

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05153

研究課題名(和文) 乳がん細胞における新規エストロゲン受容体活性制御分子BIG3の病態機能の解明

研究課題名(英文) Clarification of novel pathophysiological roles of BIG3 in breast cancer cells

研究代表者

片桐 豊雅 (KATAGIRI, Toyomasa)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授

研究者番号：60291895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、乳がんにて高頻度に発現亢進を認めるBIG3の病態生理機能の解明について、HER2陽性乳がんにおいて、HER2・EGF依存性のPHB2抑制活性に関係したリン酸化部位を同定し、そのリン酸化特異的抗体の樹立から免疫細胞染色法・生化学的実験にて、BIG3-PHB2複合体の細胞質およびミトコンドリアの局在を明らかにした。また、BIG3-PHB2相互作用阻害によるミトコンドリア形態異常惹起を観察し、BIG3-PHB2がミトコンドリア形態維持に重要な役割を担うこと証明した。さらに、BIG3-PHB2相互作用阻害ペプチドERAPの分子内架橋化による最適化を行い、その抗腫瘍効果向上に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんでは、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2の三大受容体の発現に基づいた治療薬が主流であるが、これら受容体の活性化機序は多岐にわたり、その陽性率だけで治療方針の決定ができない症例も少なくない。その原因として、申請者らが同定したBIG3による抑制因子PHB2の制御がこれまで知られていなかったことがあげられる。本研究における、BIG3複合体によるPHB2の抑制活性の制御介した乳がん細胞増殖機序の解明は、現在のこれら三大受容体の発現に基づいた治療指針を大きく変える可能性があり、未だ不明な点が多い乳がん細胞の増殖機構に重要な知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the pathophysiological functions of BIG3 that frequently up-regulated in breast cancers. In this study, we demonstrated the HER2-EGF signals-dependent phosphorylation sites for PHB2 inhibitory activity in HER2-positive breast cancer cells. Next, we generated the antibody which can specifically recognize each phosphorylation sites of PHB2 and demonstrated the specific cytoplasmic and mitochondrial localization of BIG3-PHB2 complex in HER2-positive breast cancer cells. Also, we observed mitochondrial morphological abnormalities caused by BIG3-PHB2 interaction inhibition, suggesting that BIG3-PHB2 plays an important role in maintaining mitochondrial morphology. Furthermore, we did optimization of BIG3-PHB2 interaction peptide inhibitor by intramolecular crosslinking methods, and succeed to improve its more antitumor effect.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：breast cancer estrogen signaling tumor suppressor phosphorylation dephosphorylation oncogenic signaling mitochondrial regulation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんの約70%はエストロゲン(E2)依存性であり、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経路と細胞膜直下に局在するERが膜型増殖因子受容体とのクロストークによる細胞内リン酸化カスケード活性化経路が報告されている。しかしながら、これらの活性化機構では説明できないER陽性乳がんが認められており、その分子機構は未だ不明な点が多く、詳細なER制御機構の解明が望まれている。申請者は、これまでに乳がん症例に高頻度に発現亢進を認める新規ER活性化制御分子BIG3(Brefeldin A-inhibited guanine exchange 3)を同定し、ER陽性乳がん細胞において、BIG3が細胞質にてER活性抑制因子PHB2(Prohibitin 2)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(*Cancer Sci*, 100: 1468, 2009; *Nat Commun*, 4: 2443, 2013)。しかしながら、BIG3は、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と結合することしか分かっておらず、その制御機構は未だ不明であった。

最近、その解明の糸口として、申請者らが開発したBIG3-PHB2結合阻害細胞膜透過性ペプチドERAPをER陽性乳がん細胞に添加した際に、E2依存的にPHB2のセリン残基のリン酸化が認められた。さらに、*in silico*解析からBIG3にはセリン/スレオニンプロテインホスファターゼPP1の結合配列が保存されていることが分かった。しかしながら、BIG3にはPP1の活性ドメインは存在しないことから、BIG3はPP1の調節サブユニットとして機能し、PHB2の脱リン酸化を導いて、ER抑制活性を制御するという仮説を立てた。

