

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10551

研究課題名(和文) ミトコンドリアを介した活性酸素制御による乳癌のホルモン療法耐性機構の解明

研究課題名(英文) Acquired resistance to hormone therapy of breast cancer by mitochondrial reactive oxygen species

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)・准教授

研究者番号：80424729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌特異的足場タンパク質BIG3による腫瘍抑制因子PHB2の抑制機能制御が、エストロゲン依存性乳癌の細胞増殖に必須であること、さらに、BIG3-PHB2相互作用を標的とした結合阻害ペプチドを開発し、その投与によってBIG3から解放されたPHB2の腫瘍抑制機能の再活性化を利用した新たな治療法を提唱している。本研究は、BIG3-PHB2複合体が乳癌細胞のミトコンドリアにも局在し、活性酸素種(ROS)を介して耐性獲得シグナルを制御している可能性を示した。したがって、ミトコンドリアにおけるBIG3-PHB2複合体のROS産生制御が、包括的な薬剤耐性獲得機序の解明に繋がるキーポイントになると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモン依存性乳癌の治療は主に内分泌療法が施行されるが、奏功症例でも長期服用による耐性獲得を生じてしまい、二次内分泌療法がほとんど奏功せず、化学療法に頼らざるを得ない。これらの原因として、エストロゲン受容体(ER)の陰転化、細胞膜直下のERと膜型受容体のクロストークによるリン酸化カスケードの活性化など複数のエストロゲン・シグナルの活性化や血管新生因子の発現亢進などが報告されているが、その解明には未だ至っていない。したがって、ホルモン療法耐性獲得機序の包括的な解明は、効果的な治療成績の向上に繋がり、多大な社会的、経済的インパクトを提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that Brefeldin A-Inhibited Guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) functions as an A-kinase anchoring protein that binds PKA and PP1C in luminal-type breast cancers, thereby dephosphorylating and inactivating tumor suppressor, prohibitin2 (PHB2). We developed stERAP, a peptide inhibitor targeting the BIG3-PHB2 interaction, resulting in growth suppression through transcriptional regulation by the nuclear-translocation of PHB2. Notably, we newly observed that BIG3-PHB2 complex is localized in the mitochondria of refractory breast cancer cells, and regulates the mitochondrial reactive oxygen species (MtROS). Treatment with stERAP suppressed the MtROS production by estrogen stimulation, leading to global suppression efficacy of gene expression. It is suggested that regulation of MtROS production by mitochondrial BIG3-PHB2 complexes contribute to malignancy and/or acquired resistance to hormone therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳癌 活性酸素 薬剤耐性 ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において女性が罹る癌のなかで最も頻度の高い乳癌の約 70%は女性ホルモンであるエストロゲン (E2) 依存性であり、E2 によって発生、増殖、進展が促進される。その治療薬としては、抗 E2 製剤であるタモキシフェン、アロマターゼ阻害剤、フルベストラントや mTOR 阻害剤エペロリムスが近年臨床応用され、乳癌の薬物治療に大きく貢献している。しかしながら、約 30%の患者は不応性であること、その長期投与は耐性獲得に至り再発を来すこと、再発後の内分泌療法が奏効せず、化学療法に頼らざるを得ないことが臨床上大きな課題となっているが、ホルモン療法に対する耐性獲得機構は未だ解明されていない。近年、乳癌をはじめとする癌細胞や癌組織における活性酸素種 (ROS) の顕著な増加が観察され (Nat Rev Drug Discov, 8, 579, 2009)、細胞増殖シグナルの活性化、生理的な細胞死経路の抑制、血管新生の亢進、薬剤耐性の獲得など多様なシグナルへの関与が報告されており、ROS の主な産生源であるミトコンドリアを制御することが癌細胞の悪性形質化および薬剤耐性獲得機序の包括的な解明に繋がることが推論される。

### 2. 研究の目的

乳癌は、内分泌療法に対して不応な症例や治療初期には奏効するものの経過とともに耐性を獲得して再発する症例があり、臨床上大きな問題となっている。これまでに乳癌に高頻度に発現亢進している BIG3 が癌抑制分子 PHB2 の抑制機能を制御してエストロゲン依存性の乳癌細胞の増殖を促進していること、さらに、BIG3-PHB2 相互作用阻害ペプチドを開発し、その投与が BIG3 から PHB2 を遊離させ、その抑制機能の再活性化を利用した乳癌抗腫瘍効果を証明してきた。本研究は、BIG3-PHB2 複合体がミトコンドリアにも局在することから、BIG3-PHB2 結合阻害ペプチドのミトコンドリア由来活性酸素種 (ROS) 制御に着目し、乳癌細胞における ROS 動態関連シグナルの網羅的解析を通じて、乳癌におけるホルモン療法耐性機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) BIG3およびPHB2の局在

