

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23896

研究課題名（和文）エストロゲン受容体陽性乳がんにおける栄養ストレス適応分子機序の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of adaptation to nutrient stress in ER-positive breast cancer

研究代表者

齊藤 康弘（SAITO, Yasuhiro）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任講師

研究者番号：30613004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：栄養ストレス下にあるER陽性乳がん細胞の増殖においてLLGL2-SLC7A5経路が重要であることを明らかにしてきた。本研究では栄養ストレス下でLLGL2-SLC7A5経路が活性化される分子機序の解明を試みた。LLGL2には複数のリン酸化部位が存在することから、栄養ストレス下におけるLLGL2のリン酸化状態を調べたが、LLGL2のリン酸化状態に変化は認められなかった。次にLLGL2と相互作用する分子が栄養ストレスに重要であると想定し、栄養ストレス下で変化するLLGL2相互作用分子の探索を行った。現在では候補分子による栄養ストレス下でのLLGL2活性化の分子機序の解明を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LLGL2-SLC7A5経路における、LLGL2の活性化分子機序の一端を明らかにすることはER陽性乳がん細胞、そして、抗がん剤が効かなくなった乳がん細胞に対する新しい治療法・治療薬の開発に大きく貢献すると考えられる。よって、本研究により得られた知見はLLGL2-SLC7A5経路を標的としたER陽性乳がん細胞の新規治療法・新規治療薬の開発に役立つと考えられることから、社会に貢献できる知見であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：LLGL2-SLC7A5 pathway plays a critical role for ER+ breast cancer cells to proliferate under nutrient stress condition. Since the association between LLGL2-SLC7A5 is enhanced by nutrient stress, this study aims to understand how LLGL2-SLC7A5 interaction is enhanced by nutrient stress. LLGL2 is phosphorylated at several amino acid residues, and the phosphorylation of LLGL2 affects the intracellular localization of LLGL2. Therefore, based on the hypothesis that phosphorylation of LLGL2 could change the affinity to SLC7A5, we examined the phosphorylation status of LLGL2 with stimulation by nutrient stress. However, we could not detect a drastic change in the phosphorylation level of LLGL2 in ER+ breast cancer cells. Next, we explored LLGL2-binding proteins that are activated by nutrient stress. We identified a candidate molecule that responds to nutrient stress.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん アミノ酸トランスポーター 細胞極性タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんは罹患率ならびに死亡率の非常に高い乳がんである。乳がんは特徴的な遺伝子発現によりホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がん、がん遺伝子 HER2 陽性乳がん、そして、basal 型乳がんの 3 つに大きく分類される。乳がんの 80% 近くを占めるエストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんでは ER を標的としたホルモン療法が治療の過程において適用される。ER を直接阻害するタモキシフェンはホルモン療法に用いられる有効な薬剤の一つであるが、他の抗がん剤と同様に一部の ER 陽性乳がん患者ではタモキシフェンに対する薬剤耐性が認められる。したがって、ER 陽性乳がん細胞、さらには、タモキシフェン耐性を獲得した乳がんに対する新規治療法や新規治療薬の開発が期待されている。

我々は細胞極性タンパク質の一つである LLGL2 の乳がん細胞における解析により、LLGL2 は ER 陽性乳がん細胞において細胞増殖を亢進すること、そして、LLGL2 がアミノ酸トランスポーター SLC7A5 と相互作用することが LLGL2 による細胞増殖の亢進に重要であることを明らかにした。詳細な解析により、LLGL2 は SLC7A5 の細胞表面への局在を促進する結果、細胞内へのロイシン取り込みを促進し、細胞増殖を亢進することが明らかとなった。

がん細胞は栄養が限られた栄養ストレス下においても増殖することから、がん細胞は栄養ストレスに適応する分子機構を有していることが推察される。LLGL2-SLC7A5 依存的な細胞増殖の亢進は栄養ストレス下で認められ、LLGL2-SLC7A5 相互作用もまた栄養ストレス下で増強されることから、栄養ストレスに対して適応する分子機構の一端として、LLGL2 は機能していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではがん細胞の栄養ストレス適応の分子機構を解明することをねらい、栄養ストレス依存的に LLGL2-SLC7A5 相互作用が増強される分子機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では ER 陽性乳がんにおける栄養ストレス依存的に LLGL2 が活性化されると仮説し、栄養ストレスに応答する分子の細胞レベルでの解析を分子生物学的・生化学的手法を駆使し、網羅的に実験を行った。

