

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19601

研究課題名(和文)乳がんにおける休眠抑制因子群再活性化を利用した創薬研究

研究課題名(英文)Drug discovery in breast cancer utilizing reactivation of tumor suppressors

研究代表者

片桐 豊雅(KATAGIRI, Toyomasa)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授

研究者番号：60291895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はER陽性乳癌細胞において発現亢進するBIG3-PP1複合体が、がん抑制因子PHB2の脱リン酸化を介した抑制機能阻害を導くことを明らかにした。また、BIG3-PHB2結合阻害ペプチドにて抗腫瘍効果誘導にも成功した。本研究計画では、BIG3によるPHB2の不活化機構に基づいたがん抑制因子群の機能喪失機構と多段階発がん説の提唱および抑制因子群活性化創薬を目指す。研究期間中に(1)新規BIG3結合因子の同定、(2)無傷なBIG3結合抑制候補因子の同定、(3)BIG3-PHB2結合阻害ペプチドの改良開発を遂行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんでは、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2の三大受容体の発現に基づいた治療薬が主流であるが、これら受容体の活性化機序は多岐にわたり、その陽性率だけで治療方針の決定ができない症例も少なくない。その原因として、申請者らが同定したBIG3による抑制因子PHB2の制御がこれまで知られていなかったことがあげられる。本研究における、BIG3複合体によるPHB2の抑制活性の制御を介した乳がん多段階発がんの分子機序の解明は、これまでの治療指針、特に、既存の乳がん治療薬耐性症例に対する治療を大きく変える重要な知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to propose the mechanism of the novel multistep carcinogenesis of breast cancer based on inactivation of tumor suppressor PHB2 via BIG3 complex that frequently up-regulated in breast cancers. In this study, we identified the several proteins which bind to BIG3 through the BIG3 antibody mediated-immunoprecipitation and mass spec analyses. Among them, several mitochondrial proteins were included. Moreover, we also identified the kinases which are responsible for PHB2 phosphorylations in breast cancer cells. Next, we did next-generation RNA sequencing on 15 triple negative breast cancer (TNBC) and exome seq on 30 TNBC cases and found some candidate tumor suppressor genes which had several somatic mutations in some cases. Furthermore, we did optimization of BIG3-PHB2 interaction peptide inhibitor by intramolecular crosslinking methods, and succeed to improve its more antitumor effect.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：breast cancer drug discovery multistep carcinogenesis タンパク相互作用阻害 tumor suppressor

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

#### 1. 研究開始当初の背景

がんはゲノム・エピゲノム異常が蓄積することによって発生、進展する。最近では、大規模なゲノム解析により、多くの癌におけるゲノム変異・エピゲノム異常が同定され、がん化の分子機構がより詳細に解明されている。この集積された「がんゲノムデータベース」の中でも、がん抑制遺伝子の全てにゲノム変異・エピゲノム異常があるわけではない。例えば、代表的ながん抑制遺伝子 p53 において、体細胞変異のないがん細胞の一部では MDM2 によるユビキチン化を介した p53 タンパク質の分解が知られているだけで、多くのがん抑制因子の不活化機構は不明である。さらに、近年、様々な細胞ストレスによってがん抑制遺伝子が活性化される機構が報告されており、この現象は、がん細胞の発症・進展過程から考えると、様々な刺激にて抑制因子のブレーキ作動は不都合であり、このことは「がん抑制因子の新たな機能喪失機構」の存在を意味する。申請者は、ER 陽性乳癌細胞において、乳癌発現亢進分子 BIG3 がセリン/スレオニンプロテインホスファターゼ PP1 の調節ユニットとして機能し、その基質として抑制因子 PHB2 (Prohibitin 2) と結合して脱リン酸化することでその抑制機能を阻害することを明らかにしたこと (*Nat Commun.* 2013)、さらに、BIG3-PHB2 結合阻害ペプチドを開発し、BIG3 より解放した PHB2 の抑制活性の再活性化を利用した抗腫瘍効果誘導に成功したこと (*Nat Commun.* 2013) から、新たな抑制因子の機能喪失機構の提唱と「抑制因子群活性化を利用した休眠抑制因子再活性化創薬」の開発に着想した。

