

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02763

研究課題名(和文) RhoB-CNKSR1複合体によるHER1/2不活性化機構解析と制御剤開発・応用

研究課題名(英文) Regulation of HER1/2 receptor tyrosine kinases by RhoB-CNKSR1 complex

研究代表者

東山 繁樹 (Higashiyama, Shigeki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療標的分子、受容体型チロシンキナーゼ HER1とHER 2を不活性化するチロシン脱リン酸化酵素としてPTPRHおよびPTPRJを同定した。また、PTPRHおよびPTPRJの活性を負に制御する因子としてCNKSR1を、さらにCNKSR1とPTPRHおよびPTPRJとの結合を負に制御する因子としてRhoBを、RhoBタンパク質量を制御するシステムとしてCUL3KCTD10-E3ユビキチンリガーゼ(UbE3)を同定した。これによりHER1とHER 2の新たな活性制御機構としてCUL3KCTD10-UbE3-RhoB-CNKSR1-PTPRH/PTPRJ軸を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんや乳がんを代表とする多種の固形癌で受容体型チロシンキナーゼHER分子の発現増幅や自己活性化変異が認められることから、治療標的分子としてその活性抑制剤が開発され、臨床応用に至っている。しかし、再発がんにおいてはその効果が限定的である、新たな制御方法の開発が喫緊の課題である。本研究において、これまでとは異なる新規のHER活性制御分子システムCUL3KCTD10-UbE3-RhoB-CNKSR1-PTPRH/PTPRJ軸を見出したことから、新たな治療標的としてその制御剤の開発に弾みをつけることができ、がん治療に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We identified PTPRH and PTPRJ as tyrosine phosphatases that inactivate therapeutic target molecules, receptor-type tyrosine kinases HER1 and HER in cancer. We also identified CNKSR1 as a negative regulator of PTPRH and PTPRJ activity, RhoB as a negative regulator of CNKSR1 binding to PTPRH and PTPRJ, and CUL3KCTD10-E3 ubiquitin ligase (UbE3) as a system that regulates RhoB protein level. This revealed the CUL3KCTD10-UbE3-RhoB-CNKSR1-PTPRH/PTPRJ axis as a new regulatory mechanism for HER1 and HER 2 activities.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：HER2陽性乳がん RhoB CNKSR1 プロテインチロシンホスファターゼ PTPRH・PTPRJ CUL3 ユビキチンリガーゼ プロテインアレイ

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。

1. 研究開始当初の背景

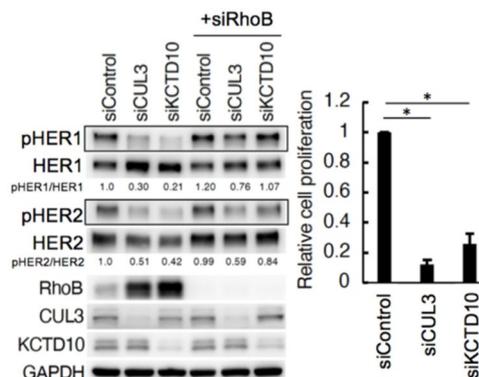
細胞増殖因子とその受容体、さらには受容体の下流で作動するシグナル伝達因子は、これまでに抗がん剤開発の標的分子として研究・開発が進められ、その有効性も実証されてきた。中でも分子標的創薬の先駆けであり、多くの癌種の治療標的となっている増殖因子 EGF の受容体 EGFR (HER1) とそのファミリー分子 HER2~4 は、多種の固形癌で発現増幅や活性化変異等による恒常的活性化が認められる。また HER2 発現増幅に伴う HER1、3 または 4 とのヘテロダイマー形成 (HER1/2, HER2/3 および HER2/4) によるシグナル惹起が強力な増殖シグナルを誘導する (*Nat Rev Cancer* 12, 553-63, 2012)。

