

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16333

研究課題名(和文) ER陽性乳癌におけるプロリン異性化酵素の意義と治療標的としての可能性

研究課題名(英文) Role of proline isomerase in ER-positive breast cancer and its potential as a therapeutic target

研究代表者

羽原 誠 (Habara, Makoto)

山口大学・共同獣医学部・助教(特命)

研究者番号：60846525

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)：生命科学データベースを用いてエストロゲン受容体(ER：一部の乳癌の発生・増殖に関わる分子)陽性乳癌の予後不良因子としてFK506結合タンパク質(FKBP)52を見出した。FKBP52はタンパク質の機能を制御するプロリン異性化酵素に分類される。乳癌細胞株にてFKBP52を抑制するとERの分解が促進して発現量が減少し、癌細胞の増殖が低下した。さらにFKBP52の抑制による抗腫瘍効果は内分泌治療抵抗性乳癌細胞株や腫瘍移植マウスにおいても認められた。FKBP52によるER制御メカニズムとして、FKBP52がBRCA1という分子とERの結合を促進することでERを安定化させている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(ER)は乳癌の増殖制御因子であり内分泌治療の主要な標的だが、ERの活性を上昇させる分子機構はまだ十分に解明されていない。本研究ではFKBPによるERの新たな制御機構を明らかにした。更にFKBP52阻害は内分泌治療抵抗性の乳癌細胞においても抗腫瘍効果を示すことから、新たなバイオマーカー、治療法開発に繋がることを期待できる。FKBP52と癌との関連性については報告が少ない。本研究が明らかにしたFKBP52による癌の増殖制御はプロリン異性化の癌における役割を新たに示し、生体内におけるプロリン異性化の意義の理解に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：We identified FK506-binding protein 52 (FKBP52) as a factor associated with poor prognosis of individuals with ER(estrogen receptor; ER induces cell proliferation and exhibits increased expression in a large subset of breast cancers)-positive breast cancer by comprehensive life-science database analysis. FKBP52 is classified as a peptidyl proline isomerase that regulates protein function.

Inhibition of FKBP52 in ER-positive breast cancer cells decreased ER expression by promoting its degradation and markedly reduced cell proliferation. Furthermore, the tumor suppressive effect of FKBP52 inhibition was also observed in endocrine therapy-resistant breast cancer cells and in xenograft mice. FKBP52 stabilizes ER by promoting the binding of BRCA1 to the ER.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ER陽性乳癌 乳癌 プロリン異性化酵素 エストロゲン受容体 ER FKBP FKBP52 FKBP51

1. 研究開始当初の背景

乳癌は患者数の多い癌であり、罹患数ならびに死亡数は増加し続けている。乳癌の約 70%はエストロゲン受容体 α (ER α)陽性であり、エストロゲンが増殖刺激であるため、ER α 活性を抑制する内分泌療法が奏効する。しかし耐性化が問題となっており、乳癌死亡者の約半数は ER 陽性乳癌に起因している(Siegel et al., *CA: Cancer J. Clin.*, 2018)。耐性獲得後も乳癌細胞の増殖は ER α のシグナル伝達に依存する 경우가多く、ER α の機能を抑制する新規治療法の開発が喫緊の課題となっている(Metcalf et al., *Annu. Rev.*, 2018)。

これまで実用化されている分子標的薬の 70%以上はリン酸化酵素の阻害剤であるが、再燃、再発が生じる場合が多い。したがってリン酸化酵素以外の新たな酵素活性を標的とした抗癌剤の開発が必要である。そこで我々はプロリン異性化酵素に着目した。所属研究室では、FK506 結合タンパク質 52(FKBP52)と相同性が高い FKBP51 が癌細胞の増殖に極めて重要であること、その分子機構を同定している。さらに独自に行ったデータベース解析から、FKBP52 が ER α 陽性乳癌において高発現し、予後不良因子となることを見出した。しかしながら、FKBP52 の分子機能は未だほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FKBP52 の乳癌における機能を解明し、プロリン異性化による癌増殖制御の分子基盤を解明することである。最終的に FKBP52 を標的とした阻害剤の開発・実用化により難治性乳癌治療への臨床適用を目指す。