さらに、申請者らはこれまでに(1)乳がん細胞の細胞質以外にミトコンドリアにもBIG3-PHB2が局在すること、(2)BIG3-PHB2の結合阻害がE2依存性の活性酸素種ROSを減少させること、(3)PHB2がミトコンドリアのROS産生を制御するという報告があること(*Mol Biol Rep*, 41, 3033, 2014)から、BIG3(/PP1)-PHB2複合体のミトコンドリアでの機能解明が、がん細胞における新たなBIG3の生体機能の解明に繋がると考えた。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに乳がん臨床検体を用いた網羅的発現解析を通じて、乳がんにて高頻度に発現亢進を認める新規のエストロゲン受容体(ER)活性化制御分子BIG3(Brefeldin A-inhibited guanine exchange 3)を同定し、エストロゲン(E2)依存性乳がんにおいてBIG3がER活性抑制因子PHB2との結合を介してERの恒常的活性化に重要な役割を担うことを証明した。しかしながら、乳がん細胞におけるBIG3タンパク質の詳細な病態生理機能は未だ不明である。本研究では、BIG3のE2依存性乳がん細胞での役割の解明およびBIG3ノックアウトマウスを用いたBIG3の生理機能の解明を通じて、BIG3の発がん・進展に寄与する分子機構の解明とBIG3-PHB2創薬を目指す。

3. 研究の方法

本研究期間内では、(1)乳がん細胞におけるBIG3-PP1の結合・PHB2のリン酸化の責任キナーゼの同定およびリン酸化/脱リン酸化のER抑制活性への影響、(2)BIG3-PHB2複合体のミトコンドリアでの機能解明、(3)新規BIG3結合タンパク質の同定およびBIG3-PHB2結合阻害ペプチドの開発と抗腫瘍効果の検討、(4)BIG3-KOマウスの組織学的・生化学的解析、(5)大規模乳がん臨床検体を用いた免疫染色によるBIG3・PHB2の発現解析と臨床的所見の相関解析を通じたPP1/BIG3とPHB2の臨床的意義について検討する。

4. 研究成果

本研究期間にて、上述(4)については現在も解析続行中であるが、(1)(2)(3)(5)についての成果概要は下記の通りである。

(1)ER陽性乳がん細胞において、BIG3は、PP1およびPKAと複合体を形成し、エストロゲン依存性にPKAによってS305、S1208にてリン酸化されて、そのPP1阻害活性がキャンセルされることがわかった。その結果、PP1脱リン酸化酵素活性が亢進して、PP1の調整サブユニットとして機能するBIG3と、その基質であるPHB2が結合し、PHB2のS39のリン酸化が脱リン酸化に導かれることがわかった。そして、PHB2のS39のリン酸化の責任キナーゼであるPKCを同定した。これらのことから、BIG3に結合するPHB2にはPKCは結合できず、リン酸化不可能となることがわかった。さらに、BIG3-PHB2相互作用阻害ペプチドERAPを投与することによってBIG3から解離したPHB2には、迅速にPKCが結合して、PHB2のS39が迅速にリン酸化されることがわかった。以上のことから、BIG3-PKA-PP1複合体によるPHB2の脱リン酸化は抑制因子の新しい不活化機構であることを明らかにした。HER2陽性乳がんにおいて、HER2・EGFR活性化シグナル依存的PHB2リン酸化部位および各責任キナーゼを同定した。

(2)BIG3/PHB2複合体のミトコンドリアにおける機能を精査したところ、BIG3-PHB2相互作用阻害ペプチドERAP投与によるROSの産生増加とPHB2の核内への移行が認められた。さらに、BIG3/PHB2複合体のミトコンドリアにおける機能を精査したところ、BIG3-PHB2相互作用阻害ペプチドERAP投与によるROSの産生増加とPHB2の核内への移行が認められた。また、各PHB2リン酸化部位特異的抗体を作製し、免疫細胞染色法・生化学的手法にて、BIG3-PHB2複合体の細胞質およびミトコンドリア局在を明らかにした。続いて、ERAP投与にてミトコンドリアタンパク

