

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16449

研究課題名(和文) YB-1活性化シグナルを標的とした進行性乳癌の新規克服治療薬の創出

研究課題名(英文) Targeting YB-1 activation pathway overcomes progressive breast cancer

研究代表者

柴田 智博 (Shibata, Tomohiro)

信州大学・医学部・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：40795986

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)：ER陽性乳癌の治療の過程において内分泌治療耐性癌が出現することが大きな問題となっている。本研究ではY-box binding protein 1 (YB-1)の内分泌治療耐性癌における活性化メカニズムを明らかにし、YB-1活性化シグナルを標的とした新規耐性克服治療の創出を目的とし研究を行った。その結果、耐性細胞株及び内分泌治療耐性乳癌患者においてAKT/mTOR/S6K/S6経路によりYB-1が活性化されること及び耐性癌の出現にYB-1活性化が深く関与していることを明らかにした。本研究の成果により、活性化YB-1が耐性癌出現を予防する新たな標的となることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ER陽性乳癌の治療における内分泌治療耐性癌の耐性化メカニズムに関して様々な報告があるが、有効な耐性癌の予防薬や克服治療薬は未だ見いだされていない。本研究で、内分泌治療耐性患者検体及び乳癌細胞を駆使した検討から、活性化YB-1及びYB-1活性化シグナルが耐性癌の出現に関与していることを明らかにした。さらに、活性化YB-1標的薬が内分泌治療耐性乳癌の克服に有効であることを明らかにすることができた。本研究の成果が内分泌治療耐性乳癌治療の発展に貢献することを期待している。

研究成果の概要(英文)：Nuclear expression of Y-box binding protein-1 (YB-1) is closely correlated with clinical poor outcomes and drug resistance in breast cancer. Phosphorylated YB-1 (pYB-1) promotes expression of genes related to drug resistance and cell growth. A forthcoming problem to be addressed is whether targeting the phosphorylation of YB-1 overcomes antiestrogen resistance by progressive breast cancer. Here we found that increased expression of pYB-1 was accompanied by acquired resistance to antiestrogens, fulvestrant and tamoxifen. Forced expression of YB-1/S102E, a constitutive phosphorylated form, resulted in acquired resistance to fulvestrant. IHC analysis revealed that expression of pYB-1 and YB-1 was augmented in patients who experienced recurrence during treatment with adjuvant endocrine therapies. Taken together our findings suggest that pYB-1 represents a potential therapeutic target for treatment of antiestrogen resistant and progressive breast cancer.

研究分野：がん生物学

キーワード：YB-1 乳癌 内分泌治療耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1. 乳癌細胞の増殖はER $\alpha$ とHER2発現に緊密に依存しており、乳癌の60-70%を占めるER $\alpha$ 陽性乳癌は、ER $\alpha$ 標的のタモキシフェンやフルベストラント、レトロゾールなどの内分泌治療が行われる。他方、20%を占めるHER2陽性乳癌は、HER2標的薬のトラスツズマブやペルツツマブなどの分子標的治療が施行され、がん治療の向上に大きく貢献している。
2. 現在、術後のタモキシフェン等の長期内分泌治療が推奨されているが、内分泌治療耐性がんが出現し、再発・増悪することが大きな難関となっている。乳癌の薬剤耐性メカニズムは基礎研究により数多く報告されているが、未だ有効な耐性克服治療は見出されていない。従って、乳癌耐性克服への治療創出は極めて大切である。
3. YB-1は細胞周期関連遺伝子や増殖因子受容体の発現を制御する転写因子であり、さらに、YB-1の高発現や活性化(核内局在)は乳癌をはじめとした様々ながん種において予後不良因子であることが当研究室を含む国内外の研究グループにより報告されている。
4. 我々は、YB-1の活性化と核内移行にPI3K/AKTシグナルが関与することを報告している。さらに、近年、フルベストラント耐性乳癌細胞株においてYB-1の活性化によるHER2発現の上昇とER $\alpha$ 発現の低下がフルベストラントやタモキシフェン耐性を誘導することを報告した。
5. フルベストラント耐性乳癌細胞株においてYB-1の活性化に加え、YB-1活性化に関わるAKT/mTOR/S6Kシグナルが活性化していることを観察している。さらに、内分泌治療後の再発乳癌においてYB-1の核内発現とリン酸化YB-1の発現が上昇していることを観察している。
6. 最近、The Cancer Genome Atlasデータベースにおける多数の乳癌患者を対象とした乳癌組織での解析からYB-1が予後不良因子を正に制御し、予後良好因子を負に制御することを観察している。さらに、乳癌患者を対象とした検討により、YB-1及びその制御因子が乳癌の予後を予測するバイオマーカーとなることを明らかにした。