そのため、本研究では FKBP52 が持つ 3 つのドメイン(異性化酵素活性ドメイン FK1、FK1 と類似した FK2、相互作用に関わる Tetratricopeptide Repeat(TPR))の機能を詳細に解析し、FKBP52 による ER α の活性化調節メカニズムの解明を試みた。さらに個体における FKBP52 阻害による抗腫瘍作用を評価し、新たな難治性乳癌への臨床適用の可能性を検証した。

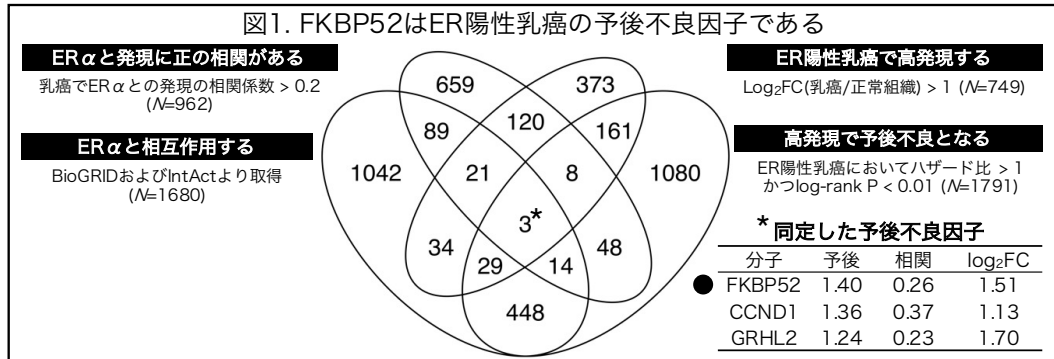
3. 研究の方法

- (1) 複数の生命科学データベースを用いた FKBP52 のプロファイリング
タンパク質のインタラクトームデータベース、臨床癌患者のトランスクリプトームおよび予後のデータベースを用いて乳癌における FKBP52 の発現量、ER α との関連性、予後への影響を調査した。
- (2) FKBP52 による ER α 制御メカニズムおよび機能ドメインの同定
乳癌細胞株にて FKBP52 の過剰発現または遺伝子ノックダウン(KD)を行い ER α の発現、活性への影響を評価した。更に FKBP52 が持つ 3 つのドメイン変異体を作成し、ER α の制御に必要なドメインを同定した。
- (3) FKBP52 阻害による抗腫瘍効果の検証
乳癌細胞株、内分泌治療抵抗性乳癌細胞株、Xenograft マウスモデルを用いて、FKBP52 KD または阻害剤による細胞増殖への影響を検討した。
- (4) ER α 制御における FKBP51 との機能比較
FKBP52 と最も相同性が高いホモログである FKBP51 において FKBP52 と同様の方法で臨床データのプロファイリング、ER α 制御機能を評価した。
- (5) BRCA1 による ER α の安定性の制御
FKBP52 と関連するユビキチンリガーゼとして BRCA1 を同定し、BRCA1 の ER α 安定性への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) FKBP52 は ERα 陽性乳癌の予後不良因子である

複数の生命科学データベースを用いた網羅的解析の結果、FKBP52 は①ERα と相互作用する、②ERα と発現量が正の相関を示す、③乳癌で過剰発現する、④高発現で ER 陽性乳癌の無再発生存期間が短縮する、という特徴を有していた。これらの特徴を満たす分子は FKBP52 を含め 3 分子しかなく、中でも FKBP52 は ERα 陽性乳癌の患者において最も高いハザード比を示した。これらの結果から、FKBP52 が ERα と強く関連する乳癌の予後不良因子であることが示唆された。



