

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08958

研究課題名(和文) HER2陽性乳癌の薬剤耐性獲得における乳癌特異的分子BIG3の病態生理学的意義

研究課題名(英文) BIG3-PHB2 complexes is required for the acquired trastuzumab-resistance of HER2-positive breast cancer

研究代表者

吉丸 哲郎 (YOSHIMARU, Tetsuro)

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：80424729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん特異的足場タンパク質BIG3による腫瘍抑制因子PHB2の抑制機能制御が、難治性のトラスツズマブ耐性獲得したHER2陽性乳がんの病態に寄与することを明らかにし、トラスツズマブ耐性細胞におけるBIG3-PHB2複合体が、感受性細胞とまったく異なり、細胞膜直下に局在し、トラスツズマブ耐性獲得に関与するHER2-EGFR二量体形成に寄与する可能性を示した。さらに、BIG3とPHB2の結合阻害は、BIG3を細胞膜から解離させてHER2-EGFR二量体形成の阻害を導き、トラスツズマブ耐性獲得に大きく関与することを示唆させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BIG3-PHB2複合体が乳がんをはじめとするがん細胞に特異的に発現していることに起因しており、BIG3-PHB2複合体の標的ペプチドstERAPは正常組織にダメージを与えることなく、がん組織特異的に作用できるため、重篤な副作用を回避できる。さらに、このペプチドは長期持続薬効を示すことから、繰り返し再発や転移による治療困難な難治性乳がん患者に対する長期的に有効な治療法となり、身体的負担の軽減によるインパクトなど多大な社会的貢献は大きい。

研究成果の概要(英文)：Anti-HER2 antibody, trastuzumab, has greatly improved outcomes of patients with HER2-positive breast cancer, but the resistance acquisition remains a severe problem. We previously demonstrated that a cancer-specific scaffold protein BIG3 plays critical roles for HER2-signaling activation by inactivating tumor-suppressor prohibitin 2 (PHB2). Here we report the physiological significance of the BIG3-PHB2 complex in acquired trastuzumab-resistant breast cancers. Notably, BIG3-PHB2 complexes are transported to the plasma membrane from the trans-Golgi network of trastuzumab-resistant cells, contributing to the HER2-EGFR formation involved in trastuzumab-resistance. More importantly, treatment with peptide inhibitor targeting the BIG3-PHB2 interaction led to the remarkable inhibition of HER2-EGFR hetero dimerization, resulting in suppression of trastuzumab-resistant cell proliferation. These findings suggest that the BIG3-PHB2 complex is pivotal in acquiring trastuzumab-resistance.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：HER2陽性乳がん BIG3-PHB2複合体 トラスツズマブ耐性 ペプチド創薬 ステアブル化ペプチド がん抑制因子

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんの治療は効果予測に基づく薬物選択が最も重要になってくる。がん遺伝子 HER2 が増幅している HER2 陽性乳がんは、乳がん全体の約 20%を占め、高い増殖能と転移能を有した予後不良の腫瘍であるが、HER2 の機能を阻害する抗 HER2 抗体トラスツズマブが第一選択薬として臨床応用され、患者の延命・治癒に大きく貢献してきた。一方、トラスツズマブに対する耐性や不応性による再発症例も多く存在していることが問題となっていた。この克服のために、HER2 標的薬ラパチニブ、ペルツズマブや抗体薬物複合体エムタンシンが新たに開発され、臨床応用されている。しかしながら、これら HER2 標的薬に対しても HER2 シグナルのみを抑えることによる獲得耐性は依然大きな問題であり、詳細な耐性獲得の分子機構に基づいた新たな治療薬の開発が必要になる。

### 2. 研究の目的

われわれは HER2 シグナルだけではなく多岐に渡るがん関連シグナル、特に耐性獲得関連シグナルに対しても抑制機能を有する腫瘍抑制因子 Prohibitin 2 (PHB2) に着目し、PHB2 の有する抑制活性を利用した治療薬の開発を進めている。しかしながら、PHB2 は体細胞変異を認めないにも関わらず、がんにおいて抑制機能が不活化していることが不明であった。われわれは、所属する研究室にて同定されていたがん特異的なタンパク質 BIG3 (Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3) による「PHB2 の抑制機能を喪失する機構」を新たに発見し、BIG3 は PKA および PP1C と複合体を形成して、細胞質にて足場タンパク質 AKAP (A-kinase anchoring protein) として機能し、PP1C の基質として PHB2 が BIG3 に結合することで、その抑制活性に重要なセリン・リン酸基を加水分解して抑制機能を喪失させていた。また、BIG3 は PHB2 の核内や細胞膜への移動を制限することで、乳がん病態に寄与することを明らかにしている。

