

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16510

研究課題名(和文) 乳癌細胞の不均一性を制御するCullin3ユビキチンリーガーゼ複合体の同定と解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ubiquitin E3 complex scaffold protein, Cullin-3 in breast cancer cells

研究代表者

村上 朱里 (Murakami, Akari)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60722593

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)：乳癌はその遺伝子発現や増殖能等で幾つかのサブタイプに分類され、このサブタイプ毎に治療方針も異なる。即ち、乳癌の特性を制御する分子機構を詳細に解明する事は新しい乳癌治療の開発においても大変重要である。本研究において申請者はユビキチンE3複合体足場タンパク質Cullin-3 (CUL3)の乳癌細胞における機能解析を細胞生物学的手法及び、生化学的手法を用いて解析した。その結果、HER2陽性乳癌細胞特異的なCUL3システムによるRac1の活性化機構と細胞増殖機構を解明する事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HER2陽性乳癌細胞で予後を規定するRac1の新しい活性化機構として、CUL3/KCTD10/RhoB軸の同定に成功した。今後は、CUL3/KCTD10依存的に活性化されるRac1の詳細な生理機能の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human breast cancer can be classified by gene expression into four or five subtypes, and the treatment plans are decided based on the subtypes. From this standpoint, it is important to elucidate molecular mechanisms of the determination of breast cancer characteristics, which could lead to the development of novel therapy for breast cancers. In this research proposal, we focused on a ubiquitin E3 scaffold protein, cullin-3 (CUL3), and found that CUL3 is essential for Rac1 activation and cell proliferation specifically in HER2-positive breast cancer cells.

研究分野：乳癌外科学

キーワード：乳癌 CUL3 細胞特性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学治療において大きな問題なのが、癌の不均一性 (heterogeneity) である。この不均一性が抗癌剤、放射線への抵抗性獲得の原因の一つとされており、特に自己複製能、多分化能を有する『癌幹細胞』が不均一性の根源と考えられているため、癌幹細胞を標的にすることが癌化学治療に極めて重要であると考えられている。しかし、癌幹細胞の維持・生存機構や多分化能制御機構は未だ明らかにされていない。即ち、新たな乳癌治療法を開発するためにも、種々の乳癌サブタイプ由来の乳癌細胞の幹細胞性をはじめとした細胞特性の制御機構を詳細に解明する事は非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

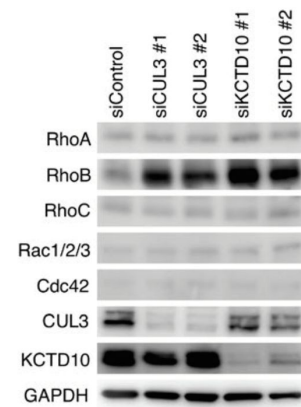
申請者が所属する研究チームはユビキチン E3 複合体足場タンパク質 Cullin-3 (CUL3) の機能を血管内皮細胞及び、各種癌細胞で解析してきた。その中で、申請者は CUL3 が乳癌細胞の幹細胞性を制御する事を突き止めた。CUL3 は 183 種類の基質認識受容体 BTBP を選択することで、多種多様な基質タンパク質のユビキチン化を促し、細胞機能を発揮する。この CUL3/BTBP の多様性から申請者は、CUL3 が乳癌細胞の幹細胞性のみならず、他の細胞特性 (細胞増殖、細胞移動、細胞膜形態変化等) を制御している可能性があると考えた。特に、細胞形態変化、シグナル伝達、物質輸送、細胞分裂を制御する「細胞骨格」は乳癌細胞の幹細胞性/細胞増殖/細胞移動/細胞膜形態変化において極めて重要な機能を果たす。そこで本研究では、CUL3 の乳癌細胞における詳細な機能解析及び、その分子基盤の解明を「細胞骨格制御」に焦点を当て、遂行した。

3. 研究の方法

乳癌細胞株として、HER2 陽性乳癌細胞株 SKBR-3 cells、Luminal タイプ乳癌細胞株 MCF-7 cells、Basal タイプ乳癌細胞株 MDA-MB-231 cells を使用した。遺伝子の発現抑制は siRNA をトランスフェクションする事により行った。Rac1 の活性化は Rac1-FRET ライブイメージングを用いた。細胞膜形態は走査型電子顕微鏡により観察した。Rac1 の予後解析は METABRIC database を用いた。

