

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293079

研究課題名(和文)新規エストロゲン受容体活性制御分子の生体機能解明と創薬研究

研究課題名(英文) Drug development and biological function study of novel estrogen receptor activity modulator BIG3 protein

研究代表者

片桐 豊雅 (KATAGIRI, Toyomasa)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：60291895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBIG3-PHB2相互作用を特異的に阻害する天然化合物キサントフモール(XN)を同定し、XNがエストロゲン受容体(ER)活性の抑制およびin vitro、in vivoのエストロゲン(E2)依存性乳がん抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。また、BIG3はPHB2の核内輸送因子KPNA1, 5, 6を介したE2依存性核内移行を阻害することも証明した。さらに、BIG3は脱リン酸化酵素と複合体を形成し、E2刺激下にてPHB2を脱リン酸化することを証明した。以上の成果は、BIG3-PHB2のE2依存性乳がん細胞増殖における役割の解明および新規乳がん治療薬の開発に繋がることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified that Xanthohumol a natural compound effectively inhibits the BIG3(former name; ERAP1)-PHB2 interaction, resulting in suppression of estrogen (E2)-dependent tumor growth of breast cancer in vitro and in vivo. In addition, we discovered that the mechanism by which BIG3 blocks the nuclear translocation of PHB2 via interactions with KPNA1, 5, and 6, in estrogen receptor (ER) -positive breast cancer cells. Moreover, we further demonstrated that BIG3 interacts serine/threonine protein phosphatase and dephosphorylates the E2-dependent phosphorylation of PHB2 in breast cancer cells. These findings can provide therapeutic strategies for controlling E2/ER signals in breast cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌 ゲノム 蛋白質 ホルモン

1. 研究開始当初の背景

乳癌の約 70%はホルモン (エストロゲン:E2) 依存性であり、その受容体(エストロゲン受容体:ER)の活性化を通じて増殖促進する。その機構としては、主に ER が転写調節因子として働く (ゲノムの活性化) 経路と細胞膜に局在する膜型 ER として細胞内リン酸化カスケードの活性化 (非ゲノムの活性化) する経路が報告されている。しかしながら、これらでは説明できない ER 陽性乳癌が認められており、その分子機構は未だ不明な点が多く、ER 制御機構の詳細な解明が望まれている。

申請者は、これまでに乳癌特異的に発現亢進を認める新規ER活性化制御分子BIG3 (Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3、旧名: ERAP1)を同定し、ER陽性乳癌細胞において、BIG3が細胞質にてER活性抑制因子PHB2 (Prohibitin2)と結合し、そのE2依存性核内移行を阻害することや膜型ERとの結合 (ゲノムのER活性と非ゲノムのER活性)を阻害することでERの恒常的活性化を導くことを証明した。しかしながら、BIG3は2000アミノ酸を超える巨大なタンパク質であるにも関わらず、*in silico*解析を通じて、そのアミノ酸配列から機能ドメインや他のタンパク質との相同性がほとんど認められないことやPHB2とは結合することがわかっているが、どのようにPHB2を制御するかも未だ不明であった。

最近、その解明の糸口として、申請者が開発したBIG3-PHB2結合阻害細胞膜透過性ペプチド(ERAPペプチド)をER陽性乳癌細胞に添加した際のPHB2のリン酸化状態を、抗セリンリン酸化抗体によるウエスタン法にて調べた。その結果、PHB2はBIG3と結合している時は、そのセリン残基のリン酸化は認められないが、BIG3との結合が阻害されると、E2依存的にそのセリン残基のリン酸化が認められることが判明した。

以上の結果は、以下の2つの可能性を意味する。① BIG3はPHB2結合することで、そのセリン残基を脱リン酸化する機能を有するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼの構成因子である可能性、② BIG3はPHB2をリン酸化するセリンキナーゼとの結合またはリン酸化反応を阻害する可能性が挙げられる。特に、1)の場合、セリン/スレオニンプロ

テインホスファターゼの多くが調節サブユニットと活性サブユニットから構成されるオリゴメリック酵素であることおよび、BIG3自体には活性ドメインが存在しないことから、BIG3はセリン/スレオニンプロテインホスファターゼの調節サブユニットとして機能し、その基質としてPHB2と結合して脱リン酸化することが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これらの可能性を証明することおよび、PHB2以外の新たな結合タンパク質の同定することで乳癌細胞におけるBIG3タンパク質の生体機能を解明することを目的とする。さらに、E2依存性乳癌細胞におけるBIG3標的治療薬開発のための基盤的研究をすすめる。

3. 研究の方法

以下の3つのテーマについて主に解析を行った。

(1) BIG3標的治療薬開発のために、BIG3-PHB2結合阻害化合物のスクリーニングおよびPHB2結合が報告されている天然化合物Xanthohumol(XN)のBIG3-PHB2相互作用阻害および抗腫瘍効果について検討した。

(2) 乳がん細胞におけるPHB2のE2依存性核内移行におけるBIG3の役割を調べた。

(3) BIG3に結合するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼファミリー活性サブユニットを検索し、PHB2の脱リン酸化について検討した。