BIG3およびPHB2の局在は、サイトゾル/核/ミトコンドリアの単離キットを用いて、各画分を精製し、BIG3およびPHB2のタンパク質発現をwestern blottingにより検討した。また、BIG3-PHB2結合阻害ペプチドによりBIG3から遊離したPHB2の挙動を蛍光顕微鏡で評価した。

#### (2) 活性酸素の測定法

癌細胞はミトコンドリア由来 ROS の細胞質への過剰産生により悪性を獲得するという知見から、ミトコンドリアの BIG3-PHB2 複合体がミトコンドリア ROS の産生亢進に関与して細胞増殖亢進や薬剤療法耐性を導くという仮説を立てた。そこで、細胞質内 ROS 産生およびミトコンドリア内 ROS 産生を、酸化感受性プローブ dihydrodichlorofluorescein およびミトコンドリア局在性酸化プローブ dihydrorhodamine123 を用いて FACS により算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) BIG3-PHB2複合体の局在

これまでにBIG3は細胞質に局在するアンカータンパク質として機能することを報告し、腫瘍抑制因子PHB2の抑制機能制御がエストロゲン依存性乳癌の細胞増殖に必須であることを明らかにしてきた。今回、BIG3およびPHB2の局在を、サイトゾル・核・ミトコンドリアの各画分のwestern blotting、および蛍光顕微鏡で詳細に検証した。その結果、BIG3とPHB2はサイトゾルに加えてミトコンドリアにも局在することが明らかになり、ミトコンドリア関連シグナルを制御している可能性を示唆していた。また、BIG3-PHB2結合阻害ペプチド処理は、大部分のPHB2を細胞質およびミトコンドリアから核に移行することを認めた。これらのPHB2の挙動は、蛍光顕微鏡の免疫染色図からも裏付けられた。したがって、BIG3は乳癌細胞の細胞質およびミトコンドリアにPHB2を係留することで、PHB2の抑制活性を喪失させて乳がん細胞の増殖・進展に寄与していると考えられた。

#### (2) PHB2の抑制機能を再活性化したときの遺伝子発現解析

BIG3-PHB2相互作用の阻害によりPHB2を再活性化したときのタンパク質および遺伝子発現の変動をプロテオーム解析およびトランスクリプトーム解析により調査した。BIG3-PHB2結合阻害ペプチドによりBIG3から遊離したPHB2は、E2依存性に核に移行し、E2応答遺伝子の発現抑制に加え、グローバルに迅速な遺伝子発現の抑制効果を示した。さらに、結合阻害ペプチドは、既報のエストロゲン・シグナルに加え、耐性獲得機序を解除できる膜型受容体を介した細胞増殖関連パスウェイやミトコンドリア関連シグナルを制御している可能性を見出している。このことは、BIG3によるPHB2の抑制機能の喪失が包括的な発癌進展機構に関与することを示唆するものである。

#### (3) ミトコンドリア内ROSの制御による腫瘍抑制の可能性

BIG3-PHB2複合体がミトコンドリア内に局在することに着目し、BIG3-PHB2複合体とミトコンドリア内活性酸素 (MtROS) の関連性、およびBIG3-PHB2結合阻害ペプチドがエストロゲン刺激によるミトコンドリア内活性酸素の産生に及ぼす影響を検討した。まず、24時間のエストロゲン

刺激により ROS が産生されるどうかを評価したところ、細胞質内 ROS が顕著に産生され、結合阻害ペプチドにより 81%の抑制を示した。また、コントロールとして用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による ROS 産生に対しても結合阻害ペプチドは抑制する傾向にあった(73%の抑制率)。さらに、エストロゲン刺激により MtROS の産生も認められたが、結合阻害ペプチドは顕著に抑制していた(84%の抑制率)。これらの事実は、結合阻害ペプチドにより BIG3 から遊離したミトコンドリア内 PHB2 が、ミトコンドリア由来の ROS 産生を強く抑制することを強く示唆しているが、ミトコンドリア以外(細胞膜 ER および膜型受容体を介した)ROS 産生機構を制御する可能性も考えられた。

(4) トラスツズマブ耐性HER2陽性乳癌におけるミトコンドリア内活性酸素の関与  
TCGA データセットによると、BIG3 は HER2 陽性乳癌患者の腫瘍部位でも強く発現していること、特に、再発患者で強く発現していること、BIG3 の発現強度と無再発生存期間には有意な相関関係が存在することが明らかになっている。そこで、抗 HER2 抗体トラスツズマブに対する耐性細胞株を入手し、ミトコンドリア内 ROS の感受性プローブ DHR123 により MtROS の産生を比較した。その結果、トラスツズマブ耐性細胞株の MtROS 産生は親株より顕著に高いことが認められ、MtROS がトラスツズマブ耐性に関与することが考えられた。次に、親株と耐性細胞株の MtROS に対する BIG3-PHB2 結合阻害ペプチドおよびトラスツズマブの影響を検討した。トラスツズマブ処理は MtROS の産生にほとんど影響しなかったのに対して、結合阻害ペプチドは各細胞株の MtROS 産生を 80%、81%まで顕著に抑制できたことから、結合阻害ペプチドは MtROS 産生の抑制を介して耐性獲得シグナルを制御できることが示唆された。