一方、正常細胞では、この HER の活性化は一過性に起こり細胞増殖分裂周期を起動させ、その後、不活性化されることにより細胞分裂が連続的に起こるのを防ぐシステムを持つ。その主役となるのがプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) である。これまでにチロシンリン酸化 HER (HER Y-p) に対する PTP (HER Y-p · PTP) として、PTPN1、PTPN2、SHP-1、PTPD1 等、複数の PTP が報告されているが、これらがどのように時間・空間的に制御されているのか、驚く程に不明のままである (*Seminars in Cell & Dev. Biol.* 37, 66-72, 2015, *Cell Systems* 7, 295-309, 2018)。

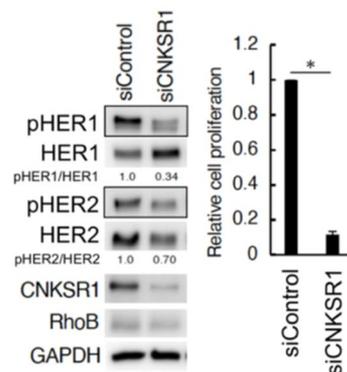
また、PTP の基質特異性は、*in vitro* での生化学的解析から意外なほど低いことが示され、PTP の細胞内局在がこの特異性発現に重要であることが示唆されている。では、各細胞内局所で HER Y-p · PTP に基質特異性を付与する分子機構は無いのだろうか？ 申請者らは最近、乳がん細胞の解析から、この問いに答える興味深い糸口を掴んだ。

即ち、HER2 陽性乳がん細胞 (HER1/2 を発現) の増殖に必須で、かつ HER1/2 シグナルに直接的に制御されない「ユビキチン E3 複合体 CUL3/KCTD10 による RhoB タンパク質分解システム」を見出した (*Cancer Sci.*, 110, 650-61, 2019)。この知見を基に、HER2 陽性乳がん細胞株 SKBR-3 細胞で、CUL3 または KCTD10 のノックダウンにより RhoB タンパク質の分解を抑制したところ、物の見事に細胞増殖が抑制された【図-1 右】。またこの時の HER1/2 の活性化である自己 Y-p は、両者ともに抑制、即ち脱リン酸化されていることが示された【図-1 左】。このことは、HER Y-p · PTP が、RhoB によって制御されていることを強く示唆してくれる。この分子機構の解明は、これまで全くと言っていいほど明らかにされていない HER Y-p · PTP の活性化制御機構を解き明かしてくれるとともに、現在 HER を標的としている癌細胞に対する新たな治療標的分子を提案してくれる。

そこで、RhoB による HER Y-p · PTP の制御機構を解き明かすために、まず、申請者が所属する愛媛大学プロテオサイエンスセンターが独自に作製・保有するヒト 24K タンパク質アレイを用いて、GTP 結合型 RhoB と直接結合するタンパク質を探索した。その結果、約 30 種の候補タンパク質を抽出できたが、この中に PTP は含まれていなかった。得られた約 30 種の候補タンパク質に対する siRNA を合成し、これを用いた標的タンパク質ノックダウン下での HER1/2 の Y-p 状態を解析した結果、CNKSR1 (Connector enhancer of kinase suppressor of Ras1) の発現抑制によって SKBR-3 細胞の HER1/2 の Y-p レベルが著減し、細胞増殖が著しく阻害された【図-2】。CNKSR1 分子自体にはホスファターゼ活性はないことから、RhoB-CNKSR1 複合体により制御される HER Y-p · PTP の存在が強く示唆された【図-3】。

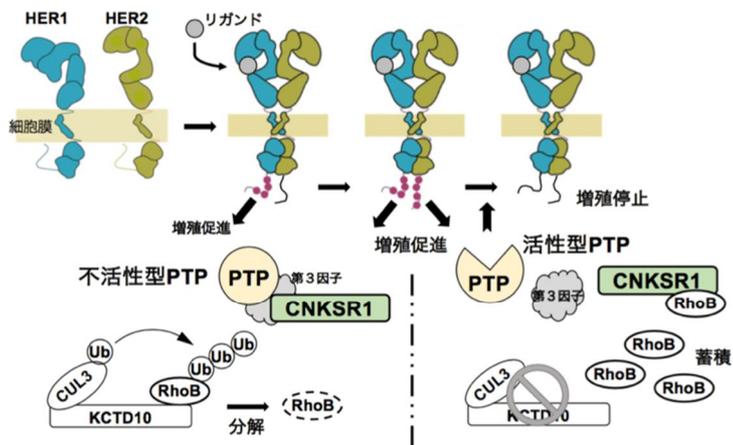


【図-1: CUL3及びKCTD10の発現抑制により RhoB タンパク質が蓄積することで HER1/HER2 のリン酸化が著減し (左図)、SKBR-3 細胞の増殖も著しく抑制された (右図、n=3、*; p<0.001)】