(2) FKBP52 は ERα を安定化させ、ERα の転写活性を増強する

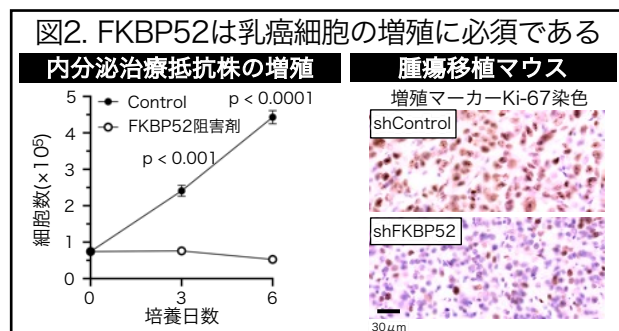
FKBP52 が乳癌の予後不良因子となる原因を探るため、ER 陽性乳癌細胞株を用いて種々の実験を行った。ERα 陽性乳癌細胞株において FKBP52 を KD すると ERα のタンパク質発現量が低下した。ERα のリガンドである β エストラジオール(E2)添加時においても、ERα の発現量は低下していた。一方で ERα の mRNA 発現量は低下せず、FKBP52 KD における ERα の発現低下は転写の制御によるものでないことが示唆された。そこでタンパク質分解(プロテアソーム)阻害剤である MG132 を FKBP52 KD 細胞に処置したところ、ERα の発現量が回復した。更に翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを用いたチェイス実験を行ったところ、FKBP52 KD 細胞において ERα の安定性が低下していることが明らかになった。以上より、FKBP52 KD により ERα タンパク質が不安定化し、発現量が低下したと考えられる。これらの結果と一致して、FKBP52 の過剰発現細胞では ERα の発現量は増加した。免疫沈降および NanoBiT による相互作用解析の結果、FKBP52 と ERα は相互作用することが明らかになった。この相互作用は FKBP52 の酵素活性を持つ FK1 ドメインの変異体では維持されたが、相互作用に関わる TPR ドメインの変異体では減少した。更にドメイン変異体の過剰発現では ERα の増加は認められず、FKBP52 の酵素活性および相互作用が ERα の安定化に必要であると示唆される。

FKBP52 KD 細胞の RNA-seq を行った結果、KD によりエストロゲン応答遺伝子が顕著に低下し、ERα の転写活性の低下が示唆された。更にエストロゲン応答エレメントを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより、FKBP52 KD または FKBP52 の阻害剤である FK506 処置で ERα の転写活性を示唆するルシフェラーゼシグナルが減弱することが明らかになった。安定性の結果と一致して、FKBP52 の過剰発現はシグナルを増強したが、FK1 ドメイン変異体、TPR ドメイン変異体では認められなかった。

以上のことから、FKBP52 は ERα を安定化させ、ERα の転写活性に必要であることが明らかとなった。これらの ERα の制御には FKBP52 の酵素活性および相互作用が重要であると思われる。

(3) FKBP52 の阻害は内分泌治療抵抗性乳癌細胞および *in vivo* において細胞増殖を抑制する

ERα は乳癌の主要な増殖制御因子であるため、FKBP52 阻害時の乳癌細胞の増殖について評価した。ERα 陽性乳癌細胞における FKBP52 KD は顕著な細胞増殖の低下を示した。また内分泌治療薬であるフルベストラントと FK506 の併用はそれぞれ単独よりも乳癌細胞の増殖を抑制した。重要なことにフルベストラント耐性乳癌細胞株 MFR においても FKBP52 の阻害は ERα の発現および細胞増殖を低下させた。FKBP52 KD ER 陽性乳癌細胞株をマウスに移植した結果、コントロール細胞の移植腫瘍と比較して FKBP52 KD では腫瘍サイズおよび細胞増殖の



