

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15508

研究課題名(和文) 乳癌の内分泌治療耐性メカニズムの解明とYB-1を標的とした耐性克服治療薬の創出

研究課題名(英文) Novel breast cancer therapeutic strategy by targeting Y-box binding protein 1 activation pathways

研究代表者

柴田 智博 (Shibata, Tomohiro)

九州大学・薬学研究院・学術研究員

研究者番号：40795986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ER陽性の乳癌患者は全乳癌患者の60%近くを占め、ER標的の内分泌治療薬が臨床応用されている。しかし、内分泌治療による耐性がんの出現は乳癌治療において大きな難関である。本研究では、内分泌治療耐性細胞においてAKT/mTOR/S6Kシグナルの活性化により、乳癌の発症に関わるYB-1のリン酸化が上昇することを明らかにした。さらに、耐性細胞はmTOR阻害薬であるeverolimusに高感受性を示し、動物治療実験においてもYB-1のリン酸化抑制により腫瘍体積が抑制されることを明らかにした。本研究により、YB-1リン酸化シグナルを標的とした薬剤が内分泌治療耐性克服に有用であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ER陽性乳癌の治療においてER標的を標的とした内分泌治療の継続による耐性がんの出現が大きな克服すべき課題である。内分泌治療耐性メカニズムには、ERの活性化変異やER欠失、バイパスシグナルの活性化などが報告されているが、有効な克服治療は見いだされていない。本研究で、内分泌治療耐性乳癌細胞を駆使した検討から、リン酸化YB-1がER発現を抑制し、増殖関連遺伝子の発現を上昇させることで、内分泌耐性を誘導することを明らかにした。さらに、YB-1リン酸化標的薬が内分泌治療耐性乳癌の克服に有効であることを明らかにすることができ、今後の研究の発展により乳癌治療の向上に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Despite considerable advances in the treatment of estrogen receptor alpha (ER)-positive breast cancer, numerous patients develop recurrence during endocrine therapy. Drug resistance to various anticancer drugs is often correlated with enhanced nuclear expression of the Y-box binding protein-1 (YB-1) in breast cancer. In this study, fulvestrant resistant breast cancer cell lines (FR-1 and FR-2) showed markedly reduced expression of ER and increased expression levels of pYB-1, pmTOR, pAKT, pp70S6K, and pS6. FR-1 and FR-2 showed collateral sensitivity to everolimus (an mTORC1 inhibitor). Furthermore, we demonstrated that pYB-1 directly promoted the ER-independent cell growth of breast cancer cells. Finally, treatment with everolimus could overcome acquired resistance to antiestrogens through reduction of pYB-1 expression in vivo. Based on these findings, we concluded that the pYB-1 represents an attractive therapeutic target for endocrine therapy resistant breast cancer.

研究分野：細胞生物学

キーワード：YB-1 乳癌 内分泌治療耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌は女性の罹患するがん種の中で致死率が2位である。乳癌細胞の増殖はER $\alpha$ とHER2発現に緊密に依存しており、ER $\alpha$ 陽性乳癌は、ER $\alpha$ 標的のtamoxifenやfulvestrant、anastrozoleなどの内分泌治療が行われる。一方HER2陽性乳癌は、HER2標的薬のtrastuzumabやpertuzumab、lapatinibなどの分子標的治療が施行され、がん治療の向上に大きく貢献している。現在、術後のtamoxifen等の長期内分泌治療が推奨されているが、内分泌治療耐性がんが出現し、再発・増悪することが大きな難関となっている。内分泌治療耐性メカニズムには、ER $\alpha$ の活性化変異やER $\alpha$ 欠失、FGFRやIGF1Rなどのバイパスシグナルの活性化が報告されているが、有効な克服治療は見いだされていない。

(2) Y-ボックス結合タンパク質-1 (YB-1) は、Cold Shock Domainを含む原始的な多機能制御因子であり、HER2の転写因子であることを我々の研究グループから報告している。YB-1の高発現や活性化(核内局在)は乳癌をはじめとした様々ながん種において予後不良因子であることが当研究室を含む国内外の研究グループにより明らかにされている。さらに、我々はYB-1がリン酸化を受けることで核内に移行し、細胞周期関連因子や増殖因子受容体の発現を誘導することを報告している。

(3) 乳癌患者において核内YB-1発現はHER2発現と正に、ER $\alpha$ 発現と負に有意に相関し、予後不良因子であることを我々の研究室から報告している。また、The Cancer Genome Atlasデータベースにおける多数の乳癌患者を対象とした乳癌組織でのYB-1とER $\alpha$ のmRNA発現解析データを基に、我々はYB-1とER $\alpha$ に負の相関があることを見出している。さらに、YB-1は増殖マーカーであるKi67の発現と正に強く相関することを観察している。