質を安定性の低下によるミトコンドリア形態異常惹起を明らかにした。

(3)BIG3 高発現乳がん細胞において、BIG3/PHB2 相互作用阻害ペプチド ERAP 処理後の BIG3 および PHB2 抗体を用いた免疫沈降産物の質量分析解析を行い、複数の新規の BIG3 結合タンパクおよび PHB2 結合タンパク質を同定した。特に、数種のミトコンドリアタンパク質を BIG3-PHB2 複合体結合分子として同定した。続いて、ERAP の PHB2 結合部位が ヘリックス構造を示すことから、化学内架橋ペプチド(stERAP)の開発を試みた。その結果、stERAP は従来型 ERAP よりも PHB2 への親和性が亢進し、ヘリックス構造がより維持され、細胞膜および核内への移行が投与後 1 時間以内に迅速に認められた。さらに、プロテアーゼとしてキモトリプシン抵抗性の亢進が認められ、特に、乳がん細胞同所性移植ヌードマウスを用いた in vivo 抗腫瘍効果を 1 週間に 1 度の尾静脈投与にて導かれることを明らかにした。続いて、二重分子内架橋化 ERAP および D 体化、逆アミノ酸合成による ERAP ペプチドの長期持続した BIG3-PHB2 相互作用阻害および in vivo 抗腫瘍効果の促進に成功した。

(5)乳がん臨床検体収集を進め、そのうちの 100 例の HER2 陽性乳がん組織を用いて、BIG3, 各種 PHB2 リン酸化の発現を検証し、予後と相関関係にあることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Kato Y, Zembutsu H, Takata R, Matsuura T, Kato R, Kanehira M, Iwasaki K, Yamada N, Katagiri T, Sugai T, Fujioka T, Nakamura Y, *Obara W. A prospective study to examine the accuracies and efficacies of prediction systems for response to neoadjuvant chemotherapy for muscle invasive bladder. **Oncol Lett**. 査読有 2018 Nov;16(5):5775-5784. DOI: 10.3892/ol.2018.9330
2. Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T, Yoshida T, Nakamura S, Sugano K, Miki Y, Hirata M, Matsuda K, Spurdle AB, *Kubo M. Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. **Nat Commun**. 査読有 2018 Oct 4;9(1):4083. DOI: 10.1038/s41467-018-06581-8
3. Deng B, Tarhan YE, Ueda K, Ren L, Katagiri T, Park JH, *Nakamura Y. Critical role of estrogen receptor alpha O-glycosylation by N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GALNT6) in its nuclear localization in breast cancer cells. **Neoplasia**. 査読有 2018 Oct;20(10):1038-1044. DOI: 10.1016/j.neo.2018.08.006
4. Li HK, Sugyo A, Tsuji AB, Morokoshi Y, Minegishi K, Nagasu K, Kanda H, Harada Y, Nagayama S, Katagiri T, Nakamura Y, Higashi T, Hasegawa S. alpha-particle therapy for synovial sarcoma in the mouse using an astatine-211-labeled antibody against fizzled homolog 10. **Cancer Sci**. 査読有 2018 Jul;109(7):2302-2309. DOI: 10.1111/cas.13636
5. Giraudet AL, Cassier PA, Iwao-Fukukawa C, Garin G, Badel JN, Kryza D, Chabaud S, Gilles-Afchain L, Clapisson G, Desuzinges C, Sarrut D, Halty A, Italiano A, Mori M, Tsunoda T, Katagiri T, Nakamura Y, Alberti L, Cropet C, Baconnier S, Bergemontamat S, Pérol D, Blay JY. A first-in-human study investigating biodistribution, safety and recommended dose of a new radiolabeled MAb targeting FZD10 in metastatic synovial sarcoma patients. **BMC Cancer**. 査読有 2018 Jun 8;18(1):646. DOI: 10.1186/s12885-018-4544-x
6. Daizumoto K, Yoshimaru T, Matsushita Y, Fukawa T, Uehara H, Ono M, Komatsu M, Kanayama H, *Katagiri T. A DDX31/mutant-p53/EGFR axis promotes multistep progression of muscle invasive bladder cancer. **Cancer Res.**, 査読有 2018 May 1;78(9):2233-2247. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2528
7. Miyagawa Y, Matsushita Y, Suzuki H, Komatsu M, Yoshimaru T, Kimura R, Yanai A, Honda J, Tangoku A, Sasa M, Miyoshi Y, *Katagiri T. Frequent downregulation of *LRRC26* by epigenetic alterations is involved in the malignant progression of triple-negative breast cancers. **Int J Oncol**. 査読有 2018 Mar 5. DOI: 10.3892/ijo.2018.4301
8. Nishimukai A, Inoue N, Kira A, Takeda M, Morimoto K, Araki K, Kitajima K, Fukushima K, Watanabe T, Hirota S, Katagiri T, Nakamori S, Akazawa K, *Miyoshi Y. Tumor size and proliferative marker geminin rather than Ki67 expression levels significantly associated with maximum uptake of 18F-deoxyglucose levels on positron emission tomography for operated breast cancers. **PLoS One**. 査読有 2017 Sep 8;12(9):e0184508. DOI: 10.1371/journal.pone.0184508.
9. 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 signaling in breast cancer cells. **Nat Commun**. 査読有 2017 May 30;8:15427. DOI: 10.1038/ncomms15427