【図-2: CNKSR1 の発現抑制により HER1/HER2 のリン酸化が著減し (左図)、SKBR-3 細胞の増殖も著しく抑制された (右図、n=3、*; p<0.001)】

本研究において、RhoB-CNKS1R1 複合体により制御される HER Y-p・PTP の探索・同定、RhoB-CNKS1R1 複合体による HER1/2 Y-p・PTP 活性化の分子機構解明、HER1/2 Y-p・PTP 活性化制御材の探索・同定・応用を目指す。



【図-3：本研究の仮説。通常はRhoBがCUL3-KCTD10 UbE3によりポリUb化され、分解へと進む。この時、CNKS1R1はPTPを結合し、これを不活性化することでHER1/2の自己リン酸化が維持され増殖シグナルが惹起される（左）。一方、CUL3-KCTD10 UbE3が阻害されRhoBが蓄積するとCNKS1R1を結合し、CNKS1R1とPTPの結合を乖離させることでPTPを活性型へと変換する。これにより、HER1/2は脱リン酸化され、増殖は停止する（右）。】

2. 研究の目的

ハーセプチン等の HER1~4 を標的とした「有用ではあるが効果が限定的な薬剤」を補完し、且つ耐性を回避でき、長期投与が可能な新規薬剤開発のための標的分子をまず明らかにする。さらに、これらの分子を制御する有用な薬剤創出の基盤形成を目的とする。本研究において、RhoB-CNKS1R1 複合体により制御される HER Y-p・PTP の探索・同定、RhoB-CNKS1R1 複合体による HER1/2 Y-p・PTP 活性化の分子機構解明、HER1/2 Y-p・PTP 活性化制御材の探索・同定を目指す。

3. 研究の方法

RhoB-CNKS1R1 複合体により制御される HER1/2 Y-p・PTP の探索・同定

ヒト PTP には、可溶化型 16 種と膜貫通型 21 種の合計 37 種が存在する。そこで可溶化型 16 種の全てを全長で、膜貫通型 21 種についてはその細胞内領域を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いてそれぞれの N-末端に Flag-タグを挿入した形のリコンビナントタンパク質として生合成する。一方、N-末端にビオチンリガーゼ認識配列を付加した CNKS1R1 リコンビナントタンパク質を同様の方法で合成し、これをビオチン化酵素を用いてビオチン化 CNKS1R1 を調製する。これをプローブとしてアルファスクリーン法により 37 種のヒト Flag-PTP との結合をスクリーニングすることで、CNKS1R1 に直接結合するヒト PTP を探索・同定する。ただし、CNKS1R1 に直接結合するヒト PTP が得られなかった場合は、次のステップを踏む。

HER1/2 Y-p・PTP 制御に、RhoB-CNKS1R1 複合体が第 3 の因子を要求すると仮定して、RhoB-CNKS1R1 複合体に結合する因子を、当プロテオサイエンスセンターで整備し、保有する Flag タグ付加ヒト 25K タンパク質アレイ(384 plate x 66 枚)を用いてビオチン化 CNKS1R1、ビオチン化 RhoB-CNKS1R1 複合体をプローブとしてアルファスクリーン法による結合タンパク質をスクリーニングする。これにより得られる候補タンパク質と 27 種のヒト Flag-PTP との結合をアルファスクリーン法で行うことで、直接結合するヒト PTP を探索・同定する。また、ここで得られる第 3 因子の HER1/2 Y-p・PTP 制御への関与の有無の評価は、SKBR-3 細胞を用いた第 3 因子ノックダウンによる HER1/2 Y-p のレベル解析で行う。

