

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18030

研究課題名（和文）CUL3型ユビキチンE3複合体による新規増殖シグナル制御の解明と乳癌治療への応用

研究課題名（英文）Application of the CUL3-dependent cell growth system to breast cancer therapy

研究代表者

西山 加那子（Nishiyama, Kanako）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50763348

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）：CUL3はCullin-RING型ユビキチン（Ub）リガーゼ複合体の足場タンパク質であり、KCTD10と複合体を形成し、RhoBをUb化しタンパク質分解に導く。CUL3/KCTD10によるRhoBのタンパク質分解はHER2陽性乳癌細胞の細胞増殖に必須であり、この研究ではその詳細な細胞増殖機構を分子レベルで解明した。コムギ無細胞タンパク質合成系により整備されたヒトプロテインアレイの中から、RhoBにより制御される足場タンパク質CNKSR1とEGFR phosphataseであるPTPRHの同定に成功し、HER2陽性乳癌における新規分子標的薬の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌のうち約20%はHER2陽性乳癌であり、HER2陽性乳癌は一般的に増殖能が高く予後不良である。抗HER2薬の開発によりその予後は改善しているが、長期使用に伴う薬剤の耐性化などは未だ問題となっている。我々の研究において、HER2陽性乳癌における新規な増殖メカニズムを分子レベルで解明した。これらの分子を標的とした薬剤は、HER2陽性乳癌におけるHER2以外を標的とした新しい治療戦略となり得る。

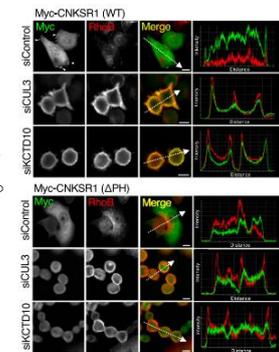
研究成果の概要（英文）：CUL3 is a scaffold protein of the Cullin-RING type ubiquitin (Ub) ligase complex, which forms a complex with KCTD10 and leads to ubiquitination and proteolysis of RhoB. In this study, the detailed mechanism of cell proliferation was elucidated at the molecular level. Using human protein arrays prepared by wheat cell-free protein synthesis system, we succeeded in identifying CNKSR1, a scaffold protein regulated by RhoB, and PTPRH, an EGFR phosphatase. We identified the potential of novel molecular targeted drugs in HER2-positive breast cancer.

研究分野：乳癌外科

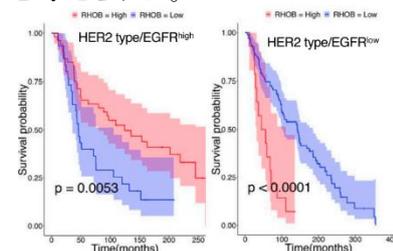
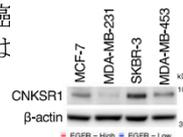
キーワード：HER2 EGFR CNKSR1 PTPRH phosphatase protein array



(3) SKBR3 細胞における RhoB-GTP と CNKSR1 の相互作用を検証した。CNKSR1 を過剰発現した SKBR3 細胞において、CNKSR1 は細胞質と細胞のラッフル膜に存在していた。CUL3/KCTD10 を発現抑制し RhoB-GTP を蓄積すると、RhoB-GTP と CNKSR1 は細胞膜で共局在した。対照的に、PH ドメイン欠損または W493A 変異体の CNKSR1 を過剰発現した SKBR3 においては、CNKSR1 は細胞質に局在し、RhoB-GTP との共局在が減少した。これらのデータから、CUL3/KCTD10 を発現抑制すると、CNKSR1 は PH ドメイン依存的に RhoB-GTP と相互作用することが示唆された。CNKSR1 を SKBR3 で発現抑制すると、EGFR/HER2 のリン酸化が低下し、細胞増殖も著明に阻害された。EGFR/HER2 シグナル伝達の下流にある Akt のリン酸化や、別の HER ファミリーである HER3 のリン酸化も、CUL3/KCTD10 発現抑制時と同様に、CNKSR1 の発現抑制により低下することを確認した。

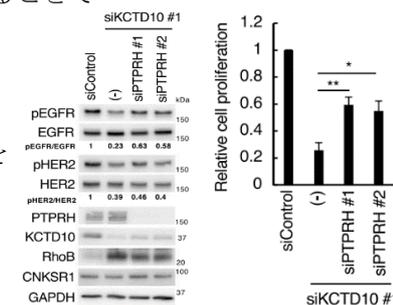
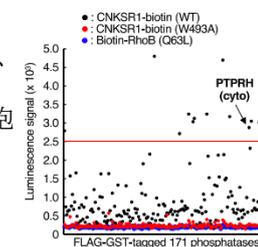


