

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06641

研究課題名(和文) ER 発現誘導に着目したトリプルネガティブ乳癌に対する新規克服治療法の創出

研究課題名(英文) Development of therapeutic drug against TNBC based on mechanism of ER induction

研究代表者

柴田 智博 (Shibata, Tomohiro)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：40795986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TNBC患者において乳癌のオンコプロテインであるYB-1のリン酸化体の発現が他のサブタイプの乳癌に比べ有意に増加していることを明らかにした。また、TNBCにおいてリン酸化YB-1阻害薬がER 発現を上昇させ、ER 発現制御メカニズムとしてリン酸化YB-1がER と結合することでER タンパク質の安定性を低下させることを明らかにした。さらに、リン酸化YB-1標的薬とER 標的薬が相乗的にTNBCの増殖を抑制した。本研究は、TNBC細胞においてリン酸化YB-1がER 発現を制御するメカニズムを明らかにし、YB-1標的薬とER 標的薬を中心としたTNBCの新たな治療戦略の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNBCは治療標的となる因子を発現する 경우가少なく、有効な治療薬の創出が必要とされている。本研究では、リン酸化YB-1標的薬はTNBCにおいてYB-1とER の複合体形成を阻害しER の安定性を上昇させ、タンパク質発現を上昇させることを明らかにした。さらに、動物実験においてリン酸化YB-1標的薬がER のタンパク質発現を上昇させ、ER 標的薬に対する感受性を得ることを見出した。本研究は、HER2やER 等の標的がないTNBCの一部のサブタイプにおいてER が標的になり得ることを示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：YB-1 was expressed at similar levels in four subtypes of breast cancer, but phosphorylated YB-1 expression was found to be significantly higher in tumors of patients with triple negative breast cancer (TNBC) as compared with other subtypes. Inhibition of YB-1 phosphorylation (pYB-1) stabilized ER protein. Moreover, the phosphorylated YB-1 bind to ER protein and promoted ER protein degradation. The combination of pYB-1 inhibitor and ER inhibitor showed synergetic suppressive effect on TNBC growth in vitro and in vivo. The present finding demonstrated that pYB-1 is a potential therapeutic target for treatment of TNBC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 エストロゲン受容体 YB-1

1. 研究開始当初の背景

- (1) 乳癌細胞の増殖は ER α と HER2 発現に緊密に依存しており、乳癌の 60-70% を占める ER α 陽性乳癌は、ER α 標的のタモキシフェンやフルベストラント、レトロゾールなどの内分泌治療が行われる。他方、20% を占める HER2 陽性乳癌は、HER2 標的薬のトラスツズマブやペルツツマブなどの分子標的治療が施行され、がん治療の向上に大きく貢献している。その結果、ER α 又は HER2 を発現している約 80% の乳癌は 90% 以上の 5 年生存率を示す。
- (2) しかし、乳癌の約 20% を占めるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は乳癌の他のサブタイプと比べ 5 年生存率が 70% と依然として予後が悪い (Garrido-Castro et al., Cancer Dis. 2019)。その要因として、他のサブタイプと異なり標的分子がなく有効な分子標的薬がないこと、浸潤能・転移能が高く多臓器への転移が起こりやすいことが挙げられる。
- (3) Y-ボックス結合タンパク質-1 (YB-1) は細胞周期関連遺伝子や増殖因子受容体の発現を制御する転写因子であり、さらに、YB-1 の高発現や活性化 (核内局在) は乳癌をはじめとした様々ながん種において予後不良因子であることが当研究室を含む国内外の研究グループにより報告されている。
- (4) 申請者は、YB-1 の活性化と核内移行に PI3K/AKT シグナルが関与することを報告している。近年、申請者はフルベストラント耐性乳癌細胞株において、AKT/mTOR/S6K シグナルが活性化し YB-1 リン酸化を促進することで、内分泌治療耐性を誘導することを報告した (Shibata et al., Cancer Res., 2017)。さらに、内分泌治療後の再発乳癌において YB-1 の核内発現とリン酸化 YB-1 の発現が上昇していることを明らかにした (Shibata et al., Mol Cancer Ther. 2020)。
- (5) The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを駆使した乳癌組織での解析から YB-1 が予後不良因子を正に制御し、予後良好因子を負に制御することを観察している。さらに、YB-1 及びその制御因子が乳癌の予後を予測するバイオマーカーとなることを明らかにした (Shibata et al., Oncotarget. 2018)。
- (6) TCGA データベースを駆使したさらなる解析により、TNBC においてリン酸化 YB-1 発現が亢進していることを見出している (Shibata et al., Mol. Cancer Ther. 2020)。そこで、TNBC におけるリン酸化 YB-1 に着目し、YB-1 リン酸化標的薬の TNBC に対する効果について検討を行った。その結果、YB-1 リン酸化阻害により ER α の発現上昇とともに、内分泌治療薬に対する感受性が増強することを観察している。