#### 2. 研究の目的

本研究では、BIG3/PP1 複合体による癌抑制因子 PHB2 の不活化機構を通じて、様々な発がんおよびホルモンなどの細胞ストレスによって発現・機能亢進する「無傷な(体細胞細胞変異もメチル化も認められない)がん抑制遺伝子(産物)」の抑制機能の不活化を明らかにし、ゲノム・エピゲノム異常によるドライバー遺伝子の活性化やホルモンストレスの各種イベントを総合的に考慮して、「新たな乳がんの多段階発がん機構の提唱」を目指す。さらに、BIG3-PHB2 相互作用を標的とした BIG3-PHB2 結合阻害ペプチドによる PHB2 の抑制活性の再活性化を利用することで、抗腫瘍効果を見いだしている実績に基づいた、BIG3-新規抑制因子結合阻害ペプチドの樹立を通じて、無傷な抑制因子群の再活性化による乳がん治療薬の開発を試みる。

#### 3. 研究の方法

本研究期間内に、(1) 新規 BIG3 結合抑制因子・リン酸化タンパク質の同定および検証、(2) 新規抑制因子または PHB2 をリン酸化する責任キナーゼの同定、(3) BIG3 結合抑制因子の体細胞変異の検索による無傷な癌抑制因子の同定、(4) PHB2 を含む BIG3-新規抑制因子相互作用阻害ペプチドの開発、(5) 乳がん臨床検体を用いた大規模免疫組織染色および相関解析を通じた「新たな乳がんの多段階発がん機構の提唱」を目指す。

#### 4. 研究成果

本研究期間にて、(1)~(5)についての成果概要は下記の通りである。

(1) BIG3 高発現乳がん培養細胞において、BIG3 特異的抗体を用いた免疫沈降法および質量分析解析により、複数の新規の内在性 BIG3 結合タンパク質を同定した。特に、数種の抑制機能を有する細胞質およびミトコンドリアタンパク質を BIG3-PHB2 複合体結合分子として同定し、その新規分子との結合領域の同定および siRNA による結合分子および BIG3 の発現抑制にてミトコンドリア形態異常惹起を明らかにした。

(2) これまでに同定している抑制因子 PHB2 を対象に、新たに PHB2 をリン酸化するキナーゼとして、乳がんにおいて過剰発現を認める新規キナーゼを同定した。さらに、HER2 増幅陽性乳がん細胞において、HER2 遺伝子の活性を通じて、PHB2 がリン酸化されることを明らかにした。さらに、HER2 陽性乳がんにおいて、HER2・EGFR 活性化シグナル依存的 PHB2 リン酸化部位および各責任キナーゼを同定した。さらに、各リン酸化特異的抗体を作製し、免疫細胞染色法・生化学的手法にて、BIG3-PHB2 複合体の細胞質およびミトコンドリア局在を明らかにした。

(3) トリプルネガティブ乳がん臨床検体 15 症例の次世代シーケンサーを用いた RNAseq 解析、および 30 症例のエクソーム解析を遂行し、体細胞変異の認められる抑制遺伝子を複数同定した。これらの一部は、DNA メチル化による発現抑制も認められたが、体細胞変異もメチル化も認めない症例もあり、無傷な抑制因子の可能性を示すものであることが示唆された。

(4) PHB2-BIG3 相互作用阻害ペプチド ERAP について、分子内架橋化 ERAP および D 体化、逆アミノ酸合成による ERAP の長期持続した BIG3-PHB2 相互作用阻害と in vivo 抗腫瘍効果の促進に成功した。BIG3-新規抑制因子相互作用阻害ペプチドの開発のために、各結合抑制分子との結合の確認と結合領域の絞り込みを行った。

