

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461948

研究課題名(和文)新規ER制御分子BIG3を介した内分泌療法耐性機構の解明および新規治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the cross-talk between estrogen and growth factors in 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(プロテオ)・講師

研究者番号：80424729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、乳癌におけるBIG3-PHB2複合体の結合阻害ペプチド(ERAPペプチド)がエストロゲン依存性乳癌に対する抗腫瘍効果を有していることを明らかにしてきた。本研究では、このERAPペプチドが耐性獲得の原因のひとつであるエストロゲンと種々の増殖因子のクロストーク・シグナルによる細胞増殖、ならびにAktとMAPKのリン酸化を効率的に抑制すること、既存の抗ホルモン剤や分子標的薬との併用投与により相乗的な抑制効果を獲得することを示した。また、BIG3強陽性の患者は再発期間が有意に短く、BIG3-PHB2複合体が乳癌の重要な分子標的であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that specific inhibitor of the BIG3-PHB2 complex, which is a critical modulator in estrogen (E2) signaling, ERAP, leads to suppression of E2-dependent estrogen-signaling activation. Here, we report that ERAP has significant suppressive effects against synergistic activation caused by the cross-talk between E2 and growth factors associated with intrinsic or acquired resistance to endocrine-therapy in breast cancer cells. Importantly, combined treatment with ERAP and some known anti-estrogen led to a synergistic suppression of signaling that was activated by cross-talk between E2 and growth factors or HER2 amplification. Furthermore, BIG3 overexpression is strongly associated with poor prognosis of breast cancer. Taken together, our findings suggest that the specific inhibition of BIG3-PHB2 is a novel potential therapeutic approach for the treatment of endocrine-resistant breast cancers activated by the cross-talk between E2 and growth factor signaling.

研究分野：乳癌の分子生物学

キーワード：内分泌療法耐性乳癌 エストロゲン受容体 乳癌 クロストーク

### 1. 研究開始当初の背景

女性の乳癌罹患率は年々増加傾向にあり、我が国においては女性が罹る癌の中でもっとも頻度が高くなっている。乳癌は女性ホルモンであるエストロゲン(E2)によって発生、増殖、進展が促進されることから、治療薬として抗 E2 製剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が臨床応用されており、術後乳癌の治療、転移・再発予防、癌の進行抑制に大きく貢献している。しかしながら、これらの内分泌療法の恩恵を受ける患者が増える一方で、約 30%のエストロゲン受容体(ER)陽性乳癌患者は不応性であること、その長期投与は抵抗性獲得に至り再発を来していること、再発後の治療法が確立していないことが大きな問題となっている。このような内分泌療法に対する不応性・耐性獲得の分子メカニズムについては依然不明な点が多いため、既存薬に代わる革新的な新規治療薬の開発が急務となっている。

### 2. 研究の目的

現在までに、内分泌療法耐性獲得の主な原因として、増殖因子による迅速な細胞増殖関連のリン酸化カスケードの活性化、ER と膜型受容体(IGF-1R、HER2、EGFR)とのクロストーク(非ゲノムの ER シグナル経路の活性化)、E2 以外のリガンド依存性 ER 活性化が報告されているが、依然不明な点が多い。われわれは、これまでに乳癌で高頻度に発現亢進を認める ER 活性化制御分子 BIG3 が、乳癌細胞において ER 活性化の抑制分子プロヒビチン 2 (PHB2) と結合し、PHB2 の抑制機能を封じ込めることで、ER の恒常的な活性化を導くという新たな E2 依存性乳癌細胞の増殖シグナル・モデルを提唱してきた。また、このモデルに基づいて、PHB2 の ER 活性抑制機能の再活性化を利用する BIG3-PHB2 相互作用阻害ペプチド(ERAP ペプチド)を開発し、ER 陽性乳癌に対して *in vitro* と *in vivo* で抗腫瘍効果を有することを実証して、ERAP ペプチドが乳癌の新規治療薬となる可能性を示してきた。特に、この ERAP ペプチドにより BIG3 から解放された PHB2 は、細胞膜に局在する膜型 ER に結合して、膜型受容体を介した非ゲノムの ER シグナル経路を抑制していた。そこで、臨床的に問題となっている E2 と増殖因子のシグナルのクロストークによる内分泌療法耐性獲得に対して、ERAP ペプチドの投与が抑制効果を有しているかどうかを検討した。また、ER 陽性乳癌の切除標本を用いて BIG3 の免疫組織染色を行い、BIG3 の発現と乳癌患者の予後との関連を調査した。