一方で、がん細胞での PHB2 の元来有する多岐にわたる抑制機能を利用することを目的として、BIG3-PHB2 相互作用阻害ペプチド「stapled-ERAP (stERAP)」を開発した。その結果、エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がん細胞への stERAP の投与は、BIG3 から PHB2 を解離させ、その抑制機能が再活性化し、PHB2 の核内移行による ER 転写抑制をはじめ、乳がん関連シグナル・カスケード、特に治療耐性獲得に関連する膜型 ER を介したシグナル経路やエストロゲンと増殖因子によるクロストーク・シグナル経路、および治療薬タモキシフェン耐性細胞株の増殖を一度に抑制できることがわかった。

本研究では、トラスツズマブ耐性を獲得した難治性の HER2 陽性乳がんにおいて BIG3 高発現症例が予後不良であることに着目して、stERAP を用いて、HER2 陽性乳がん細胞のトラスツズマブ耐性獲得における BIG3-PHB2 複合体の機能と役割を明らかにし、BIG3 による PHB2 抑制活性の制御およびシグナル増強がトラスツズマブ耐性獲得に必須であること、一方、stERAP が PHB2 の腫瘍抑制活性を効果的に誘導できる、これまでにない治療戦略であることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) BIG3の局在

BIG3の局在は、HER2陽性乳がん細胞株SK-BR-3および抗HER2抗体トラスツズマブに対する耐性獲得細胞株から細胞膜画分とサイトゾル画分を単離キットにより精製し、BIG3の局在をwestern blottingにより検討した。なお、細胞膜画分とサイトゾル画分は、市販のMembrane Protein Extraction kitを用いて単離した。

#### (2) ウェスタンブロット解析

細胞を 0.1% protease inhibitor cocktail を含む溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl: pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5% CHAPS) で溶解した。細胞溶解物を電気泳動したあと、ニトロセルロース・メンブレンにブロットし、4% BlockAce solution でブロッキングした。3 時間後にメンブレンを各抗体の存在下で 12 時間インキュベートし、蛍光二次抗体を 1 時間インキュベートしたあと、蛍光測定装置 (Odyssey Fc Imaging System) でメンブレンをスキャンした。

#### (3) 細胞増殖アッセイ

Cell-Counting Kit-8 を用いて細胞増殖アッセイを行った。細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well で 48 ウェルプレートにプレートし、5% CO<sub>2</sub> 存在下 (37 °C) のインキュベーターで維持した。24 hr 後に上清を除去したあと、10 倍希釈した CCK-8 溶液を添加して 30 分間インキュベートし、450 nm の吸光度を測定した。

#### (4) *in vivo*腫瘍増殖阻害

SK-BR-3 cells およびトラスツズマブ耐性 SK-BR-3 cells ( $1 \times 10^7$  cells/mouse) を等量のマトリゲルと混合し、5 週齢メス BALB/c ノードマウスの乳腺に移植した。マウスは、12 時間明期

/12時間暗期のサイクルで無菌の隔離施設で飼育し、げっ歯類飼料と水を自由給餌した。腫瘍は、約 100 mm<sup>3</sup> (1/2 × (幅 × 長さ<sup>2</sup>) として算出) のサイズに達するまで 1 週間にわたって発育させたあと、各実験群 (5 個体/群) に無作為に分けた。

stERAP 処理は 7 日毎に尾静脈注射により投与し、腫瘍体積は 4 日毎に 4 週間にわたって測定した。すべての試験は徳島大学の動物施設の指針に従った。

#### 4. 研究成果

##### (1) BIG3の局在

TCGA 公共データセットによると、BIG3 は HER2 陽性乳がん患者の腫瘍部位でも強く発現していること、特に、再発患者で強く発現していること、BIG3 の発現強度と無再発生存期間には有意な相関関係が存在することが明らかになっている。さらに、BIG3 の局在を詳細に解析したところ、HER2 陽性乳がんでは BIG3-PHB2 複合体の細胞内局在が、抗 HER2 抗体薬トラスツズマブの感受性細胞 (トランスゴルジ網: TGN) と難治性のトラスツズマブ耐性細胞 (細胞膜) で異なることを見出し (図 1) BIG3-PHB2 複合体の TGN-細胞膜移行の分子メカニズムの解明が HER2 陽性乳がん、特にトラスツズマブ療法耐性の克服に繋がると考えられた。