4. 研究成果

タンパク質リン酸化のデータベース検索により LLGL2 は複数のアミノ酸残基でリン酸化される可能性が示唆された。データベース上で登録されている LLGL2 のリン酸化を検出する抗体が存在しないことから、本研究ではアミノ酸残基非依存的にリン酸化を検出することができる Phostag により、LLGL2 のリン酸化の検出を行った。しかしながら、栄養ストレスによる LLGL2 のリン酸化状態の変化を明確に確認することができなかった。

そこで、研究アプローチを変更し、LLGL2-SLC7A5 相互作用は他の分子によって安定化されると仮定し、栄養ストレスによって未知分子が LLGL2-SLC7A5 複合体へリクルートされる結果、栄養ストレス下で LLGL2-SLC7A5 相互作用が増強されると予想した。よって、LLGL2 と相互作用する分子の中で栄養ストレスと関連する分子の同定を試みた。

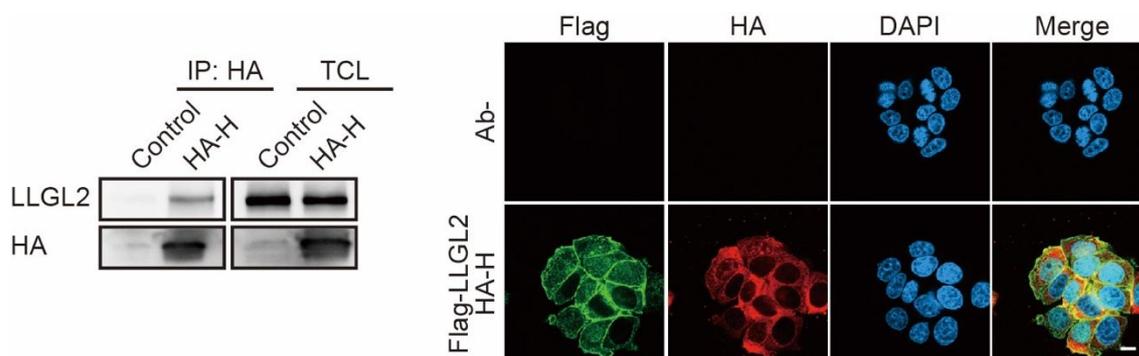
BioID という手法により我々は ER 陽性乳がん細胞における LLGL2 と相互作用する分子の網羅的同定を行い、LLGL2-SLC7A5 相互作用を同定している。そこで、我々は得られていたデータをもとに文献的な検索を行った結果、H タンパク質 (仮名) が LLGL2-SLC7A5 相互作用に関与する分子として候補に挙げられた。H タンパク質はリン酸化依存的に多量体を形成し、結合するタンパク質の安定化に関与することが知られている。

まず、LLGL2 と H タンパク質の相互作用を確認するため、ER 陽性乳がん細胞 MCF-7 細胞に HA タグ H タンパク質を発現させ、抗 HA 抗体による免疫沈降を行ったところ、LLGL2 と H タンパク質の相互作用が認められた (図 1 左)。また、MCF-7 細胞に Flag タグ LLGL2 と HA タグ H タンパク質を発現させ、抗 Flag 抗体と抗 HA 抗体による蛍光免疫染色を行い、LLGL2 と H タンパク質の細胞内局在を観察したところ、細胞膜、ならびに、細胞質において LLGL2 と H タンパク質の共局在が認められた (図 1 右)。これらの結果から、ER 陽性乳がん細胞において LLGL2 と H タンパク質は細胞膜、細胞質のどちらにおいても相互作用していることが確認された。