10. 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 extends potent antitumor activity for breast cancer therapeutics. *Sci Rep*. 査読有 2017 May 12; 7(1):1821. DOI:10.1038/s41598-017-01951-6
11. Iwamoto T, Katagiri T, Niikura N, Miyoshi Y, Kochi M, Nogami T, Shien T, Motoki T, Taira N, Omori M, Tokuda Y, Fujiwara T, Doihara H, Gyorffy B, Matsuoka J. Immunohistochemical Ki67 after short-term hormone therapy identifies low-risk breast cancers as reliably as genomic markers. *Oncotarget*. 査読有 2017 Apr 18;8(16):26122-26128.DOI: 10.18632/oncotarget.15385

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Toyomasa Katagiri. Targeting RHBDL2-SLC1A5 axis to overcome chemoresistance and progression in triple negative breast cancer. International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) Annual Meeting 2019 (招待講演) (国際学会) 2019 年.
2. Toyomasa Katagiri. Comprehensive molecular features of triple negative breast cancers. The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. 2018 年
3. Toyomasa Katagiri. Novel therapeutic strategy for breast cancer utilizing activation of tumor suppressor PHB2. The 34th Radiation Biology Center International Symposium (招待講演) 2018 年
4. 吉丸哲郎, 松下洋輔, 片桐豊雅. 新規 A キナーゼアンカータンパク質 BIG3 による抑制因子 PHB2 の制御は HER2 乳癌細胞増殖に必須である. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018 年
5. 吉丸哲郎, 松下洋輔, 笹三徳, 三好康雄, 片桐豊雅. BIG3-PKA-PP1C 複合体による癌抑制因子 PHB2 不活性化を介したトラスツズマブ耐性乳癌増殖機構と新規治療法開発. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年
6. 片桐豊雅. 乳がん細胞における小胞体-ゴルジ体間シャトルを通じた IRE1 活性化機構の解明. 第 91 回日本生化学会大会. 2018 年
7. Toyomasa Katagiri. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumor activity for breast cancer therapeutics. Society of Precision Cancer Medicine Annual Meeting 2018 (招待講演) (国際学会) 2018 年.
8. Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Sasa Mitsunori, Miyoshi Yasuo and Toyomasa Katagiri. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer by utilizing PHB2, a tumor suppressor of multiple resistance pathways. American Association for Cancer Research ANNUAL MEETING 2018 (国際学会) 2018 年.
9. Toyomasa Katagiri, Kei Daizumoto, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Tomoya Fukawa, Ono Masaya and Hiro-omi Kanayama. DDX31 cooperates with mutant p53 and EGFR to promote the multistep progression of invasive bladder cancer. American Association For Cancer Research ANNUAL MEETING 2018 (国際学会) 2018 年.
10. Toyomasa Katagiri. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumor activity for breast cancer therapeutics. International Society of Precision Cancer Medicine Annual Meeting 2018 (招待講演) (国際学会) 2018 年
11. 片桐豊雅. がん抑制因子活性化を利用して新規乳がん治療薬の開発. KOBOR 研究会(招待講演) 2018 年