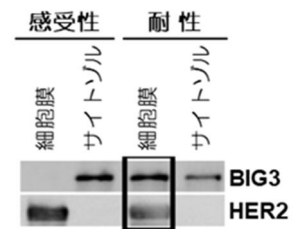
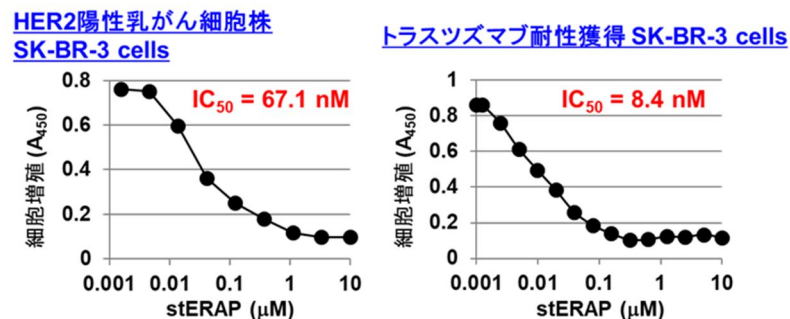


図1 BIG3の局在

##### (2) BIG3とPHB2の結合阻害がHER2陽性乳細胞株の増殖に対する抑制効果

HER2 陽性乳がん細胞株における stERAP の増殖抑制効果について検討した。その結果、stERAP は HER2 陽性乳がん細胞株 SK-BR-3 cells の増殖に対して容量依存的な抑制効果を認め、その IC<sub>50</sub> (50%阻害濃度) は 67.1 nM であった (図 2)。さらに、stERAP は感受性細胞株と遜色なくトラスツズマブ耐性獲得 SK-BR-3 cells の増殖も顕著に抑制することを示し (図 2) BIG3-PHB2 複合体が HER2 陽性乳がんの悪性化に大きく寄与していること、および HER2 陽性乳がんでも重要な分子標的になり得ることを示唆していた。

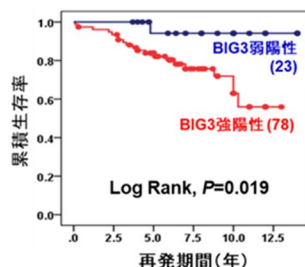
図2 BIG3とPHB2の結合阻害がHER2陽性乳細胞株の増殖に対する抑制効果



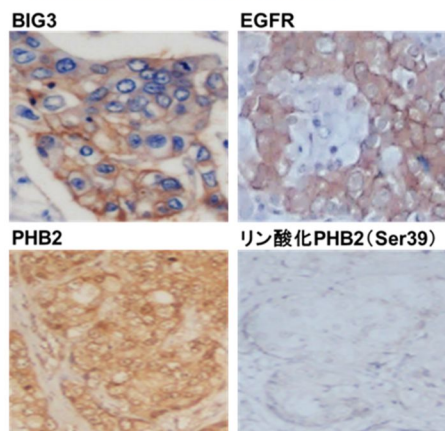
##### (3) 乳がん臨床検体を用いたBIG3の免疫組織染色

前述したように、トラスツズマブ耐性細胞株の BIG3 -PHB2 複合体は細胞膜に局在することを見出し (図 1) 細胞内局在の変化が耐性獲得メカニズムの解明に大きくつながると考えられる。さらに、耐性細胞株は、感受性細胞株と比べて EGFR が高発現していることが明らかで、TCGA のデータセットによると、BIG3 と EGFR の共発現は無再発生存期間と有意な相関関係にあり、予後不良であった。そこで、101 症例の HER2 陽性乳がん患者の切除標本を用いて BIG3 の免疫組織染色を行ったところ、BIG3 の発現強度と無再発生存期間は有意に相関し、再発症例は BIG3 が強く発現していることを明らかにした (図 3)。また、再発症例の BIG3 は細胞膜での局在を示し、EGFR と共発現していることを確認した (図 3)。

