin Expression at the Protein Level via Suppression of Slug in Epithelial Breast Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1483–1489.
- Yamaguchi, N., Ito, T., Azuma, S., Ito, E., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J., Watanabe, S., et al. (2009) Constitutive activation of nuclear factor- κ B is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.*, **100**, 1668–1674.
- Yamaguchi, N., Nakayama, Y., & Yamaguchi, N. (2017) Down-regulation of Forkhead box protein A1 (FOXA1) leads to cancer stem cell-like properties in tamoxifen-resistant breast cancer cells through induction of interleukin-6. *J. Biol. Chem.*, **292**, 8136–8148.
- Siegel, P.M. & Massagué, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 807–821.
- Hirata, K., Takakura, Y., Shibazaki, M., Morii, M., Honda, T., Oshima, M., Aoyama, K., Iwama, A., Nakayama, Y., Takano, H., et al. (2019) FOXA1 confers resistance to TGF- β -induced apoptosis in breast cancer cells through inhibition of Smad3 nuclear translocation. *J. Cell. Biochem.*, **120**, 2259–2270.
- Yamaguchi, N., Shibazaki, M., Yamada, C., Anzai, E., Morii, M., Nakayama, Y., Kuga, T., Hashimoto, Y., Tomonaga, T., & Yamaguchi, N. (2017) Tyrosine Phosphorylation of the Pioneer Transcription Factor FoxA1 Promotes Activation of Estrogen Signaling. *J. Cell. Biochem.*, **118**, 1453–1461.

著者寸描

●山口 憲孝 (やまぐち のりたか)

千葉大学大学院薬学研究院分子心臓薬理学准教授。博士(薬学)。

■略歴 2005年東京大学大学院薬学系研究科後期博士課程修了。博士(薬学)取得。東京大学医科学研究所を経て、12年より千葉大学大学院薬学研究院テニュアトラック助教、18年より現職。

■研究テーマと抱負 がん細胞におけるシグナル伝達異常の解析。最近では、上皮間葉転換や細胞内代謝リモデリングに特に注目している。がん治療薬開発につながる研究成果を目標としている。

■ウェブサイト <http://www.p.chiba-u.jp/lab/maku/index.html>

■趣味 旅行, ドライブ, アウトドア。