2. 研究の目的

これまでの結果から、TNBC の進展にリン酸化 YB-1 が関与していることが示唆された。さらに、TNBC においてリン酸化 YB-1 が ER α 発現を制御するとともに内分泌治療薬の感受性を変化させることを観察している。しかし、TNBC において YB-1 が活性化する詳細なメカニズムやリン酸化 YB-1 の治療標的としての有用性は明らかになっていない。本研究は、TNBC の悪性化に関与する YB-1 の活性化シグナルを明らかにし、それを標的とした新規 TNBC 克服治療薬の創出を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 薬剤感受性の測定 (WST 法)

対数増殖期にある細胞を 96 well プレートに播種し (1.0×10^3 cells) 24 時間培養した後、AKT 阻害薬、ERK 阻害薬、ER α 標的薬、リン酸化 YB-1 阻害薬を添加した。薬剤を添加後 37 で 72 時間培養した。生細胞数測定試薬 Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所、熊本、日本) を各 well に 20 μ l 加えて 37 で 2-3 時間培養し、450 nm の吸光度を測定した。IC₅₀ 値は吸光度の値がコントロールの半分になる薬剤濃度を生存曲線から決定した。

(2) siRNA による発現抑制

YB-1 siRNA は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と Opti-MEM medium (Invitrogen) を使用して、細胞を抗生物質非含有培地で播種してから 24 時間後に細胞導入し、その後タンパクの回収又は 96 well プレートに細胞を播種。96 well プレートに播種後 24 時間で薬剤を添加し、その後 72 時間培養した。細胞数の測定は WST 法に従い実施した。

(3) 共免疫沈降法

MDA-MB231 細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、PBS 2ml/15cm dish を加えスクレイパーにより回収後、1500rpm で 5 分間遠心。ペレットにプロテアーゼ阻害剤混合物を添加した IP Lysis buffer 200 μ l (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 250mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.3%

NP-40) を添加して氷上で 30 分静置し、溶解した。3000rpm で 15 分間遠心分離した。回収したタンパク質溶液を NET-gel buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.25% gelatin, 0.02% sodium azide, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin) により全量 1ml (2mg/ml) に調整した。Protein-G Sepharose 4B を添加し、1 時間緩やかに攪拌しプレクリアを行い、2000rpm で 2 分間遠心分離し上清を使用した。続いて抗 YB-1 抗体をタンパク質 1mg 当たり 4 μ g 添加し、4 時間で一晚緩やかに攪拌した。Protein-G Sepharose 4B を添加して 4 時間で 1 時間緩やかに攪拌した。Protein- G Sepharose 4B を 3 回 NET-gel buffer で洗浄し、SDS サンプル buffer 30 μ l で溶出し、Western-Blot 法で検討した。

(4) ER α タンパクの安定性の測定

MDA-MB231 (2.0 \times 10⁵ cells/35mm² dish) を播種し、一晚培養後リン酸化 YB-1 阻害薬含有培地に培地交換。12 時間培養後 CHX (10 μ g/ml) と MG-132 (10 μ M) を添加。CHX と MG-132 を添加後、4、6、8、12、24 時間でタンパク回収し Western-Blot 法で検討した。

(5) 臨床検体を対象とした免疫組織化学染色

乳癌患者における YB-1 とその活性化シグナル及び治療効果との相関について、切除がん由来の組織標本を対象に、免疫染色による検討を行った。すなわち、YB-1 のリン酸化及び RSK/AKT/mTOR/S6K のリン酸化を評価し、YB-1 と上流シグナルの関連を評価した。同時に、再発乳癌患者での YB-1 とその活性化シグナル RSK/AKT/mTOR/S6K の発現を評価し、YB-1 発現と YB-1 活性化シグナルが再発率と関連するか検討を行った。

