

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07643

研究課題名（和文）創薬開発に向けたがん特異的分子BIG3の新機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of new functions of cancer-specific BIG3 protein for drug discovery

研究代表者

相原 仁（AIBARA, Hitoshi）

徳島大学・先端酵素学研究所・特任助教

研究者番号：80587717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）にて発現亢進を認めるBIG3タンパク質およびその中心的相互作用因子であるPHB2を含めた巨大複合体の病態生理機能の解析を遂行した。その結果、TNBCにおいてBIG3-PHB2複合体は、ミトコンドリアの内膜から外膜へ広範囲に種々の相互作用因子と複合体を形成し、ミトコンドリアの構造・機能維持に必須な役割を果たすことを証明した。BIG3-PHB2タンパク質間相互作用阻害ペプチドを用いて、この複合体形成の破壊が、TNBC細胞の増殖抑制を導くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2いずれも陰性のトリプルネガティブ乳がん（TNBC）は、高再発率かつ予後不良であり、明確な治療法が確立されていないため、新たな治療標的の同定、治療法の革新的アイデアが望まれる。本研究によって、TNBCにおいて、BIG3-PHB2を中心としたミトコンドリア因子巨大ネットワークが、ミトコンドリアの構造・機能維持に必須であり、同時にTNBCの脆弱性であることが示され、新たな治療標的の可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）： We demonstrate that Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) large complex consists of Prohibitin 2 (PHB2), a pleiotropic mitochondrial regulator and several mitochondrial factors maintaining mitochondrial structure and function in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. Crucially, either BIG3 knockdown or treatment with a competitive inhibitory peptide (stERAP) targeting BIG3-PHB2 interaction caused abnormal elongation of mitochondria substantially dissimilar to mitochondrial fusion, leading to drastic inhibition of TNBC cell growth. Remarkably, stERAP dissociates not only PHB2 but also other BIG3 interactors from BIG3, resulting in the functional deficiencies of mitochondria. Our results strongly suggest that BIG3 integrates the pathophysiological states of mitochondria, implying the BIG3-PHB2 axis as a potential target for TNBC therapy.

研究分野：腫瘍生物学・生化学

キーワード：ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、世界で女性の乳がん罹患率は、がん全症例で最多となり(Sung et al. CA CANCER J. CLIN. 2021)、年々増加の一途を辿っている。乳がん全体の約70%は、女性ホルモンであるエストロゲン受容体(ER)が陽性であり、エストロゲンを阻害するホルモン療法が有効であるが、副作用や治療抵抗性獲得による再発が深刻な問題であり、新たな治療法の確立が望まれている。

研究代表者所属の研究室では、先行研究において、ER陽性乳がんの癌部に特異的に過剰発現するタンパク質 Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3)を同定し、以下の悪性増殖機序を明らかにしてきた。エストロゲンの一種であるエストラジオール E2 は核内エストロゲン受容体 ER と結合し、転写活性化を導き、細胞増殖を促進する。一方、転写抑制因子 Prohibitin2 (PHB2)は、核内に移行して ER と結合し、NCoR などの転写抑制因子複合体をクロマチンヘリクルートし、転写を抑制する。細胞質において BIG3 は、アンカータンパク質として機能し、PHB2 をトラップするため、ER 標的遺伝子の転写抑制が阻害され、悪性増殖に寄与することを見出した (Kim et al. Cancer Sci. 2009)。この BIG3 のアンカー機能は、BIG3-PHB2 と複合体を形成するキナーゼ・ホスファターゼによる BIG3 および PHB2 のリン酸化・脱リン酸化調節によって維持されている。生化学的解析から、以下の分子メカニズムを証明してきた。BIG3 がセリン・スレオニンキナーゼであるプロテインキナーゼ A (PKA) およびホスファターゼ PP1C のアンカーとして働き、(1) BIG3 は PKA によってリン酸化され、逆に PP1C の脱リン酸化活性を上昇させること、(2) PHB2 の 39 番目セリンのリン酸化が PHB2 の活性に必須であるが、BIG3 に結合した PP1C によって脱リン酸化されることによって、その効果がキャンセルされる (Yoshimaru et al. Nature Comm. 2017)。

さらに、BIG3 と PHB2 の相互作用を競合阻害する細胞膜透過性およびプロテアーゼ抵抗性を有した BIG3 配列由来の分子内架橋型ペプチド、stapled ERAP (stERAP) を開発し、E2 依存性乳がんに対して抗腫瘍効果を発揮することを実証し (Yoshimaru et al. Nature Comm. 2013 & Scientific Report 2017)、臨床前試験に取り組んでいる。