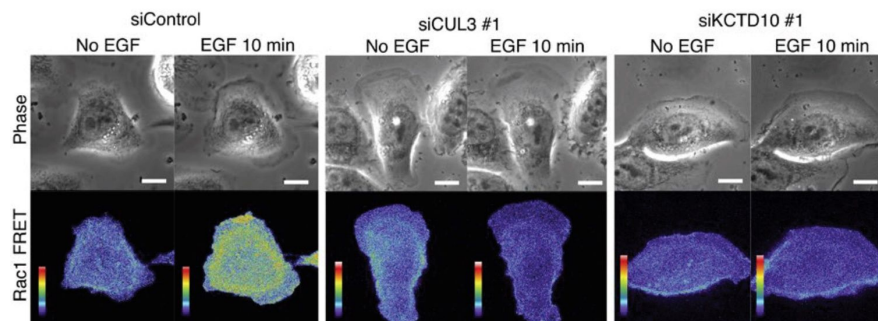
4. 研究成果

(1) 主要な細胞骨格の一つであるアクチンは重合と脱重合を繰り返す事で、細胞形態を制御する。このアクチン再構成を制御する small GTPase として、RhoB が知られている。近年、申請者の研究チームは、血管内皮細胞において RhoB が CUL3 及び、その BTBP の一つである KCTD10 によりユビキチン化を受け、分解に導かれる事を報告した (Kovacevic *et al.*, J. Cell Biol. 2018)。そこでまず、当該システムの乳癌細胞株における保存性を検証した。その結果、HER2 陽性乳癌細胞株 SKBR-3 cells において、CUL3 または、KCTD10 の発現抑制により、RhoB のタンパク質の蓄積が認められた (図 1)。興味深い事に、他の乳癌サブタイプの細胞株 MCF-7 cells、MDA-MB-231 cells においては、このような現象は見られなかった。SKBR-3 cells に対して、プロテアソーム阻害剤または、ライソソーム阻害剤を処理しても、RhoB のタンパク質の蓄積が認められた。以上の結果から、乳癌細胞においては、HER2 陽性乳癌細胞株特異的に、CUL3/KCTD10 複合体が RhoB をユビキチン化し、常に分解に導き、そのタンパク質レベルでの発現を低く保っている事が分かった。



【図1】SKBR-3 cellsでCUL3または、KCTD10を発現抑制するとRhoBのタンパク質が蓄積する。

(2) RhoB は細胞内小胞エンドソームに局在する small GTPase であり、種々の分子の細胞内膜輸送を制御する事が知られている。RhoB とは異なる small GTPase である Rac1 は、RhoB によりエンドソームから細胞膜への輸送とその後の活性化が「負に」制御される事が知られている。そこで CUL3 または、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では、分解されずに蓄積した RhoB が Rac1 を細胞内にトラップしていると考え、細胞染色を行なった。その結果、CUL3 または、KCTD10 の発現抑制により、Rac1 がエンドソームに局在変化し、その一部は RhoB と共同局在する事が分かった。この結果は、CUL3 または、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では Rac1 が細胞膜へ輸送されず、活性化されない事を強く示唆するものである。次に Rac1-FRET イメージングにより、

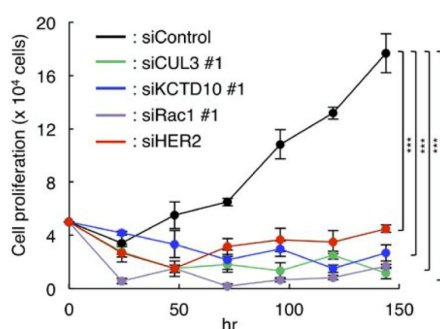


【図2】SKBR-3 cellsでCUL3または、KCTD10を発現抑制するとEGF刺激依存的なRac1の活性化が見られない。

Rac1 の活性化を可視化した。その結果、EGF 刺激依存的な Rac1 の活性化が、CUL3 または、KCTD10 の発現抑制により、著しく阻害された (図 2)。以上の結果から、SKBR-3 cells では、CUL3/KCTD10 複合体が RhoB を常に分解に導き、その発現を低く保つ事で、EGF 刺激依存的な Rac1 の活性化を可能にしている事が強く示唆された。