4 . 研究成果

- (1) TNBC 全般にリン酸化 YB-1 によって ER α 発現が制御されているか否か明らかにするため、TNBC 細胞株 7 株を用いリン酸化 YB-1 阻害薬の ER α 発現に対する影響について検討を行った。その結果、7 株中 3 株において ER α 発現が上昇し ER α 標的薬に対して感受性が増加することを観察した。さらに、YB-1 siRNA を用いた検討においても、リン酸化 YB-1 標的薬により ER α 発現が誘導された細胞株で、同様に ER α 発現が上昇することを観察した。
- (2) リン酸化 YB-1 阻害薬により ER α 発現が増加する株に着目し、ER α の発現制御メカニズムについて検討を行った。その結果、リン酸化 YB-1 阻害薬は ER α の mRNA 発現に影響を与えなかったが、ER α タンパクの安定性を上昇することを明らかにした。
- (3) リン酸化 YB-1 標的薬は ER α のタンパク質発現を上昇させたが、mRNA 発現には影響を与えなかった。さらに、YB-1 と ER α との結合が ER α のタンパク質の安定性に関与していることから、リン酸化 YB-1 標的薬の YB-1 と ER α の結合に与える影響について検討を行った。その結果、リン酸化 YB-1 標的薬のより YB-1 と ER α との結合が抑制されることが共免疫沈降法を用いた検討により明らかになった。
- (4) YB-1 リン酸化部位の恒常活性化体及び不活性化体を用いた検討により、YB-1 のリン酸化体が ER α と結合することでタンパク質の安定性を低下させることを明らかにした。
- (5) マウス同所移植モデルを用いた TNBC 腫瘍の治療実験において、リン酸化 YB-1 標的薬と ER α 標的薬の併用は相乗的な腫瘍増殖抑制効果を示した。さらに、リン酸化 YB-1 標的薬により腫瘍内の ER α 発現が増加することが、免疫組織化学染色法及びウエスタンブロット法により観察された。
- (6) TNBC の臨床検体を用い、リン酸化 YB-1 発現及び ER α 発現を免疫染色により検討を行ったところ、リン酸化 YB-1 発現と ER α 発現に有意な負の相関があることが観察された。

以上の検討により、TNBC 細胞においてリン酸化 YB-1 が ER α 発現を制御するメカニズムの一部を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata Tomohiro, Cao Duo-Yao, Dar Tahir B., Ahmed Faizan, Bhat Shabir A., Veiras Luciana C., Bernstein Ellen A., Khan Abdul Arif, Chaum Manita, Shiao Stephen L., Tourtellotte Warren G., Giani Jorge F., Bernstein Kenneth E., Cui Xiaojiang, Vail Eric, Khan Zakir	4. 巻 14
2. 論文標題 miR766-3p and miR124-3p Dictate Drug Resistance and Clinical Outcome in HNSCC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5273 ~ 5273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14215273	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
1. 著者名 Bhat Shabir A., Shibata Tomohiro, Leong Matthew, Plummer Jasmine, Vail Eric, Khan Zakir	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparative Upper Respiratory Tract Transcriptomic Profiling Reveals a Potential Role of Early Activation of Interferon Pathway in Severe COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2182 ~ 2182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14102182	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
1. 著者名 Ohno Koichi, Shibata Tomohiro, Ito Ken ichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor activation confers resistance to lenvatinib in thyroid cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3193 ~ 3210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cao DuoYao, Veiras Luciana, Ahmed Faizan, Shibata Tomohiro, Bernstein Ellen A., Okwan-Duodu Derick, Giani Jorge F., Khan Zakir, Bernstein Kenneth E.	4. 巻 152
2. 論文標題 The non-cardiovascular actions of ACE	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170769 ~ 170769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2022.170769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Takayuki, Oba Takaaki, Tanimoto Keiji, Shibata Tomohiro, Kamijo Shinobu, Ito Ken-ichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Tamoxifen resistance alters sensitivity to 5-fluorouracil in a subset of estrogen receptor-positive breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0252822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252822	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 Ono Mayu, Oba Takaaki, Shibata Tomohiro, Ito Ken-ichi	4. 巻 147
2. 論文標題 The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 3211 ~ 3224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-021-03722-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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		
米国	Cedars Sinai Medical Center		