4. 研究成果

(1) 我々はPHB2結合との結合が既に報告されていた天然化合物XNに着目し、XNのBIG3-PHB2相互作用に対する影響を調べた。XNは、これまで乳癌をはじめ多くの癌種において抗腫瘍効果を認めることが報告されている天然化合物であるが、エストロゲン(E2)依存性乳癌の細胞増殖に対する関与については不明であった。そこで、XNのER陽性乳癌におけるE2依存性の抗腫瘍効果について検討した。その結果、XNはPHB2と直接結合することで、BIG3とPHB2の相互作用を容量依存的に阻害した(図1)。この結果、BIG3から解放された

PHB2 は、自ら有する ER 活性の抑制機能を回復し、E2 依存性乳癌細胞株の細胞増殖を顕著に抑制した。さらに、ER 陽性乳癌細胞株を同所移植したヌードマウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍効果の検討においても、連日投与と同様に 4 日毎の投与においても顕著な抗腫瘍効果を認めた (図 2)。

図1 キサントフォームはERAPペプチドと同様にBIG3-PHB2相互作用を阻害する

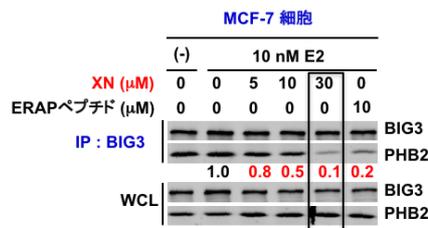
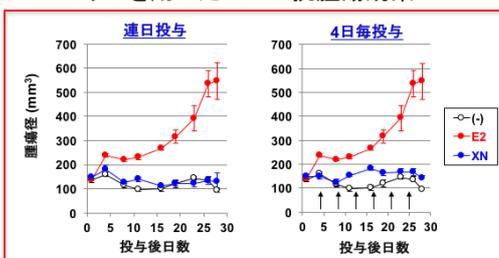
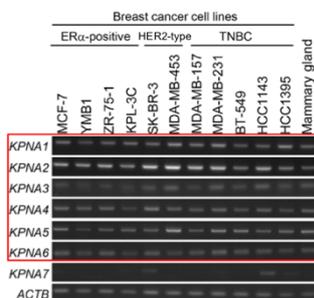


図2 ER陽性乳癌細胞株を同所移植したヌードマウスを用いた*in vivo*抗腫瘍効果



(2) 核内輸送タンパク質 (KNAs:Karyopherin alpha)の乳がん細胞 11種および正常乳腺組織における発現を半定量的 RT-PCR 法にて調べた結果、KPNA1-6 は正常乳腺組織および乳がん細胞株全てにおいて高い発現を認めた (図 3)。乳がん細胞にて発現

図3 乳癌細胞株におけるKNAsの発現



を認めた KPNA1-6 と PHB2 の相互作用について過剰発現系にて調べた結果、KPNA1, 2, 5, 6 のそれぞれと相互作用を認めた (図 4)。一方、E2

図4 過剰発現系によるPHB2と各KPNAとの結合

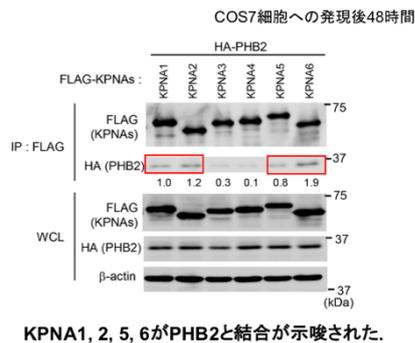
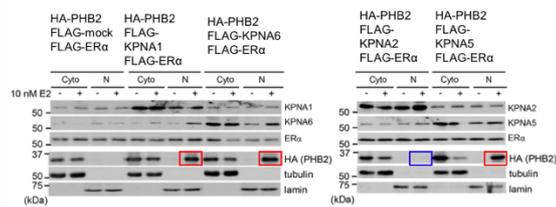


図5 PHB2はKPNA1, 5, 6を介して核内移行する



刺激下にて、KPNA1, 2, 5, 6 と PHB2 の細胞内局在を調べたところ、KPNA1, 5, 6 と PHB2 の共発現では PHB2 の核移行が認められたが、KPNA2 においては PHB2 の核移行が認められなかった (図 5)。これらの結果から、ERα 陽性乳がん細胞における PHB2 の E2 依存性核移行は KPNA1, 5, 6 を介して行われることが分かった。

以上から、BIG3 は KPNA1, 5, 6 の PHB2 への結合を競合的に阻害することで PHB2 の核内移行を阻害して、結果的に ERα 転写活性を恒常的に活性化させることが分かった。また、BIG3 と PHB2 の相互作用を ERAP ペプチドや BIG3 を siRNA によって発現抑制することで、KNAs と PHB2 の結合を促し、その結果として PHB2 の迅速な核内移行へと導き、ERα 活性の抑制を通じた E2 依存性乳がん増殖抑制となることを証明した。これらの結果から、BIG3-PHB2 を標的とした治療薬は乳がんの ERα 陽性乳がん、luminal タイプ乳がんに対する新たな治療法となることが示唆された。