### 3. 研究の方法

#### (1)E2 と増殖因子のシグナルのクロストークに及ぼす ERAP ペプチドの抑制効果

近年、ER は細胞膜近辺に局在し、E2 と増殖因子によるクロストークにより膜型受容

体と相互作用して、迅速な細胞内シグナルを活性化することで、内分泌療法に対して耐性を獲得する可能性が指摘されている。ERAP ペプチド処理は細胞質に局在する ER の活性を制御できることから、ER と膜型受容体とのクロストークによるリン酸化カスケード、いわゆる Non-genomic 活性化経路に及ぼす影響を検討した。実験は、ERAP ペプチド処理がクロストーク・シグナルによる細胞増殖と Akt および MAPK のリン酸化に及ぼす影響により評価した。

#### (2)BIG3 発現と予後との関連性

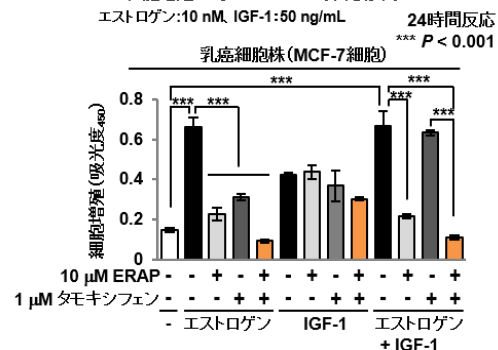
ER 陽性乳癌の切除標本 82 症例を用いて、BIG3 の免疫組織染色を行い、その発現強度および染色範囲から病理医により 4 段階(スコア 0: 無染色~スコア 3: 強陽性)に分けて評価した。

### 4. 研究成果

#### (1)E2 と増殖因子のシグナルのクロストークによる内分泌療法耐性獲得に対する ERAP ペプチドの抑制効果

E2 と IGF-1 および EGF のクロストークによる細胞増殖は、タモキシフェン単独処理では抑制できなかったのに対して、ERAP ペプチドの投与はその増殖を有意に抑制することができた(図 1)。さらに、興味深いことに、タモキシフェンと併用することで、相乗的な抑制効果が得られた(図 1)。また、Akt と MAPK のリン酸化について調べたところ、クロストークにより顕著に活性化された Akt と MAPK のリン酸化は ERAP ペプチドの投与によりほぼ完全に抑制され、ERAP ペプチドにより BIG3 から解放された PHB2 が ER と結合して各膜型受容体のリン酸化を制御することで、下流のシグナル分子のリン酸化を抑制することが示唆された。すなわち、エストロゲンと増殖因子によるクロストークを原因とする耐性獲得の制御に ERAP ペプチドが、有効であると考えられる。

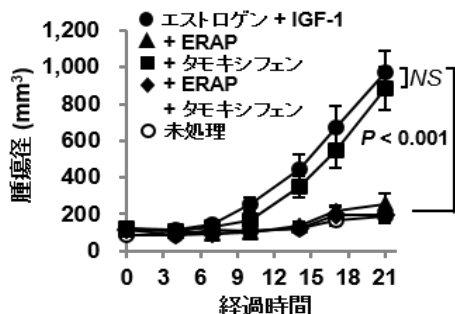
(図1) エストロゲンと増殖因子IGF-1のシグナル・クロストークによる細胞増殖に対するERAPの抑制効果。



また、同所性移植マウスを用いた *in vivo* 実験でも、E2 と IGF-1 の投与により腫瘍径が顕著に増大したのに対して、ERAP ペプチドの投与はほぼ完全な抗腫瘍効果を示した(図 2)。さらに、重要なこととして、タモキシフェンと併用した腫瘍は TUNEL 染色が