図3 HER2陽性乳がんの臨床検体を用いたBIG3の免疫組織染色



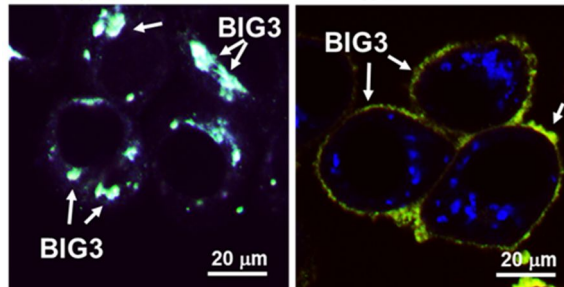
HER2陽性乳がんの再発症例 (ID: 1108-11-1、再発年数: 3.1年)



( 4 ) EGFRの過剰発現によるBIG3の細胞膜移行

耐性細胞株はEGFRが高発現していることから、トラスツズマブ感受性SK-BR-3 cellsにEGFRを強制的に過剰発現させたときのBIG3の挙動を検討した。その結果、BIG3-PHB2複合体の局在はトランスゴルジ網から細胞膜に劇的に変化することを明らかにした(図4)。一方、キナーゼドメインを欠損させたEGFRを過剰発現した場合、BIG3の細胞膜への移行はまったく観察されなかったことから、EGFRのキナーゼ活性がBIG3-PHB2複合体のトランスゴルジ網から細胞膜への移行に関与していると考えられた。

図4 EGFRの過剰発現によるBIG3の細胞膜移行  
感受性細胞株にEGFRを過剰発現させると、BIG3の局在がトランスゴルジ網から細胞膜へ移行する  
BIG3(緑色)、TGN46(TGNマーカー、青色)



HER2陽性乳がん細胞株 EGFRの過剰発現

( 5 ) HER2-EGFRヘテロダイマー安定化へのBIG3-PHB2複合体の関与

トラスツズマブ存在下でEGFRを過剰発現させると、細胞膜でHER2とヘテロダイマーを形成するタイミングで、HER2のリン酸化が再活性化され、BIG3の付加でそのリン酸化の亢進とEGFR結合の増加を認めた。これらの事実は、BIG3-PHB2複合体がHER2-EGFRヘテロダイマーの安定化に寄与し、トラスツズマブ耐性を誘導している可能性を示唆するものである。実際に、トラスツズマブ耐性SK-BR-3 cellsへのstERAPの投与は、BIG3を細胞膜から解離させ、細胞膜に留まったPHB2のリン酸化を誘導することで、HER2とEGFRおよびHER2とHER3のヘテロダイマー形成がほぼ完全に阻害されると同時に、HER2とEGFRの各リン酸化が顕著に抑制された(図5)。

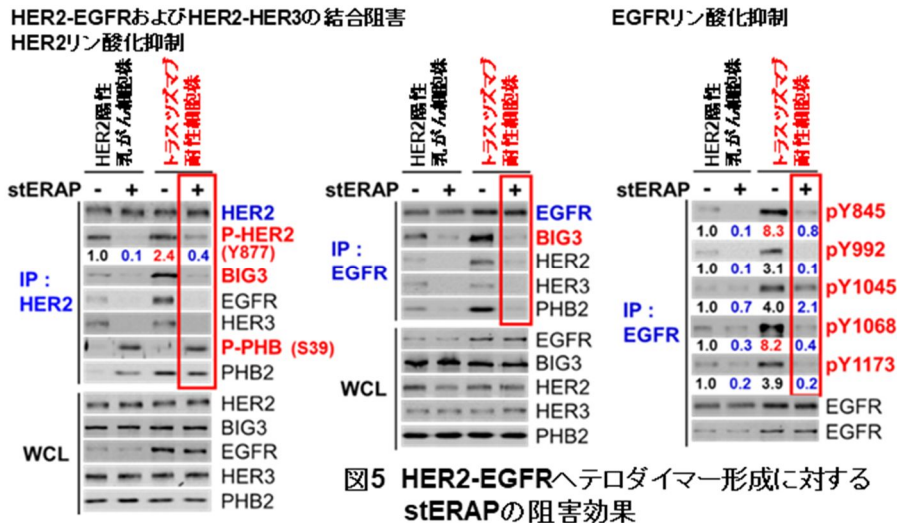
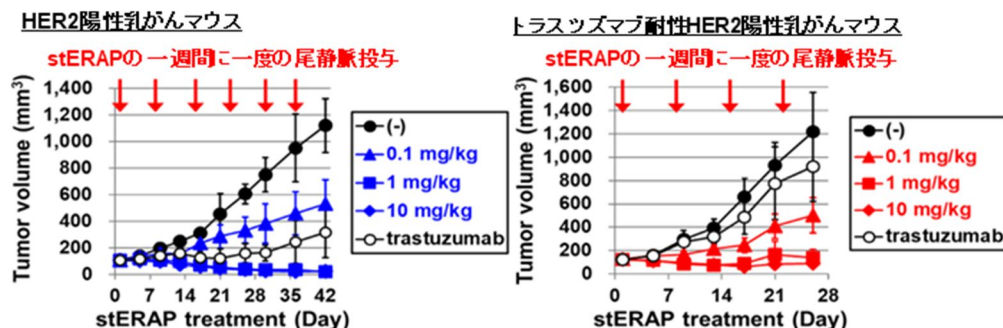