Flag タグ付加ヒト 25K タンパク質アレイ、ビオチン化 RhoB、ビオチン化 CNKS1R1 はすでに調整済みである。また、27 種のヒト Flag-PTP リコンビナントタンパク質は、現在調製を進めている。本スクリーニングは、過去に同様の実験を複数回実施した実績のある研究分担者の前川が担当する。

上述のアルファスクリーンと並行して、細胞レベルで RhoB と相互作用するタンパク質を質量分析により同定する。SKBR-3 細胞において、RhoB を発現抑制または過剰発現し、これらの状態で CNKS1R1 を免疫沈降し、回収した CNKS1R1 タンパク質複合体を質量分析に供して、CNKS1R1 と相互作用するタンパク質の同定に資する。質量分析は愛媛大学プロテオサイエンスセンター プロテオミクス部門にて行う。

本方法により RhoB-CNKS1R1 複合体に結合する PTP を同定する。

RhoB-CNKSR1 複合体による HER1/2 Y-p・PTP 活性化の分子機構解明

計画 で同定する HER1/2 Y-p・PTP の活性発現制御機構を RhoB-CNKSR1 複合体、または RhoB-CNKSR1-第3因子複合体の各因子の有無で、以下の方法にて解析する。



【図-4: CNKSR1のドメイン構造。】

まず【図-4】に示すように、CNKSR1 分子は特徴的な5つのドメイン構造を有することから、各ドメイン欠損変異体タンパク質を合成し、これらと RhoB、第3因子並びに HER1/2 Y-p・PTP との結合活性をアルファスクリーン法にて解析し、両者の結合領域を決定する。この両者各々の結合領域欠損体、並びに結合領域ドメインのみを発現させた乳がん細胞株 SKBR-3 細胞、並びに肺がん細胞株 (EGFR 変異陽性の PC-9、NCI-H3255 細胞、並びに野生型 EGFR を持つ細胞株) を用いて HER1/2 Y-p レベルをウエスタンブロット法にて解析する。これにより、CNKSR1 による HER1/2 Y-p・PTP 活性制御に関し、RhoB 並びに第3因子が正に作動するのか、負に作動するのかを見極めることができ、RhoB-CNKSR1 (-第3因子) 複合体形成の意義解明の足がかりを捉えることができる。

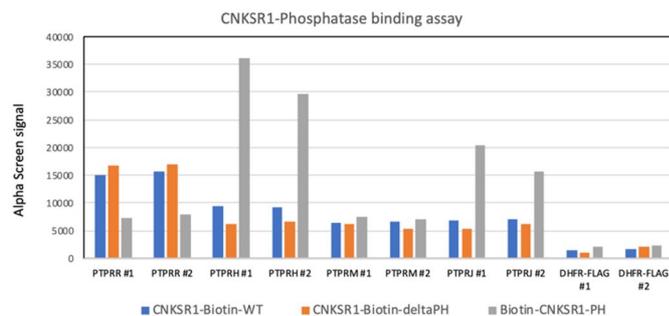
HER1/2 Y-p・PTP 活性化制御材の探索・同定

計画 で同定する HER1/2 Y-p・PTP と CNKSR1 の結合を阻害する低分子化合物をスクリーニングするために、Flag-HER1/2 Y-p・PTP とビオチン化 CNKSR1 を用いてアルファスクリーンを構築し、低分子化合物をスクリーニングする。ヒットした化合物の生物活性は、HER2 陽性乳がん細胞株 SK-dBR-3 細胞の EGFR/HER2 リン酸化抑制並びに細胞増殖抑制で評価する。