認められ、アポトーシスを誘導していることが明らかになった。

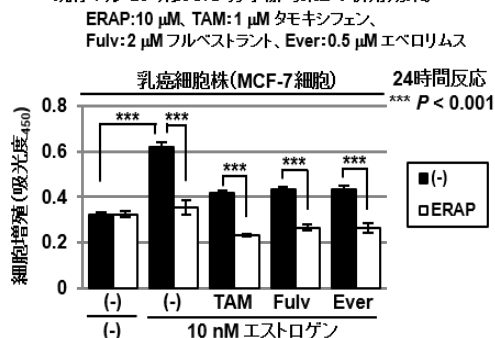
(図2) クロストーク・シグナルに対するERAPの抗腫瘍効果。



(2) 既存薬と ERAP ペプチドの併用効果)

ERAP ペプチドがタモキシフェンの抑制活性を亢進させる可能性が示唆されたため、既存の抗ホルモン剤(タモキシフェンとフルベストラント)および分子標的薬(mTOR 阻害剤エムロリブス)との併用効果を検討した。その結果、タモキシフェン、フルベストラントおよびエムロリブスの各単独処理はE2 依存性の細胞増殖を約 50%抑制していたが、ERAP ペプチドとの併用投与は相乗的な抑制効果を獲得し、未処理レベル以下まで細胞数が減少していた(図3)。これらのデータは、ERAP ペプチドが多面的にE2 依存性シグナル経路を持続的に抑制していることを示唆するものであり、既存の内分泌療法とは異なる新たな治療薬になりえる可能性が期待される。

(図3) エストロゲン依存性乳がん細胞株の増殖に対する既存ホルモン剤および分子標的薬との併用効果。



(3) BIG3 発現と予後との関連性

ER 陽性乳癌の切除標本を用いて、BIG3 の免疫組織染色を行ったところ、約 90%のがん組織が BIG3 陽性を示した。すなわち、癌組織がほぼ均一に強く染色される症例(スコア 3)が 82 例中 16 例、スコア 2 が 32 症例、スコア 1 (淡く染色される症例)が 24 例であった。さらに、BIG3 が強陽性の患者(スコア 3 とスコア 2)を対象として、無再発生存期間と相関解析を行ったところ、弱陽性の患者(スコア 1 とスコア 0)と比較して再発期間が有意に短いことが認められた(図4)。

臨床病理学的所見を考慮しても 5%以下の有意性を保っていたことから(表1)、BIG3 の発現は乳癌の独立した予後因子であり、重要な分子標的であると考えられた。

(図4) BIG3の高発現とPHB2の脱リン酸化は臨床予後と相関する。

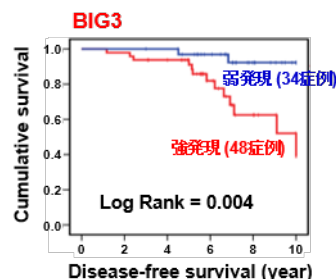


表1 多変量解析

変数	ハザード比	信頼区間 (95%)	P値
BIG3発現 (強陽性 vs 弱陽性)	6.091	1.36 - 27.21	0.018
癌の進行度 (ステージ II vs ステージ I)	3.945	1.25 - 12.43	0.019

(4) 結論

以上の成果は、BIG3 と PHB2 の相互作用の阻害薬が luminal タイプ乳癌、特に内分泌療法耐性乳癌に対して、既存の内分泌療法とは異なる新たな治療薬になりえる可能性を示唆するものである。さらに、BIG3 が乳癌細胞にのみ存在することと ERAP ペプチドはエストロゲン量や作用点に影響を及ぼさないことから、深刻な副作用を引き起こすことが低く、閉経前後を問わずに乳癌患者の Quality-of-Life を考慮した新たな治療薬になりえることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Yoshimaru T, Ono M, Bando Y, Chen YA, Mizuguchi K, Shima H, Komatsu M, Imoto I, Izumi K, Honda J, Miyoshi Y, Sasa M, Katagiri T. A-kinase anchoring protein BIG3 coordinates oestrogen signalling in breast cancer cells. *Nat. Commun.* 8: 15427, 2017. doi: 10.1038/ncomms15427. 査読有

Yoshimaru T, Aihara K, Komatsu M, Matsushita Y, Okazaki Y, Toyokuni S, Honda J, Sasa M, Miyoshi Y, Otaka A, Katagiri T. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates antitumour activity for breast cancer therapeutics. *Sci Rep.* 7: 1821, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-01951-6. 査読有