以上の背景から、乳癌の耐性や再発にYB-1の活性化と核内移行が重要な役割を果たすことが示された。しかし、乳癌患者においてYB-1が活性化する詳細なメカニズムやYB-1の治療標的としての有用性は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

乳癌は女性の罹患するがんの中で致死率が2位である。ER $\alpha$ 陽性の乳癌患者は全乳癌患者の60%近くを占め、ER $\alpha$ 標的のタモキシフェンやフルベストラントなどの内分泌治療薬が臨床応用されている。しかし、治療の経過とともに出現してくる耐性がんは乳癌治療において大きな難関である。我々はこれまでに乳癌患者において、乳癌のオンコプロテインとして報告されているY-ボックス結合タンパク質-1(YB-1)が抗がん剤による治療後に耐性となった腫瘍内で核内発現が増加することを報告している。さらに、フルベストラント耐性乳癌細胞株を樹立し検討を行った結果、耐性株においてリン酸化YB-1の発現上昇に加え、AKT/mTOR/S6K経路の活性化を観察している。そのため、乳癌の内分泌治療耐性や治療後の再発にともなう活性型YB-1(pYB-1)発現亢進が耐性癌の出現に深く関与していることが示唆される。そこで、本研究では乳癌の内分泌治療抵抗性に関与するYB-1活性化メカニズムを明らかにし“YB-1活性化”を標的とする治療薬の創出を目的とし、進行性耐性乳がんの克服を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬剤感受性の測定(WST法)

対数増殖期にある細胞を96wellプレートに播種し(T-47D:  $5.0 \times 10^3$  cells) 24時間培養した後、AKT阻害薬、ERK阻害薬、ER $\alpha$ 標的薬を添加した。薬剤を添加後37で72時間培養した。生細胞数測定試薬Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所、熊本、日本)を各wellに20 $\mu$ l加えて37で2-3時間培養し、450nmの吸光度を測定した。IC50値は吸光度の値がコントロールの半分になる薬剤濃度を生存曲線から決定した。

#### (2) siRNAによる発現抑制

S6 siRNA及びYB-1 siRNAはLipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)とOpti-MEM medium

(Invitrogen) を使用して、細胞を抗生物質非含有培地で播種してから 24 時間後に細胞導入し、その後タンパクの回収又は 96 well プレートに細胞を播種。96 well プレートに播種後 24 時間で薬剤を添加し、その後 72 時間培養した。細胞数の測定は WST 法に従い実施した。

#### (3) チャコール処理血清 (charcoal-stripped serum, CSS) 調整

ER $\alpha$  標的薬の感受性を検討するために CSS を作成した。Fetal bovine serum (FBS) 50 ml に 0.75 g dextran-coated charcoal (Sigma-Aldrich) を添加し、4°C で一晩攪拌。その後、5000 $\times$ g で 20 分間遠心し上清回収。0.45- $\mu$ m pore size filter で 1 回、0.22- $\mu$ m pore size filter で 2 回 filtration 後、使用時まで -30°C で保存。

#### (4) 臨床検体を対象とした免疫組織化学染色

乳癌患者における YB-1 とその活性化シグナル及び治療効果との相関について、切除がん由来の組織標本を対象に、免疫染色による検討を行った。すなわち、YB-1 のリン酸化及び RSK/AKT/mTOR/S6K のリン酸化を評価し、YB-1 と上流シグナルの関連を評価した。同時に、再発乳癌患者での YB-1 とその活性化シグナル RSK/AKT/mTOR/S6K の発現を評価し、YB-1 発現と YB-1 活性化シグナルが再発率と関連するか検討を行った。

### 4. 研究成果

- (1) ER $\alpha$  陽性乳癌細胞株を用い、フルベストラントを 14 日間処理したところ耐性株と同様に YB-1 リン酸化の上昇とともに ER $\alpha$  発現低下と HER2 発現上昇を示した。さらに、mTOR/AKT/p70S6K/S6 シグナルの活性化が観察された。
- (2) フルベストラント耐性株を用い、YB-1 又は S6 のいずれがフルベストラントの耐性に関与するか否か明らかにするため、各々の siRNA を用い発現を抑制した際のフルベストラントに対する感受性について検討を行った。YB-1 発現抑制によりフルベストラントに対する感受性は回復したが、S6 発現抑制下ではフルベストラントに対する耐性を維持していた。
- (3) さらに、フルベストラント耐性株において YB-1 発現抑制により ER $\alpha$  の発現上昇及び HER2 発現減少が観察されたが、S6 発現抑制は ER $\alpha$  及び HER2 の発現に影響を与えなかった。
- (4) フルベストラント耐性株に対する AKT 阻害薬である LY294002 及び ERK 阻害薬である U0126 の感受性について検討を行った。その結果、親株と比較しフルベストラント耐性株で LY294002 に対し高感受性を示し、一方、U0126 に対する感受性に違いは見られなかった。さらに、LY294002 及び U0126 によりそれぞれの標的である AKT 及び ERK のリン酸化は抑制された。また、LY294002 処理により YB-1 リン酸化が著明に抑制されたが、U0126 は YB-1 リン酸化に影響を与えなかった。