(4) 我々が、ER $\alpha$ 陽性HER2陰性のT-47D細胞から樹立したfulvestrant耐性乳癌細胞株ではtamoxifenに対し交差耐性を示した。さらに、耐性株でYB-1の活性化とER $\alpha$ 発現低下及びHER2発現上昇を観察している。また、YB-1はER $\alpha$ のmRNA発現には影響を与えずタンパク発現を減少させたため、ER $\alpha$ タンパクの安定性に着目し検討を行った。その結果、YB-1はER $\alpha$ と直接会合することでER $\alpha$ のコピキチン化を亢進し、プロテアソームでの分解を促進することを明らかにした。以上の結果から、YB-1がER $\alpha$ の分解を促進し、さらにHER2の発現を亢進することでfulvestrant耐性を獲得していることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

ER $\alpha$ 陽性の乳癌患者は全乳癌患者の60%近くを占め、ER $\alpha$ 標的のtamoxifenやfulvestrantなどの内分泌治療薬が臨床応用されている。しかし、内分泌治療の経過とともに出現してくる耐性がんは乳癌治療において大きな難関である。我々や海外の研究グループからYB-1はリン酸化を受けることで核内に移行し、細胞周期関連因子や増殖因子受容体の発現を誘導することを報告している。さらに、現在までに我々が単離したFulvestrant耐性乳癌細胞でYB-1のリン酸化が上昇することを観察している。本研究では、内分泌治療耐性乳癌のYB-1の活性化メカニズムを明らかにすることにより、乳癌内分泌治療耐性患者において、乳癌のYB-1とER $\alpha$ を標的とした分子病態の新しい把握と耐性克服治療の創出を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬剤感受性の測定 (WST法)

対数増殖期にある細胞を96wellプレートに播種し(T-47D:  $5.0 \times 10^3$  cells) 24時間培養した後、薬剤を添加した。薬剤を添加後37°Cで72時間培養した。生細胞数測定試薬Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所、熊本、日本)を各wellに20 $\mu$ l加えて37°Cで2-3時間培養し、450nmの吸光度を測定した。IC50値は吸光度の値がコントロールの半分になる薬剤濃度を生存曲線から決定した。

#### (2) 乳癌細胞株マウス同所移植実験

BALB/c nu/nu nudeマウスにFulvestrant耐性T-47D/FR-2細胞( $5.0 \times 10^6$  cells)を50% Matrigel(BD Bioscience, Mountain View, CA)に混合し移植した。移植後6日目に腫瘍径を測定し、Control群、everolimus(2 mg/kg/mouse in 0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt [CMC; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan]、連日経口投与)投与群、tamoxifen(500 $\mu$ g/mouse、連日皮下投与)投与群に分け、14日間投与を行った。腫瘍系は3日おきに計測した。Tamoxifenは、100%エタノールに溶解後、peanuts oil(sigma)に懸濁し、250mg/50mlに調整し用いた。投薬開始後14日目に、麻酔下で腫瘍を回収した。腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)は、長径 $\times$ 短径 $2 \times 0.5$ として近似した。回収した腫瘍は、10% paraformaldehydeで固定を行い、一部を-80°Cで保存しタンパク及びmRNAを回収した。

#### (3) 腫瘍内タンパク回収

腫瘍塊にプロテアーゼ阻害剤混合物を添加したT-PER<sup>TM</sup> Tissue Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific, MA)を添加後、30秒間ソニケーションにより破碎。20分間氷上に

静置し、15000rpm 10 分間遠心後、上清を回収。その後、Western-Blot 法によりタンパク発現を検討。

#### (4) Pull down assay

GST 融合タンパク (GST-YB-1) を 1mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG、ナカライテスク) により誘導した大腸菌 (BL-21、Invitrogen) は、プロテアーゼ阻害剤混合物を添加した X-buffer (50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 1 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM PMSF) に懸濁後、30 秒間ソニケーションにより破碎。15000rpm 10 分間遠心後、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を添加し 4°C で 4 時間攪拌。X-buffer で 4 回洗浄 (2000rpm 2 分間) 後、大腸菌により生成された FLAG-ER $\alpha$  タンパクを添加し 4°C で一晩攪拌。その後、X-buffer で 5 回洗浄し、SDS サンプル buffer 30 $\mu$ l で溶出した後、Western-Blot 法で検討した。

#### (5) YB-1(S102)恒常活性化変異体安定発現株の樹立

ER $\alpha$  陽性の T-47D 細胞に対し、YB-1 WT(野生型)、YB-1 S102A(リン酸化不活体)、YB-1 S102E(恒常リン酸化体)のプラスミド DNA を Lipofectamine LTX と Opti-MEM medium を用いプロトコールに従って遺伝子導入。遺伝子導入後ハイグロマイシン B を用い、selection を行いクローニング後安定発現株を樹立した。