図5 HER2-EGFRヘテロダイマー形成に対するstERAPの阻害効果

( 6 ) stERAPの抗腫瘍効果

stERAPの抗腫瘍効果を検討した。その結果、stERAPは週一回の尾静脈投与でもトラスツズマブ感受性およびトラスツズマブ耐性の同所性移植マウスの腫瘍増殖をほぼ完全に抑制することを認め(図6)、マウス体重の変化はほとんど観察されなかった。

図6 stERAPの抗腫瘍効果



(7)まとめ

トラスツズマブ耐性の HER2 陽性乳がんでは、BIG3 が細胞膜に存在し、EGFR と HER2 のヘテロダイマーを強く会合させる足場タンパク質として機能し、トラスツズマブに対する耐性獲得に大きく関与していると考えられた。一方、stERAP 処理は PHB2 から BIG3 を解離させ、PHB2 の抑制活性を再活性化させることで、各ヘテロダイマーの崩壊を促進し、その結果、長期にわたる効果的な抗腫瘍活性を有する標的治療薬になる可能性を示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshimaru Tetsuro, Nakamura Yusuke, Katagiri Toyomasa	4. 巻 66
2. 論文標題 Functional genomics for breast cancer drug target discovery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 927 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00962-6	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 -

1. 著者名 Toki Shunichi, Yoshimaru Tetsuro, Matsushita Yosuke, Aihara Hitoshi, Ono Masaya, Tsuneyama Koichi, Sairyō Koichi, Katagiri Toyomasa	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshimaru T., Matsushita Y., Kosako H., Sasa M., Miyoshi Y., Katagiri T.
2. 発表標題 The plasma membrane BIG3-PHB2 complex contributes to the acquisition of trastuzumab-resistance in HER2-positive breast cancer.
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉丸哲郎、松下洋輔、笹三徳、三好康雄、片桐豊雅
2. 発表標題 胞膜BIG3-PHB2複合体がHER2陽性乳癌のトラスツズマブ耐性獲得に必須である
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉丸哲郎、松下洋輔、片桐豊雅
2. 発表標題 トラスツズマブ耐性HER2陽性乳がんの克服に向けたBIG3-PHB2相互作用を標的とした持続型阻害ペプチドの開発
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉丸 哲郎, 松下 洋輔, 笹 三徳, 三好 康雄, 片桐 豊雅
2. 発表標題 HER2陽性乳癌のトラスツズマブ耐性獲得に対するBIG3-PHB2複合体の病態生理学的役割
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 吉丸 哲郎, 松下 洋輔, 片桐 豊雅
2. 発表標題 トラスツズマブ耐性HER2陽性乳がんに対するBIG3-PHB2相互作用の標的治療薬としての可能性
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 Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Sasa Mitsunori, Miyoshi Yasuo and Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 BIG3 phosphatase inactivates tumor suppressor PHB2 via tis dephosphorylation to contribute to the breast carcinogenesis
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉丸 哲郎, 松下 洋輔, 片桐 豊雅
2. 発表標題 BIG3-PHB2標的治療薬によるトラスツズマブ耐性HER2陽性乳がんの克服
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉丸 哲郎, 松下 洋輔, 尾野 雅哉, 笹 三徳, 三好 康雄, 片桐 豊雅
2. 発表標題 BIG3-PHB2複合体の形成が, HER2陽性乳癌のトラスツズマブ耐性獲得を誘導する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
研究協力者	片桐 豊雅  (KATAGIRI Toyomasa)		
研究協力者	松下 洋輔  (MATSUSHITA Yosuke)		
研究協力者	三好 康雄  (MIYOSHI Yasuo)		



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	笹 三徳  (SASA Mitsunori)		

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