(3) Rac1 は細胞増殖や細胞移動を制御する small GTPase であり、腫瘍形成、転移においては、oncogene として機能する事が知られている。そこで、Rac1 の mRNA 発現と乳癌患者の予後との相関解析を METABRIC database を用いて実施した。その結果、乳癌患者全体では、Rac1 の発現と予後に相関は見られなかったが、HER2 陽性乳癌患者においては、Rac1 の発現が高い方がその予後が有意に悪いという結果が得られた。重要な事に、他の乳癌サブタイプでは、Rac1 の発現が高い方がその予後が悪いという結果は得られなかった。以上の結果から、Rac1 の HER2 陽性乳癌における重要性が臨床的な立場からも明らかになった。

(4) HER2 陽性乳癌細胞株特異的な CUL3/KCTD10/RhoB 軸による Rac1 活性化機構のリードアウトとして、EGF 刺激依存的な細胞膜形態変化及び、細胞増殖を検証した。走査型電子顕微鏡により EGF 刺激時における細胞膜を観察した所、コントロールの SKBR-3 cells では Rac1 依存的に形成されるラッフル膜の形成が観察された。一方で、CUL3 または、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では、EGF 刺激依存的なラッフル膜の形成が見られず、「月餅」のような形態



【図3】 SKBR-3 cells で CUL3 または、KCTD10 を発現抑制すると HER2、Rac1 の発現抑制時と同様に細胞増殖が阻害される。(n=3, ***, p<0.001)

を呈し、ラメリポディア形成が優位になった。次に、細胞増殖試験を行なった所、CUL3 または、KCTD10 の発現抑制により、HER2 や Rac1 の発現抑制時と同様に、細胞増殖が著しく阻害された (図 3)。以上の結果より、SKBR-3 cells では、CUL3/KCTD10 複合体が RhoB を常に分解に導き、その発現を低く保つ事で、EGF 刺激依存的な Rac1 の活性化を可能にし、それに伴う細胞膜形態変化と細胞増殖を亢進する事が分かった。

(5) HER2 陽性乳癌細胞を特徴付ける HER2 自身は Rac1 の活性化や細胞増殖に必須である。そこで最後に、CUL3/KCTD10/RhoB 軸と HER2 signal の上下関係を検証した。SKBR-3 cells において、HER2 発現抑制または、HER2 阻害剤処理をしても、CUL3、KCTD10、RhoB のタンパク質量に変化は無く、RhoB の細胞内局在もエンドソーム局在を保ったままであった。また逆に、CUL3 や KCTD10 を発現抑制しても、HER2 及び、EGFR の細胞膜局在や発現量には影響は見られなかった。以上の結果から、CUL3/KCTD10/RhoB 軸と EGFR/HER2 signal 経路はお互いに independent に機能している事が強く示唆された。本研究を通して、CUL3/KCTD10/RhoB 軸を HER2 陽性乳癌細胞特異的な新しい Rac1 活性化機構として導出する事ができた (Murakami *et al.*, Cancer Sci. 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(論文 1) [Akari Murakami](#), Masashi Maekawa, Katsuhisa Kawai, Jun Nakayama, Nobukazu Araki, Kentaro Semba, Tomohiko Taguchi, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada, Shigeki Higashiyama: Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. Cancer Science 650-661, 2019 DOI: 10.1111/cas.13899 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

(発表 1) [Akari Murakami](#), Masashi Maekawa, Katsuhisa Kawai, Jun Nakayama, Nobukazu Araki, Kentaro Semba, Tomohiko Taguchi, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada and Shigeki Higashiyama.

Novel mechanisms of Rac1 activation by the Cullin-3/KCTD10 ubiquitin E3 complex in HER2-positive breast cancer. 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium.

San Antonio Breast Cancer Symposium 2018

(発表 2) [村上朱里](#)、前川大志、川合克久ら CUL3 型ユビキチン E3 複合体は HER2 陽性乳癌細胞における EGF 刺激依存的な細胞膜形態変化を制御する

第 59 回 日本生化学会 中国・四国支部例会 2018 鳥取

(発表 3) [中山寛尚](#)、[村上朱里](#)、[亀井義明](#)、[東山繁樹](#)

軸索誘導因子セマフォリン 3F は乳癌転移・血管新生を抑制する

第 76 回 日本癌学会学術総会 2017.9.28-30 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究分担者：なし。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：前川大志、川合克久、中山淳、荒木伸一、仙波憲太郎、田口友彦、亀井義明、高田泰次、東山繁樹

ローマ字氏名：Masashi Maekawa, Katsuhisa Kawai, Jun Nakayama, Nobukazu Araki, Kentaro Semba, Tomohiko Taguchi, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada, Shigeki Higashiyama

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。