(5) 乳がん臨床検体収集を進め、そのうちの 100 例の HER2 陽性乳がん組織を用い、BIG3、各種 PHB2 リン酸化の発現を検証し、予後と相関関係にあることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Kato Y, Zembutsu H, Takata R, Matsuura T, Kato R, Kanehira M, Iwasaki K, Yamada N, Katagiri T, Sugai T, Fujioka T, Nakamura Y, \*Obara W. A prospective study to

- examine the accuracies and efficacies of prediction systems for response to neoadjuvant chemotherapy for muscle invasive bladder. *Oncol Lett.* 査読有 2018 Nov;16(5):5775-5784. DOI: 10.3892/ol.2018.9330
2. Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T, Yoshida T, Nakamura S, Sugano K, Miki Y, Hirata M, Matsuda K, Spurdle AB, \*Kubo M. Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun.* 査読有 2018 Oct 4;9(1):4083. DOI: 10.1038/s41467-018-06581-8
  3. Deng B, Tarhan YE, Ueda K, Ren L, Katagiri T, Park JH, \*Nakamura Y. Critical role of estrogen receptor alpha O-glycosylation by N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GALNT6) in its nuclear localization in breast cancer cells. *Neoplasia.* 査読有 2018 Oct;20(10):1038-1044. DOI: 10.1016/j.neo.2018.08.006
  4. Li HK, Sugyo A, Tsuji AB, Morokoshi Y, Minegishi K, Nagasu K, Kanda H, Harada Y, Nagayama S, Katagiri T, Nakamura Y, Higashi T, Hasegawa S. alpha-particle therapy for synovial sarcoma in the mouse using an astatine-211-labeled antibody against fizzled homolog 10. *Cancer Sci.* 査読有 2018 Jul;109(7):2302-2309. DOI: 10.1111/cas.13636
  5. Giraudet AL, Cassier PA, Iwao-Fukukawa C, Garin G, Badel JN, Kryza D, Chabaud S, Gilles-Afchain L, Clapisson G, Desuzinges C, Sarrut D, Halty A, Italiano A, Mori M, Tsunoda T, Katagiri T, Nakamura Y, Alberti L, Cropet C, Baconnier S, Berge-Montamat S, Pérol D, Blay JY. A first-in-human study investigating biodistribution, safety and recommended dose of a new radiolabeled MAb targeting FZD10 in metastatic synovial sarcoma patients. *BMC Cancer.* 査読有 2018 Jun 8;18(1):646. DOI: 10.1186/s12885-018-4544-x
  6. Daizumoto K, Yoshimaru T, Matsushita Y, Fukawa T, Uehara H, Ono M, Komatsu M, Kanayama H, \*Katagiri T. A DDX31/mutant-p53/EGFR axis promotes multistep progression of muscle invasive bladder cancer. *Cancer Res.*, 査読有 2018 May 1;78(9):2233-2247. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2528
  7. Miyagawa Y, Matsushita Y, Suzuki H, Komatsu M, Yoshimaru T, Kimura R, Yanai A, Honda J, Tangoku A, Sasa M, Miyoshi Y, \*Katagiri T. Frequent downregulation of *LRRC26* by epigenetic alterations is involved in the malignant progression of triple-negative breast cancers. *Int J Oncol.* 査読有 2018 Mar 5. DOI: 10.3892/ijo.2018.4301
  8. Yoshimaru T, Ono M, Bando Y, Chen YA, Mizuguchi K, Shima H, Komatsu M, Imoto I, Izumi K, Honda J, Miyoshi Y, Sasa M, \*Katagiri T. A-kinase anchoring protein BIG3 coordinates oestrogen signaling in breast cancer cells. *Nat Commun.* 査読有 2017 May 30;8:15427. DOI: 10.1038/ncomms15427
  9. Yoshimaru T\*, Aihara K, Komatsu M, Matsushita Y, Okazaki Y, Toyokuni S, Honda J, Sasa M, Miyoshi Y, Otaka A, \*Katagiri T. Stapled BIG3 helical peptide ERAP extends potent antitumor activity for breast cancer therapeutics. *Sci Rep.* 査読有 2017 May 12; 7(1):1821. DOI:10.1038/s41598-017-01951-6