(4) 様々な乳癌細胞株における CNKSR1 の発現を調べた。CNKSR1 は HER2 陽性乳癌細胞株 SKBR3 で高発現しており、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453 細胞で発現は低かった。EGFR/HER2 のリン酸化についても、SKBR3 以外の細胞株では EGFR/HER2 のリン酸化を認めなかった。これらのデータから RhoB/CNKSR1 軸が EGFR/HER2 double positive な乳癌細胞の増殖に関与していると考えられた。RhoB の発現レベルとヒト HER2/EGFR 陽性乳癌の予後との相関を METABRIC 解析にて行った。EGFR 高発現/HER2 陽性乳癌患者において、RhoB の低 mRNA 発現は予後不良と有意に相関していたのに対し、EGFR 低発現/HER2 陽性乳癌患者では RhoB の高 mRNA 発現が予後不良と有意に相関していた。これらのデータから、RhoB が EGFR/HER2 double positive な乳癌の腫瘍抑制因子として機能する可能性があることが示唆された。



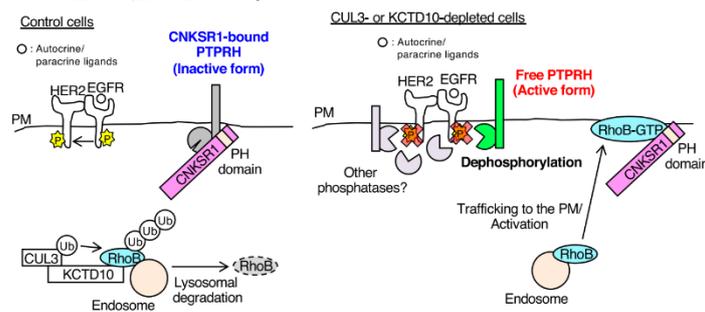
HER2 陽性のヒト乳癌組織における CNKSR1 のタンパク発現を調べたところ、CNKSR1 は HER2 陽性乳癌組織の 80% で高発現していた。また、転移再発を伴う HER2 陽性乳癌の原発巣は全て CNKSR1 陽性であった。これらのデータは、CNKSR1 の高発現が、HER2 陽性乳癌の細胞増殖シグナル伝達を増強することを示唆している。

(5) CNKSR1 は PH ドメイン依存的に EGFR/HER2 のリン酸化を増強する機能を有しており、RhoB-GTP が蓄積するとその機能が失われることから、RhoB-GTP と CNKSR1 に相互排他的に結合する EGFR/HER2 phosphatase が存在すると推測した。この phosphatase を同定するために、コムギ無細胞タンパク質合成系によって合成された 171 個の FLAG-GST タグ付きヒト phosphatase array を調製し、ビオチン化 CNKSR1 (WT, W493A mutant) をベイトタンパクとして結合を評価した。アルファスクリーンにより 15 個の phosphatase を同定し、個々の siRNA を用いて発現抑制することでリン酸化の回復を評価した。15 個の phosphatase のうち、PTPRH の発現抑制が最も EGFR のリン酸化を回復することを発見した。また、PTPRH の発現抑制によって、KCTD10 を発現抑制した SKBR3 細胞の細胞増殖阻害を部分的に回復した。一方で、CNKSR1 の発現抑制は HER2 のリン酸化レベルの低下を回復せず、HER2 リン酸化における phosphatase の冗長性を示唆している。



また、アルファスクリーンにおいて CNKSR1 の W493A 変異体と PTPRH はシグナルを認めず、CNKSR1 の Trp<sup>493</sup> が PTPRH と RhoB-GTP との相互作用に関与していることが確認された。

これらの全てのデータから、CUL3/KCTD10 E3 複合体による RhoB の分解により、CNKSR1 が PTPRH と相互作用しており、PTPRH の EGFR phosphatase 活性が低下していると結論づけた。CUL3/KCTD10 を発現抑制する事で RhoB-GTP が細胞膜で CNKSR1 と相互作用し、PTPRH が放出および活性化され、EGFR の脱リン酸化をもたらしている。今後、CNKSR1 と PTPRH の阻害剤の開発は、HER2 陽性乳癌の新規治療薬となる可能性がある。



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 Nishiyama Kanako, Maekawa Masashi, Nakagita Tomoya, Nakayama Jun, Kiyoi Takeshi, Chosei Mami, Murakami Akari, Kamei Yoshiaki, Takeda Hiroyuki, Takada Yasutsugu, Higashiyama Shigeki	4. 巻 4
2. 論文標題 CNKSR1 serves as a scaffold to activate an EGFR phosphatase via exclusive interaction with RhoB-GTP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101095	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西山加那子
2. 発表標題 HER2陽性乳癌細胞におけるsmall GTPase RhoBの機能解析
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山加那子
2. 発表標題 HER2陽性乳癌細胞株における恒常的なRhoBタンパク質分解の生理機能の解析
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanako Nishiyama
2. 発表標題 A novel mechanism of phosphatase activation for EGFR by Cullin-3/KCTD10 ubiquitin E3 complex in HER2-positive breast cancer cells
3. 学会等名 2021 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山加那子
2. 発表標題 A novel mechanism of phosphatase activation for EGFR in HER2-positive breast cancer cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------