マーカーである Ki-67 の発現の低下が認められた(図 2)。

- (4) FKBP51 は ER α の制御において FKBP52 と逆の作用を示す
FKBP52 と最も相同性が高い FKBP51 はアンドロゲン受容体などの他の核内受容体を制御することが知られている。そこで、FKBP51 の ER α 制御について検証した。FKBP52 とは対照的に FKBP51 KD は ER α を安定化させ、タンパク質発現量を増加させた。RNA-seq およびルシフェラーゼレポーターアッセイにより、FKBP51 KD は ER α の転写活性を増強することが示唆された。臨床癌データベースを参照すると、FKBP52 とは逆に FKBP51 は ER α が発現している多くの癌で発現が低下しており、ER 陽性乳癌においては低発現が予後不良と関連した。このことから FKBP51, 52 が ER α に対して互いに逆の制御を行っており、癌ではそのバランスが崩れていることが示唆された。
- (5) BRCA1 は FKBP52 と結合し ER α の安定化に寄与する
FKBP51, 52 の ER α に対する制御の差に関する機構を明らかにするため、タンパク質安定性を制御するユビキチンリガーゼに着目した。インタラクトーム解析の結果から、FKBP52 および ER α と結合し、FKBP51 と結合しないユビキチンリガーゼとして BRCA1 を同定した。ER 陽性乳癌細胞における BRCA1 KD は ER α を不安定化させ、タンパク質発現量を減少させた。免疫沈降により実際に BRCA1 が FKBP51 とは結合せず、FKBP52 と結合することを明らかにした。また FKBP52 KD 細胞において BRCA1 と ER α の結合が減少したことから、FKBP52 が BRCA1 と ER α の結合を促進し、ER α を安定化させることが示唆された。一方で、FKBP51 は FKBP52 と競合して ER α と結合することで、ER α の分解を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Habara Makoto, Sato Yuki, Goshima Takahiro, Sakurai Masashi, Imai Hiroyuki, Shimizu Hideyuki, Katayama Yuta, Hanaki Shunsuke, Masaki Takahiro, Morimoto Masahiro, Nishikawa Sayaka, Toyama Tatsuya, Shimada Midori	4. 巻 119
2. 論文標題 FKBP52 and FKBP51 differentially regulate the stability of estrogen receptor in breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2110256119	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 Maeda Keisuke, Habara Makoto, Kawaguchi Mitsuyasu, Matsumoto Hiroaki, Hanaki Shunsuke, Masaki Takahiro, Sato Yuki, Matsuyama Hideyasu, Kunieda Kazuki, Nakagawa Hidehiko, Shimada Midori	4. 巻 16
2. 論文標題 FKBP51 and FKBP52 regulate androgen receptor dimerization and proliferation in prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 940 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13030	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 Masaki Takahiro, Habara Makoto, Sato Yuki, Goshima Takahiro, Maeda Keisuke, Hanaki Shunsuke, Shimada Midori	4. 巻 118
2. 論文標題 Calcineurin regulates the stability and activity of estrogen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2114258118	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 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Shimada Midori	4. 巻 26
2. 論文標題 UV induced activation of ATR is mediated by UHRF2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 447 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12851	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 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Masaki Takahiro, Maeda Keisuke, Sato Yuki, Nakanishi Makoto, Shimada Midori	4. 巻 112
2. 論文標題 PP1 regulatory subunit NIPP1 regulates transcription of E2F1 target genes following DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2739 ~ 2752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14924	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 羽原誠、正木貴大、佐藤悠紀、前田啓介、花木駿介、島田緑
2. 発表標題 カルシニューリンはエストロゲン受容体 の安定性および活性を制御する
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽原 誠、五島 隆宏、正木 貴大、前田 啓介、花木 駿介、佐藤 悠紀、加藤 洋一、島田 緑
2. 発表標題 乳がんの予後不良因子サイクリンD1の発現調節機構の解明
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
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

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
---------	---------