(3) BIG3 はセリン/スレオニンプロテインホスファターゼファミリー活性サブユニットの 1 つ (PP) と複合体を形成して、E2 刺激下にて PHB2 を脱リン酸化することを証明した

(未発表)。

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 10 件)

- ① Kim N-H, Yoshimaru T, Chen Y, Matsuo T, Komatsu, Miyoshi Y, Tanaka E, Sasa M, Mizuguchi K, Katagiri T*. BIG3 inhibits the estrogen-dependent nuclear translocation of PHB2 via multiple Karyopherin-alpha proteins in breast cancer cells. *PLoS One*. 2015 Jun 8;10(6):e0127707. (査読有)
- ② 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*. 2015 May;106(5):550-558. (査読有)
- ③ Yanai A, Inoue N, Yagi T, Nishimukai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Enomoto Y, Takatsuka Y, Watanabe T, Hirota S, Sasa M, Katagiri T, Miyoshi Y. Activation of mTOR/S6K But Not MAPK Pathways Might Be Associated With High Ki-67, ER+, and HER2-Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2015 Jun;15(3):197-203. (査読有)
- ④ Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of novel epigenetically inactivated gene, *PAMR1* in breast carcinoma. *Oncol Rep*. 2015 Jan;33(1):267-273. (査読有)
- ⑤ 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 specific inhibition of BIG3-PHB2 interactions. *Sci Rep*. 2014 Dec 8;4:7355. (査読有)
- ⑥ Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T*. Early growth response 4 is involved in cell proliferation of small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes. *PLoS One*. 2014 Nov 20;9(11):e113606. (査読有)
- ⑦ 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 α helical structure. *BMC Res Notes*. 2014 Jul 6;7:435. (査読有)

⑧ Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS One* 2014 Jan 8;9(1):e85267. (査読有)

⑨ Matsuo T, Komatsu M, Yoshimaru T, Kiyotani K, Miyoshi Y, Sasa M, Katagiri T*. Involvement of B3GALNT2 overexpression in cell growth of breast cancer. *Int J Oncol*. 2014 Feb;44(2):427-434. (査読有)

⑩ Low SK, Takahashi A, Ashikawa K, Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide association study of breast cancer in the Japanese population. *PLoS One*. 2013 Oct 15;8(10):e76463. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

① Toyomasa Katagiri: Novel targeting therapeutic strategy for treatment of endocrine resistant breast cancer, The 34th Sapporo International Cancer Symposium, ロイトン札幌 (北海道、札幌) 2015年6月16日.

② Toyomasa Katagiri, Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa: Xanthohumol suppresses estrogen-signaling in endocrine resistant breast cancer through the specific inhibition of BIG3-PHB2 interactions. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2015, Philadelphia, USA, April 18, 2015.

③ Toyomasa Katagiri: Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome endocrine resistance in breast cancer cells, 2015 SNUCRI & SNUCH CANCER SYMPOSIUM, Hwasun, Korea, April 3, 2015.

④ Toyomasa Katagiri: A novel AKAP protein, BIG3 coordinates estrogen signaling pathways in breast cancer cells. 11th International

Conference on Protein Phosphatase, 東北大学
長陵会館ホール(宮城県、仙台) 2014年11月13
日。

⑤ 片桐豊雅: エストロゲン受容体活性化制御分子BIG3を標的とした新たな乳癌治療薬の開発。第23回日本乳癌学会総会、東京国際フォーラム(千代田区、東京) 2015年7月3日。

⑥ Toyomasa Katagiri, Tetsuro Yoshimaru, Masato Komatsu, Taisuke Matsuo, Yasuo Miyoshi, Mitsunori Sasa: BIG3- PHB2 Interaction is a key therapeutic target in luminal-type of breast cancer. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2014, San Diego, USA, April 6, 2014.

⑦ 片桐豊雅, New insight into therapeutic strategies for acquired endocrine resistant breast cancer. 第72回日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)、2013年10月5日

⑧ Toyomasa Katagiri: Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer by Reactivation of Tumor Suppressor Protein. 2013 SNUCRI & SNUCH CANCER SYMPOSIUM, JEJU, Korea, May 3, 2013.

⑨ Toyomasa Katagiri, Tomoya Fukawa, Taisuke Matsuo, Hiro-omi Kanayama: DDX31 regulates p53 tumor suppressive activity in renal cell carcinomas, American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013, Washington, D.C., USA, April 7, 2013.

[その他]

ホームページ:

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dgm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 豊雅 (KATAGIRI, Toyomasa)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授
研究者番号: 60291895

(2) 研究分担者

水口 賢司 (MIZUGUCHI, Kenji)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号: 50450896

(3) 連携研究者

吉丸 哲郎 (YOSHIMARU, Tetsuro)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・講師

研究者番号: 80424729

(3) 連携研究者

三好 康雄 (MIYOSHI, Yasuo)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50283784