以上の研究成果は、エストロゲン依存性の乳がんに適用される治療方法であるが、ER やプロゲステロン受容体、Her2 いずれも陰性のエストロゲン非依存性のトリプルネガティブ乳がん (Triple Negative Breast Cancer, TNBC) は転移しやすく、悪性度の高いことが報告されており、未だ有効な治療法が確立されていない。研究代表者は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベース解析から、ER 陽性患者と同様に、TNBC 患者の BIG3 高発現群は予後不良であることを見出した。また、TNBC 細胞株 (BT-20, BT-549, HCC1806 など) において BIG3 の発現が認められ、siRNA による BIG3 ノックダウンあるいは stERAP によって TNBC 細胞の増殖が低下することを明らかにした。以上の予備実験から、TNBC においても BIG3-PHB2 複合体が悪性増殖に寄与することが示唆された。

2. 研究の目的

がん細胞の増殖・進展等の悪性形質の維持が特定のがん遺伝子によるシグナル伝達経路の持続的な活性化に強く依存するという概念は、Oncogene addiction (がん遺伝子中毒) と呼ばれ、分子標的治療の理論的基盤である (Weinstein IB Science 2002, Weinstein IB & Joe AK Cancer Res. 2006)。本研究は、再発率が非常に高く、再発後の生存期間が短い TNBC において、その悪性増殖が BIG3 の発現に依存する仕組み、いわゆる BIG3 addiction の分子メカニズムの解明を目的として、

(1) BIG3-PHB2 複合体の細胞内オルガネラ局在の同定

(2) BIG3 複合体構成因子の全貌解明

(3) BIG3 複合体の病態生理機能の解明

これら3点の課題に取り組んだ。

3. 研究の方法

項目2の研究目的で掲げた3課題について、

(1) オルガネラマーカーや抗体を用いた免疫染色、細胞分画および各画分のウエスタン解析によって、BIG3-PHB2 複合体の細胞内局在を同定した。

(2) 2種類のタグを融合した BIG3 タンパク質を TNBC 細胞株に発現させ、2段階精製により BIG3 複合体を精製し、プロテオーム解析を行った。また過去の知見から PHB2 と相互作用が報告されている因子に対する抗体を用いて、BIG3 との相互作用を検討した。

(3) BIG3 や(2)で同定した BIG3 相互作用因子の siRNA ノックダウンあるいは stERAP による BIG3-PHB2 解離によるオルガネラの構造・機能への影響を調べ、BIG3-PHB2 複合体の病態生理機能を解析した。

4. 研究成果

項目2、3で記載した3課題について以下のことを明らかにした。

(1) BIG3-PHB2 複合体のミトコンドリア局在の同定

各オルガネラマーカーを用いた TNBC 細胞株 (BT-549, BT-20, HCC1806 細胞) の免疫染色の結果、PHB2 は MitoTracker との共局在が顕著であり、ゴルジ体やリソソームなどの他のオルガネラマーカーとの共局在は認められなかった。したがって、TNBC においては、ER 陽性乳がんとは全く異なり、PHB2 はミトコンドリアに大部分局在することが明らかとなった。また細胞質、ミトコンドリア、核に生化学的に遠心分離し、PHB2 抗体を用いてウエスタン解析を行った結果、複数の TNBC 細胞株で PHB2 のミトコンドリアのみの局在が確認できた。BIG3 は細胞質とミトコンドリアで同程度に局在することがわかった。これらのことから BIG3-PHB2 複合体はミトコンドリアが主局在であることが明らかとなった。

(2) TNBC 細胞株 BT-549 細胞に、FLAG および HA タグを付加した BIG3 組み換えタンパク質を発現させ、2段階アフィニティー精製を行い、高純度の BIG3 複合体を単離し、2DICAL プロテオーム解析 (2-Dimensional Image Converted Analysis of LCMS, Ono M, Int J Proteomics 2012) を行った (国立がんセンター研究所 尾野雅哉博士との共同研究)。その結果、ミトコンドリア内膜に局在するアデニンヌクレオチド交換輸送体 ANT、4つのアイソフォームのうち、ANT2 (がん細胞特異的)、ANT3 (コピキタスに発現) を同定した。293T 細胞を用いた融合タンパク質強制発現系および TNBC 細胞株と ANT2/3 抗体を用いた内在性タンパク質の免疫沈降実験で BIG3 と ANT2/3 の相互作用を確認した。続いて、BIG3, ANT2/3 の部分欠失変異体を作製し、BIG3, ANT2/3 の結合領域を解析したが、明確な結合領域の同定に至らなかったため、BIG3 は、他の相互作用因子を含めた巨大複合体を形成することを推定し、過去の知見で PHB2, ANT と相互作用する因子が BIG3 複合体に含まれる可能性を 2DICAL データから候補を挙げ、各因子の抗体を用いて検証した。その結果、BIG3 免疫沈降物にミトコンドリア内膜に局在する ATP 合成酵素のサブユニットの1つ ATP5A や、ミトコンドリア外膜に存在してミトコンドリア-細胞質間の代謝物質の輸送を担う電位依存性陰イオンチャネル蛋白質である VDAC を同定した。また、BIG3 は少なくともホモダイマー以上の多量体を形成することも判明した。したがって、TNBC では BIG3 は内膜から外膜に縦断的に様々なミトコンドリア因子と巨大複合体を形成していることが示唆された。