ここまでの検討により、YB-1 及び YB-1 のリン酸化がフルベストラント耐性乳癌細胞のフルベストラント感受性に重要であり、YB-1 リン酸化シグナルを標的とした薬剤が内分泌治療耐性克服に有用であることを示すことができた。そこで、乳癌患者を対象に YB-1 の治療標的としての有用性を評価するために検討を進め、以下の結果が得られた。

- (1) 乳癌患者 61 症例の原発巣を対象に、YB-1 発現について免疫染色法により検討を行った。その結果、再発がなかった群に比べ再発が起こった群での原発巣での YB-1 発現が有意に高いことが観察された。
- (2) 内分泌治療前と治療後に再発が起きた乳癌患者 12 症例における pYB-1、YB-1、pS6 発現について免疫染色法により検討を行った。その結果、原発巣に比べ再発巣において pYB-1、YB-1、pS6 発現が有意に高いことが観察された。同時に、再発までの期間と原発巣での pYB-1、YB-1、pS6 発現との関連について解析を行ったところ、3 年以内の早期に再発した患者群では pYB-1、YB-1、pS6 発現が原発巣で高いことが観察された。

以上の結果から、臨床検体を用いた検討においてもリン酸化 YB-1 シグナルが内分泌治療耐性癌の出現に関与していること、リン酸化 YB-1 を標的とした治療薬が耐性癌の出現を予防できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watari Kosuke, Shibata Tomohiro, Fujita Hideaki, Shinoda Ai, Murakami Yuichi, Abe Hideyuki, Kawahara Akihiko, Ito Hiroshi, Akiba Jun, Yoshida Shigeo, Kuwano Michihiko, Ono Mayumi	4. 巻 3
2. 論文標題 NDRG1 activates VEGF-A-induced angiogenesis through PLC 1/ERK signaling in mouse vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0829-0	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 Shibata Tomohiro, Watari Kosuke, Kawahara Akihiko, Sudo Tomoya, Hattori Satoshi, Murakami Yuichi, Izumi Hiroto, Itou Junji, Toi Masakazu, Akiba Jun, Akagi Yoshito, Tanaka Maki, Kuwano Michihiko, Ono Mayumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Targeting Phosphorylation of Y-Box Binding Protein YBX1 by TAS0612 and Everolimus in Overcoming Antiestrogen Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 882 ~ 894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-19-0690	査読の有無 有
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 Ito Hiroshi, Watari Kosuke, Shibata Tomohiro, Miyamoto Tomofumi, Murakami Yuichi, Nakahara Yukiko, Izumi Hiroto, Wakimoto Hiroaki, Kuwano Michihiko, Abe Tatsuya, Ono Mayumi	4. 巻 80
2. 論文標題 Bidirectional Regulation between NDRG1 and GSK3 Controls Tumor Growth and Is Targeted by Differentiation Inducing Factor-1 in Glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-0438	査読の有無 有
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 Sato Mami, Fuchida Hirokazu, Shindo Naoya, Kuwata Keiko, Tokunaga Keisuke, Xiao-Lin Guo, Inamori Ryo, Hosokawa Keitaro, Watari Kosuke, Shibata Tomohiro, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro, Ono Mayumi, Ojida Akio	4. 巻 11
2. 論文標題 Selective Covalent Targeting of Mutated EGFR(T790M) with Chlorofluoroacetamide-Pyrimidines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1137 ~ 1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.9b00574	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴田智博、渡公佑、河原明彦、和泉弘人、村上雄一、桑野信彦、小野眞弓
2. 発表標題 Y-box binding protein YB-1活性化シグナルを標的とした乳癌の内分泌治療耐性の新規克服治療
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Shibata, Kosuke Watari, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono
2. 発表標題 The activated YB-1 as an effective therapeutic target in human progressive cancers
3. 学会等名 COLD SHOCK PROTEIN SYMPOSIUM 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田智博、渡公佑、河原明彦、主藤朝也、村上雄一、和泉弘人、秋葉純、桑野信彦、小野眞弓
2. 発表標題 Y-box binding protein YB-1リン酸化シグナル阻害薬による乳癌の内分泌治療耐性克服
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------