12. 片桐豊雅. ホルモン依存性乳がん治療の刷新を目指したがん抑制因子活性化による新規治療薬の開発. 第 25 回日本乳癌学会学術総会 (招待講演) 2017 年
13. 片桐豊雅. 新たなホルモン依存性乳がん治療薬の開発を目指して. 第 42 回日本外科系連合学会学術集会 (招待講演) 2017 年
14. Toyomasa Katagiri. Development of chemically modified peptide inhibitor ERAP targeting BIG3-PHB2 complex on hormone-resistant breast tumor. 米国癌学会 American Association For Cancer Research ANNUAL MEETING 2017 (国際学会) 2017 年
15. Tetsuro Yoshimaru and Toyomasa Katagiri. Development of chemically modified peptide inhibitor ERAP targeting BIG3-PHB2 complex on hormone-resistant breast cancer. 2nd International Symposium of Molecular Medicine in Tokushima University (国際学会) 2017 年
16. Toyomasa Katagiri. Regulation of estrogen/ estrogen receptor signalings in breast cancer cells. 11th International Symposium of The Institute Network. "Frontiers in Biomedical Sciences". (国際学会) 2016 年
17. Tetsuro Yoshimaru, Ono Masaya, Mizuguchi Kenji, Miyoshi Yasuo, Mitsunori Sasa and Toyomasa Katagiri. A novel A-kinase anchoring protein BIG3, coordinates estrogen signalling in breast cancer cells. The 12th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会) 2016 年
18. 粟飯原圭佑, 吉丸哲郎, 小松正人, 重永章, 片桐豊雅, 大高章. Development of stapled peptides targeting BIG3-PHB2 interaction in breast cancer cells. 第 53 回ペプチド討

論会/日本ペプチド学会.2016年

19. 吉丸哲郎, 松下洋輔, 小松正人, 岡崎泰昌, 豊國伸哉, 笹三徳, 三好康雄, 片桐豊雅., 内分泌療法耐性乳がんに対する BIG3-PHB2 相互作用阻害ペプチドの開発, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年
20. 片桐豊雅, Novel targeting therapeutic strategy for estrogen-dependent breast cancer, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年
21. 瀧亮祐, 吉丸哲郎, 大豆本圭, 松下洋輔, 木村竜一郎, 尾野雅哉, 片桐豊雅. BIG3-PHB2 相互作用を標的とした前立腺がん治療法の開発の可能性, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年
22. 片桐豊雅, 相互作用阻害によるがん抑制因子の再活性化を利用した難治性乳がんに対する新規治療薬の開発, 構造活性フォーラム 2016 (招待講演) 2016 年
23. 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学術集会, 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：吉丸 哲郎
ローマ字氏名：(YOSHIMARU, Tetsuro)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：先端酵素学研究所 (プロテオ)
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：80424729

研究協力者氏名：松下 洋輔
ローマ字氏名：(MATSUSHITA, Yosuke)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：先端酵素学研究所 (プロテオ)
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：70634450

研究協力者氏名：尾野 雅哉
ローマ字氏名：(ONO, Masaya)
所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター
部局名：研究所
職名：ユニット長
研究者番号 (8 桁)：00270900

研究協力者氏名：水口 賢司
ローマ字氏名：(MUZUGUCHI, Kenji)
所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
部局名：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
職名：プロジェクトリーダー
研究者番号(8桁)：50450896

研究協力者氏名：大高 章
ローマ字氏名：(OTAKA, Akira)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部(薬学系)
職名：教授
研究者番号(8桁)：20201973

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、研究者個人に帰属されます。