松下洋輔、吉丸哲郎、片桐豊雅: 包括的ゲノム解析を通じた乳癌の発症・進展機構解明の現状と展望、日本臨床 75 巻 増刊号

3, 155 - 160, 2017. 査読なし  
吉丸哲郎、松下洋輔、片桐豊雅：包括的ゲノム解析を通じたトリプルネガティブ乳癌の分子特性、乳癌の臨床31巻5号 377 - 385, 2016. 査読なし  
Kim NH, Yoshimaru T, Chen YA, Matsuo T, Komatsu M, Miyoshi Y, Tanaka E, Sasa M, Katagiri T. BIG3 inhibit the estrogen-dependent nuclear translocation of PHB2 via multiple Karyopherin-alpha proteins in breast cancer cells. *PLoS One* 10: e0127707, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0127707. 査読有  
Yoshimaru T, Komatsu M, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T. Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the crosstalk between estrogen and growth factors in breast cancer. *Cancer Sci.* 106: 550-558, 2015. doi: 10.1111/cas.12654. 査読有  
Yoshimaru T, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T. Xanthohumol suppresses oestrogen-signalling in breast cancer through the inhibition of BIG3-PHB2 interactions. *Sci Rep.* 4: 7355, 2014. doi: 10.1038/srep07355. 査読有  
Chen YA, Murakami Y, Ahmad S, Yoshimaru T, Katagiri T, Mizuguchi K. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) is predicted to interact with its partner through an ARM-type alpha-helical structure. *BMC Res. Notes* 7: 435, 2014. doi: 10.1186/1756-0500-7-435. 査読有

[学会発表](計 9 件)

Tetsuro Yoshimaru, Toyomasa Katagiri. Development of chemically modified peptide inhibitor ERAP targeting BIG3-PHB2 complex on hormone-resistant breast cancer. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Molecular Medicine in Tokushima University, 2016年11月18日、徳島大学大塚講堂(徳島県徳島市)  
Tetsuro Yoshimaru, Masaya Ono, Kenji Mizuguchi, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri. A novel A-kinase anchoring protein, BIG3, coordinates estrogen signalling in breast cancer cells. The 12<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, 2016年10月28日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市)  
Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Yasumasa Okazaki, Shinya Toyokuni, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri. Development of chemically modified

peptide inhibitor ERAP targeting BIG3-PHB2 complex on hormone-resistant breast cancer. 第75回日本癌学会・学術総会、2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

吉丸哲郎、小松正人、片桐豊雅。ホルモン療法耐性乳がん治療を目的とした分子内架橋型BIG3-PHB2相互作用阻害ペプチドの開発、第20回日本がん分子標的治療学会、2016年6月1日、別府コンベンションセンター(大分県別府市)

Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu, Etsu Tashiro, Hiroyuki Osada, Masaya Imoto, Shinya Toyokuni, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa, Toyomasa Katagiri. BIG3-PHB2 interaction is a key potential therapeutic target in luminal-type breast cancer. 第74回日本癌学会・学術総会、2015年10月9日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

吉丸哲郎、小松正人、田代悦、長田裕之、井本正哉、片桐豊雅。エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がん治療法の創製、第19回日本がん分子標的治療学会、2015年6月12日、松山全日空ホテル(愛媛県松山市)

吉丸哲郎、小松正人、三好康雄、本田純子、笹三徳、片桐豊雅。エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がん治療法の開発、第72回徳島乳腺研究会、2015年4月25日、徳島大学病院日亜メディカルホール(徳島県徳島市)

Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu, Taisuke Matsuo, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura, Toyomasa Katagiri. New therapeutics for luminal-type breast cancer targeting BIG3-PHB2 interaction. 第73回日本癌学会・学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

吉丸哲郎、小松正人、松尾泰祐、片桐豊雅。エストロゲン受容体制御分子BIG3を標的とした新規ER陽性乳がん治療法の創製、第18回日本がん分子標的治療学会、2014年6月26日、TKP ガーデンシティ仙台(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉丸 哲郎 (YOSHIMARU, Tetsuro)  
徳島大学・先端酵素学研究所・講師  
研究者番号：80424729

(2) 連携研究者

片桐 豊雅 (KATAGIRI, Toyomasa)  
徳島大学・先端酵素学研究所・教授  
研究者番号：60291895

三好 康雄 (MIYOSHI, Yasuo)  
兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50283784