(5) 結論  
公共データベースの統計解析から BIG3 は乳癌のすべてのサブタイプ( luminal 型、HER2 型、TNBC 型) で予後と相関することを認め、BIG3-PHB2 複合体の存在が乳癌の進展・悪性化に関与していることが考えられた。興味深いことに、BIG3-PHB2 複合体は難治性乳癌細胞のミトコンドリアに局在し、ROS を介して耐性シグナルを制御している可能性を示した。したがって、ミトコンドリアにおける BIG3-PHB2 複合体の ROS 産生制御機構の解明が、悪性形質化および薬剤耐性獲得機序の包括的な解明に繋がるキーポイントのひとつになると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chigira T, Nagatoishi S, Takeda H, Yoshimaru T, Katagiri T, Tsumoto K	4. 巻 518
2. 論文標題 Biophysical characterization of the breast cancer-related BIG3-PHB2 interaction: Effect of non-conserved loop region of BIG3 on the structure and the interaction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.028.	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 吉丸哲郎、片桐豊雅	4. 巻 74
2. 論文標題 分子内架橋型BIG3-PHB2相互作用ペプチドによるホルモン依存性乳がんの新規治療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 115-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 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	4. 巻 8
2. 論文標題 A-kinase anchoring protein BIG3 coordinates oestrogen signalling in breast cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 15427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ncomms15427.	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 Yoshimaru T, Aihara K, Komatsu M, Matsushita Y, Okazaki Y, Toyokuni S, Honda J, Sasa M, Miyoshi Y, Otaka A, Katagiri T	4. 巻 7
2. 論文標題 Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates antitumour activity for breast cancer therapeutics.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-01951-6.	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 Shikata Y, Yoshimaru T, Komatsu M, Katoh H, Sato R, Kanagaki S, Okazaki Y, Toyokuni S, Tashiro E, Ishikawa S, Katagiri T, Imoto M	4. 巻 108
2. 論文標題 Protein kinase A inhibition facilitates the antitumor activity of xanthohumol, a valosin-containing protein inhibitor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 785-794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13175.	査読の有無 無
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9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 PHB2 inactivation by AKAP-BIG3 is required for progression of HER2-overexpressing breast cancer.
3. 学会等名 Annual meeting of American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉丸哲郎、松下洋輔、笹 三徳、三好康雄、片桐豊雅
2. 発表標題 トラスツズマブ耐性乳がんに関連したBIG3-PHB2相互作用標的治療薬の開発
3. 学会等名 第78回日本癌学会・学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉丸哲郎、松下洋輔、片桐豊雅
2. 発表標題 BIG3複合体によるがん抑制因子PHB2の不活性化を介したトラスツズマブ耐性乳がんの増殖機構と新規治療法
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer by utilizing PHB2, a tumor suppressor of multiple resistance pathways,
3. 学会等名 American Association for Cancer Research ANNUAL MEETING 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 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マブ耐性乳癌増殖機構と新規治療法開発
3. 学会等名 第77回日本癌学会・学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉丸哲郎、松下洋輔、片桐豊雅
2. 発表標題 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の制御がHER2乳癌細胞の増殖に必須である
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuro Yoshimaru, Masaya Ona, Yosuke Matsushita, Masato Komatsu, Mitsunori Sasa, Yasuo Miyoshi, Toyomasa Katagiri
2. 発表標題 A novel A-kinase anchoring protein BIG3 coordinates estrogen signaling in breast cancer cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会・学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉丸哲郎、松下洋輔、片桐豊雅
2. 発表標題 分子内架橋型BIG3-PHB2相互作用阻害ペプチドERAPによるホルモン依存性乳がん新規治療法の開発
3. 学会等名 第21回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉丸哲郎、片桐豊雅
2. 発表標題 ホルモン陽性乳がんに対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第78回徳島乳腺研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永井良三、加藤益弘、山崎力、田中俊博、宮川清、岡田尚巳、金田安史、長尾知生子、岩部美紀、山西芳裕、小出大介、辻真博、益尾憲、小林哲大、藤本臣哉、山本雄介、吉丸哲郎、片桐豊雅、野村渉、矢野恒夫、他8名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 126
3. 書名 Precision Medicine	

〔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
連携研究者	片桐 豊雅  (KATAGIRI Toyomasa)  (60291895)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授    (16101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	三好 康雄  (MIYOSHI Yasuo)  (50283784)	兵庫医科大学・医学部・教授    (34519)	