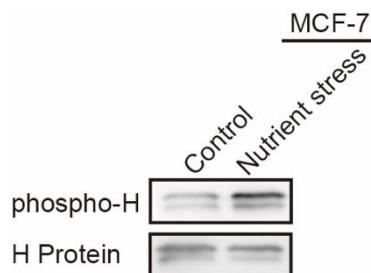
次に、栄養ストレスと H タンパク質の関連を調べるため、栄養ストレスを加えた場合の H タンパク質のリン酸化状態を検討した。ER 陽性乳がん細胞において栄養ストレスを加えると H タンパク質のリン酸化が著しく上昇することが示唆された (図 2)。H タンパク質はリン酸化されることにより多量体化し、タンパク質の安定性等に寄与することが報告されている。したがって、栄養ストレス依存的な LLGL2-SLC7A5 複合体の形成において H タンパク質が関与している可能性が示唆された。

栄養ストレスにおいてどの栄養の制限が LLGL2-SLC7A5 相互作用を増強するのかは不明であった。そこで、栄養ストレスにおける重要な栄養素がアミノ酸であることを調べるため、アミノ酸刺激を ER 陽性乳がん細胞に加え、H タンパク質のリン酸化状態を検討した。興味深いことにアミノ酸刺激を加えると H タンパク質のリン酸化が上昇することが示唆された（図 3）。この結果はアミノ酸刺激により H タンパク質のリン酸化が低下するという予想に反するものであったが、これまでに H タンパク質のリン酸化がアミノ酸によって変化するという報告はなかったことから、学術的に非常に興味深い結果が得られたと考えられる。

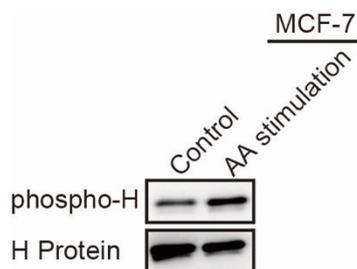
以上の結果から、栄養ストレスによって LLGL2-SLC7A5 相互作用を増強する可能性のある分子 H タンパク質を同定することに成功しており、今後は栄養ストレスによる H タンパク質の多量体形成が LLGL2-SLC7A5 相互作用に直接作用するかを検討することを予定している。加えて、アミノ酸刺激による H タンパク質のリン酸化の上昇がどのような生物学的役割を有しているのかは不明であることから、今後はアミノ酸シグナルにおける H タンパク質の役割も検討していく予定である。最後に、LLGL2-SLC7A5 相互作用を増強する栄養ストレスにおいてどの栄養素が重要なのかは未だ不明であることから、H タンパク質のリン酸化を一つの指標としてその栄養素の探索も行っていくことも検討している。



（図 1）ER 陽性乳がん細胞において H タンパク質は LLGL2 と相互作用する免疫沈降による LLGL2 と H タンパク質の相互作用の検出（左）。蛍光免疫染色による LLGL2 と H タンパク質の乳がん細胞における共局在（右）。Ab-; 一次抗体なし。スケールバー; 10 μm



（図 2）ER 陽性乳がん細胞において栄養ストレス H タンパク質のリン酸化を上昇させる



（図 3）ER 陽性乳がん細胞においてアミノ酸刺激は H タンパク質のリン酸化を上昇させる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 エストロゲン受容体陽性乳がんにおいて細胞極性タンパク質LLGL2はロイシンの取り込みを制御する
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤康弘、Senthil K. Muthuswamy
2. 発表標題 乳がん細胞におけるアミノ酸の新たな機能的役割の解明
3. 学会等名 核酸代謝鶴岡カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 Novel biological functions of amino acid transporter in ER+ breast cancer
3. 学会等名 第一回反分野的生物医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 エストロゲン受容体陽性乳がん細胞における細胞極性タンパク質によるアミノ酸制御
3. 学会等名 第3回がん代謝研究会・若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 エストロゲン受容体陽性乳がん細胞において細胞極性タンパク質LLGL2はロイシン取り込みを制御する
3. 学会等名 第1回癌学会・若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 乳がん細胞において細胞極性タンパク質 LLGL2 はアミノ酸の取り込みを制御する
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 ER陽性乳がん細胞において細胞極性タンパク質LLGL2はロイシン依存的細胞増殖の重要分子である
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 ER陽性乳がんにおけるロイシン取り込みとその治療標的としての可能性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤康弘
2. 発表標題 アミノ酸を標的とした乳がん治療を目指して
3. 学会等名 第2回日本質量分析学会東北談話会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------