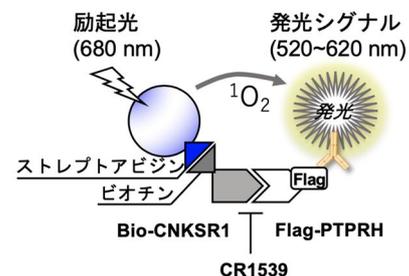
4. 研究成果

これまでの *in vitro* での生化学的解析から、PTP の基質特異性は低いことが示され、特異性発現には細胞内局在が重要であることが示唆されている。申請者らは最近、HER2 陽性乳がん細胞の解析から HER1/2・PTP の足場タンパク質 CNKSR1 を同定し、その活性制御機構を明らかにするとともに HER1/2・PTP として PTPRH と PTPRJ を同定した【*Life Science Alliance* 2021, 4:e202101095】。さらに PTPRH・CNKSR1 相互作用を阻害する低分子化合物 RS1539 の創出に成功し、本化合物が HER1/2 の脱リン酸化による不活性化並びに細胞増殖抑制を誘導できることを明らかにしている【図-6&7 未発表】。

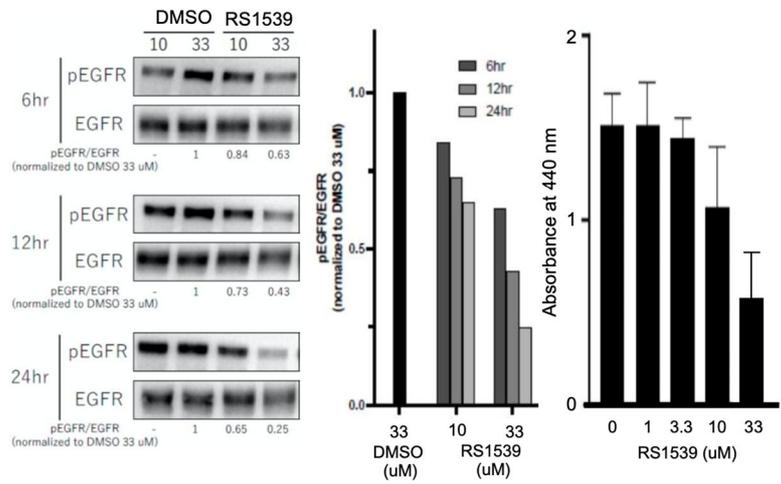
【図-5: アルファスクリーン法による CNKSR1-PTPR の結合解析。アルファスクリーン法を用いて、CNKSR1-PTPR ファミリー分子との結合を調べた。DHFR は陰性コントロールとして用いた。】



【図-6: CNKSR1-PTPRH 結合阻害剤 RS1539 のスクリーニングに用いたアルファスクリーン法の概要】



【図-7: HER1/2 陽性乳がん細胞 SK-BR-3細胞に対する RS1539 の効果。RS1539 (10 及び 33 uM)添加により HER1(EGFR)の恒常的リン酸化が経時的に脱リン酸化され(右: Western blot データ、中:検出バンド強度の定量比較(EGFR-p/EGFR)) その結果として細胞増殖抑制が起こる(左: 72 時間培養後の WST1 アッセイ)。HER2 についても HER1 と同等の結果を得ている。】



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanao Nishiyama, Masashi Maekawa, Tomoya Nakagita, Jun Nakayama, Takeshi Kiyoi, Mami Chosei, Akari Murakami, Yoshiaki Kamei, Hiroyuki Takeda, Yasutsugu Takada, Shigeki Higashiyama	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 Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.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 該当する

〔学会発表〕 計3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、村上朱里、奥島久美子、竹本佳菜、高岡萌美、日下部恵梨菜、志田原智広、野田令菜、青木玲奈、田口加奈、山下美智子、亀井義明、高田泰次
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 Kanao Nishiyama, Masashi Maekawa, Jun Nakayama, Akari Murakami, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada, Shigeki Higashiyama
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

1. 発表者名 Kanao Nishiyama, Masashi Maekawa, Akari Murakami, Kaho Utsunomiya, Kana Takemoto, Erina Kusakabe, Haruna Noda, Reina Aoki, Kana Taguchi, Michiko Yamashita, Tomoya Nakagita, Jun Nakayama, Mami Chosei, Takeshi Kiyoi, Yoshiaki Kamei, Hiroyuki Takeda, Yasutsugu Takada and Shigeki Higashiyama.
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

〔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 分担 者	前川 大志 (Maekawa Masashi) (10771917)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師 (16301)	

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