(3) TNBC 細胞ではドーナツ様の環状ミトコンドリア形態を保持しているが、BIG3 ノックダウンおよび stERAP 処理にてミトコンドリアの異常伸長が観察された。当初この異常伸長は、ミトコンドリアの融合の促進によるものと考えたが、分裂制御因子 Drp1 をノックダウンして融合を促進してもさらに異常伸長し、融合制御因子 MFN1 をノックダウンして分裂を促進しても伸長したため、融合・分裂とは本質的に異なる作用によって異常伸長することが推察された。そこで、この異常伸長が物理的・力学的な動力で引き起こされている可能性を推定した。チューブリンの免疫染色結果から、ミトコンドリアの伸長方向が、微小管に沿っていることがわかったため、BIG3 相互作用因子のプロテオミクスデータから、細胞骨格制御キネシンの一つに着目し、BIG3 免疫沈降物にこれが共沈していることを見出した。このキネシンの ATPase 活性を特異的に阻害する低分子化合物を用いると stERAP によるミトコンドリア異常伸長が抑制された。これらの結果から、BIG3-PHB2 複合体がキネシンの制御を通じてミトコンドリアと微小管の相互作用を保ち、ミトコンドリア形態を維持することが示唆される。またミトコンドリア外膜側の VDAC と小胞体側の Ca^{2+} チャネルであるイノシトール三リン酸受容体 (IP3R) が相互作用し、ミトコンドリア-小胞体の接触領域 (mitochondria-associated membrane: MAM) を形成し、脂質合成や Ca^{2+} の放出の制御を行っていることに着目し、MAM を生化学的に精製し、BIG3 が MAM 画分に含まれていることを確認した。VDAC は3つのアイソフォームが存在し、VDAC1 および VDAC2 をダブルノックダウンすると stERAP によるミトコンドリアの異常伸長が抑制された。VDAC 抗体と IP3R 抗体を用いた免疫染色から、stERAP によってミトコンドリアと小胞体の接触部位が減少することも判明した。これらの結果から、ミトコンドリア形態の制御に MAM の関与が示唆された。MAM における VDAC および BIG3 がミトコンドリア構造を調節する分子メカニズムの解明は今後の課題である。さらに、stERAP によって、これまでに同定した BIG3 複合体構成因子が一斉に解離し、同時に細胞増殖抑制効果が認められた。

以上の結果から、TNBC では BIG3 は内膜から外膜に縦断的・広範囲に様々なミトコンドリア因子と巨大複合体を形成し、ミトコンドリアの構造・機能の安定維持に必須であることが強く示唆された。BIG3-PHB2 相互作用阻害ペプチドによって BIG3 から他の相互作用因子も解離し、細胞増殖が抑制されることから、BIG3-PHB2 を中心としたミトコンドリア複合体ネットワークが TNBC の脆弱性であり、TNBC 治療戦略の新たな標的となりうる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shunichi Toki, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Hitoshi Aihara, Masaya Ono, Koichi Tsuneyama, Koichi Sairyo, Toyomasa Katagiri	4. 巻 112
2. 論文標題 The survival and proliferation of osteosarcoma cells are dependent on the mitochondrial BIG3-PHB2 complex formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4208-4219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相原仁 吉丸哲郎 片桐豊雅
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌細胞においてBIG3-PHB2複合体は癌病態ミトコンドリアを安定制御する
3. 学会等名 第25回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原仁、吉丸哲郎、尾野雅哉、笹三徳、三好康雄、片桐豊雅
2. 発表標題 Exploiting vulnerabilities of triple negative breast cancer by targeting the mitochondrial BIG3-PHB2 large complex
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相原仁、吉丸哲郎、尾野雅哉、笹三徳、三好康雄、片桐豊雅
2. 発表標題 Exploiting cancer-associated vulnerabilities of mitochondrial BIG3-PHB2 axis in clinical therapeutics for triple negative breast cancer
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitoshi Aihara, Tetsuro Yoshimaru, Masaya Ono, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Mitochondrial BIG3-PHB2 complex in triple negative breast cancer cells: A potential target for clinical treatment
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相原仁、吉丸哲郎、尾野雅哉、笹三徳、三好康雄、片桐豊雅
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌細胞のミトコンドリア構造・機能制御におけるBIG3-PHB2複合体の病態生理的役割と創薬開発
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Aihara, Tetsuro Yoshimaru, Masaya Ono, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 BIG3-PHB2 complex integrate pathophysiological structure and function of mitochondria in triple negative breast cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Aihara, Tetsuro Yoshimaru, Masaya Ono, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Critical roles of BIG3 in mitochondrial regulation of triple negative breast cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------