### 4. 研究成果

- (1) Pull down assay による検討から、YB-1 のコールドショックドメインと ER $\alpha$  のリガンド結合ドメインが結合することが明らかになった。さらに、ER $\alpha$  との結合能を有さない YB-1 及び野生型 YB-1 を ER $\alpha$  陽性 T-47D 細胞に導入したところ、野生型 YB-1 強制発現により ER $\alpha$  のタンパク分解が促進されたが、ER $\alpha$  との結合能を有さない YB-1 では ER $\alpha$  の分解は促進されなかった。
- (2) Fulvestrant 耐性 T-47D/FR-2 細胞は T-47D 細胞と比較し、YB-1 リン酸化上昇とともに ER $\alpha$  発現低下と HER2 発現上昇を示した。さらに、Fulvestrant 耐性株において mTOR/AKT/S6K シグナルの活性化が観察された。
- (3) mTOR シグナル阻害薬である Everolimus の感受性について検討を行ったところ、親株と比較し Fulvestrant 耐性株で Everolimus に対し高感受性を示した。さらに、Everolimus 処理により YB-1 リン酸化が著明に抑制された。
- (4) YB-1 のリン酸化が Everolimus 処理下の生存に関与するか否かを明らかにするため、YB-1(S102)恒常活性化変異体を作成し、その安定発現株を樹立し検討を行った。その結果、野生型 YB-1 強制発現株は Everolimus に対し感受性であったが、YB-1(S102)恒常活性化変異体発現株は Everolimus に対し耐性を示した。

以上の検討により、YB-1 のリン酸化が Fulvestrant 耐性乳癌細胞の生存に重要であり、YB-1 リン酸化シグナルを標的とした薬剤が内分泌治療耐性克服に有用であることを示すことができた。そこで、YB-1 を標的とした耐性克服治療が治療実験において有効であるか否か検討を行ったところ次の結果が得られた。

- (1) Fulvestrant 耐性乳癌細胞株において、YB-1 リン酸化阻害薬処理により YB-1 の標的遺伝子である EGFR、HER2、Cyclin B1/D/E、CDC6 の発現が抑制された。
- (2) Fulvestrant 耐性乳癌細胞株の乳腺同所移植治療モデルにおいて、Tamoxifen 投薬では腫瘍体積に影響を与えなかったが、Everolimus 投薬により腫瘍体積の有意な抑制効果が観察された。さらに、腫瘍内のリン酸化 YB-1 発現について免疫染色法及びウエスタンブロッティング法により検討を行ったところ、Everolimus 投与群の腫瘍内のリン酸化 YB-1 発現が著明に抑制された。
- (3) さらに、乳癌患者における YB-1 及び ER $\alpha$  mRNA 発現について検討を行ったところ、YB-1 mRNA 高発現群が有意に予後不良であり、ER $\alpha$  mRNA 高発現群が有意に予後良好であった。さらに、YB-1 mRNA 発現と ER $\alpha$  mRNA 発現に負の関連があり、YB-1 mRNA と多数の予後不良因子に正の関連があることが観察された。この結果から、YB-1 は予後不良因子を正に制御し、ER $\alpha$  を含む予後良好因子を負に制御することで乳癌の悪性進展を促進していると考えられる。

以上の検討により YB-1 リン酸化標的薬が内分泌治療耐性乳癌の克服に有効であることを明らかにすることができた。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Kuwano M, Shibata T, Watari K, Ono M. Oncogenic Y-box binding protein-1 as an effective therapeutic target in drug-resistant cancer. *Cancer Sci.* 2019;110:1536-1543. doi: 10.1111/cas.14006. (査読有)
- (2) Shibata T, Tokunaga E, Hattori S, Watari K, Murakami Y, Yamashita N, Oki E, Itou J, Toi M, Maehara Y, Kuwano M, Ono M. Y-box binding protein YBX1 and its correlated genes as biomarkers for poor outcomes in patients with breast cancer. *Oncotarget*, 2018;9:37216-37228. doi: 10.18632/oncotarget.26469. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Tomohiro Shibata. Overcoming endocrine therapy resistance by drugs targeting YBX1 activation pathway in breast cancer. AACR Annual Meeting 2019, 2019年
- (2) 柴田智博、Y-box binding protein YB-1 活性化を標的とした乳癌の内分泌治療耐性の克服治療、第22回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018年
- (3) 柴田智博、Y-box binding protein YB-1 活性化抑制による乳癌の内分泌治療耐性克服、第77回日本癌学会学術総会、2018年
- (4) 柴田智博、Y-box binding protein YB-1 は乳癌のER $\alpha$  と HER2 発現を制御して内分泌治療耐性に関与、第76回日本癌学会学術総会、2017年
- (5) 柴田智博、ER $\alpha$  と HER2 発現の Y-box binding protein-1 (YB-1) による制御と乳癌内分泌治療耐性、第21回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017年(シンポジウム)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院 薬学研究院 創薬腫瘍科学講座

<http://shuyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。