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Toyomasa Katagiri. Targeting RHBDL2-SLC1A5 axis to overcome chemoresistance and progression in triple negative breast cancer. International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) Annual Meeting 2019 (招待講演) (国際学会) 2019 年.
2. Toyomasa Katagiri. Comprehensive molecular features of triple negative breast cancers. The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. 2018 年
3. Toyomasa Katagiri. Novel therapeutic strategy for breast cancer utilizing activation of tumor suppressor PHB2. The 34th Radiation Biology Center International Symposium (招待講演) 2018 年
4. 吉丸哲郎, 松下洋輔, 片桐豊雅. 新規 A キナーゼアンカータンパク質 BIG3 による抑制因子 PHB2 の制御は HER2 乳癌細胞増殖に必須である. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018 年
5. 吉丸哲郎, 松下洋輔, 笹三徳, 三好康雄, 片桐豊雅. BIG3-PKA-PP1C 複合体による癌抑制因子 PHB2 不活性化を介したトラスツズマブ耐性乳癌増殖機構と新規治療法開発. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年
6. 片桐豊雅. 乳がん細胞における小胞体-ゴルジ体間シャトルを通じた IRE1 活性化機構の解明. 第 91 回日本生化学会大会. 2018 年
7. Toyomasa Katagiri. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumor activity for breast cancer therapeutics. Society of Precision Cancer Medicine Annual Meeting 2018 (招待講演) (国際学会) 2018 年.
8. Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Sasa Mitsunori, Miyoshi Yasuo and Toyomasa

- Katagiri. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer by utilizing PHB2, a tumor suppressor of multiple resistance pathways. American Association for Cancer Research ANNUAL MEETING 2018 (国際学会) 2018年.
9. Toyomasa Katagiri, Kei Daizumoto, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Tomoya Fukawa, Ono Masaya and Hiro-omi Kanayama. DDX31 cooperates with mutant p53 and EGFR to promote the multistep progression of invasive bladder cancer. American Association For Cancer Research ANNUAL MEETING 2018 (国際学会) 2018年.
  10. Toyomasa Katagiri. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumor activity for breast cancer therapeutics. International Society of Precision Cancer Medicine Annual Meeting 2018 (招待講演) (国際学会) 2018年
  11. 片桐豊雅. がん抑制因子活性化を利用して新規乳がん治療薬の開発. KOBR 研究会(招待講演) 2018年
  12. 片桐豊雅. ホルモン依存性乳がん治療の刷新を目指したがん抑制因子活性化による新規治療薬の開発. 第25回日本乳癌学会学術総会(招待講演) 2017年
  13. 片桐豊雅. 新たなホルモン依存性乳がん治療薬の開発を目指して. 第42回日本外科系連合学会学術集会(招待講演) 2017年
  14. Toyomasa Katagiri. Development of chemically modified peptide inhibitor ERAP targeting BIG3-PHB2 complex on hormone-resistant breast tumor. 米国癌学会 American Association For Cancer Research ANNUAL MEETING 2017 (国際学会) 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：吉丸 哲郎  
ローマ字氏名：(YOSHIMARU, Tetsuro)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：先端酵素学研究所(プロテオ)  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：80424729

研究協力者氏名：松下 洋輔  
ローマ字氏名：(MATSUSHITA, Yosuke)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：先端酵素学研究所(プロテオ)  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：70634450

研究協力者氏名：尾野 雅哉  
ローマ字氏名：(ONO, Masaya)  
所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター  
部局名：研究所  
職名：ユニット長  
研究者番号(8桁)：00270900

研究協力者氏名：水口 賢司  
ローマ字氏名：(MUZUGUCHI, Kenji)  
所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
部局名：医薬基盤研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト  
職名：プロジェクトリーダー  
研究者番号(8桁)：50450896

研究協力者氏名：大高 章  
ローマ字氏名：(OTAKA, Akira)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部(薬学系)  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：20201973

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。