

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18029

研究課題名(和文)細胞膜形態制御機構を標的とした新規HER2陽性乳癌治療薬の導出

研究課題名(英文) Development of Novel Therapeutic Agents Targeting Regulatory Mechanisms of Cell Membrane Morphology for HER2-positive breast cancer

研究代表者

村上 朱里 (Murakami, Akari)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：60722593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：EGF受容体family分子であるHER2を高発現するHER2陽性乳癌は乳癌の約15%を占める悪性度の高い乳癌である。本研究では申請者の研究チームが独自に見出したHER2陽性乳癌細胞の細胞増殖を正に制御するCUL3/KCTD10/RhoBユビキチンリガーゼ複合体に注目し、その細胞増殖制御機構の解明と、当該分子基盤に対する制御剤の探索を行った。その結果、HER2陽性乳癌細胞の細胞膜形態変化と細胞増殖に必須なRhoB結合タンパク質の同定に成功した。更に、アルファスクリーンを用いて、CUL3とKCTD10の結合を阻害する化合物を複数同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のHER2陽性乳癌に対する治療薬は、薬剤耐性の問題から、投与期間は限定的である。本研究ではHER2以外の分子基盤を創薬標的としているので、本研究を通して導出されたシース化合物は、抗HER2療法と併用して使用可能な新たなHER2陽性乳癌治療薬として、今後の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the HER2-targeted therapy is the first-line and effective therapy towards HER2-positive breast cancers, the development of drug resistance has been problematic. In addition, all the current anti-cancer drugs for HER2-positive breast cancer inhibit HER2. We have recently found that the ubiquitin E3 complex CUL3/KCTD10 is essential for cell growth through the constitutive degradation of RhoB specifically in HER2-positive breast cancer cells. In this study, we identified a RhoB-interacting protein which is essential for EGF-induced membrane ruffle formation as well as cell proliferation of HER2-positive breast cancer cells. By utilizing AlphaScreen, we also identified a couple of compounds which inhibit the CUL3/KCTD10 interaction leading to the inhibition of HER2-positive breast cancer cell growth

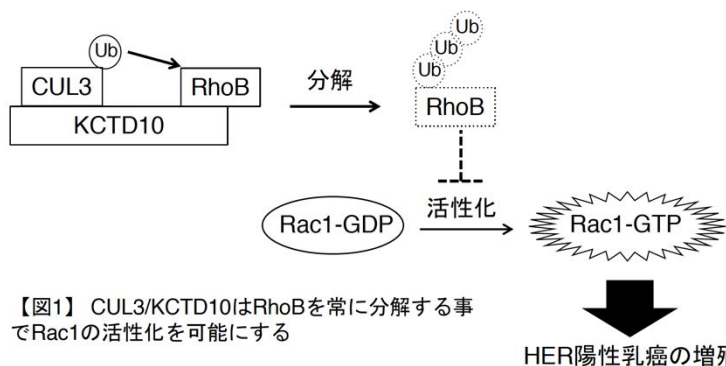
研究分野：腫瘍生物学、乳腺外科学

キーワード：HER2陽性乳癌 細胞膜 Rac1 アルファスクリーン タンパク質間相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の約 10%が生涯に罹患し、30%という高い死亡率を有する癌である。乳癌は、その遺伝子発現と増殖能から複数のサブタイプに分類される。特に、EGF 受容体 family の一つである HER2 を発現する HER2 陽性乳癌は高い増殖能と転移能を有し、乳癌全体の約 15%を占める。現在、HER2 陽性乳癌に対しては、HER2 に対する阻害抗体やチロシンキナーゼ阻害剤等の分子標的薬が既に臨床応用され、初期投与では著効する。しかしながら、抗 HER2 療法を受けた患者の半数以上が 1 年以内に抗 HER2 療法耐性となることから、その投与期間は限定されている。更に、抗 HER2 療法耐性化になると、現在の治療法では根治は極めて難しい。既存の HER2 陽性乳癌に対する分子標的薬は全て HER2 を標的としているので、HER2 以外を標的とした HER2 陽性乳癌に対する特異的分子標的薬の開発は、抗 HER2 療法耐性化の予防の観点からも、その薬物治療において極めて重要である。

癌細胞の細胞膜形態変化は腫瘍の転移能と増殖能を高めるため、細胞膜形態制御機構は魅力的な抗癌剤開発の標的として研究開発が進められている。細胞膜形態制御機構のマスター制御因子としては、small GTPase の Rac1 が知られており、実際に Rac1 の機能を阻害すると癌細胞の細胞膜形態変化に伴う癌細胞の浸潤および、増殖が抑制される。申請者は今までに、乳癌サブタイプの中でも、HER2 陽性乳癌細胞で特異的に作動する Rac1 の活性化制御分子基盤として、ユビキチン (Ub)E3 複合体 CUL3/KCTD10/RhoB を新規に同定している (図 1; Murakami *et al.*, Cancer Sci. 2019)。Cullin-RING 型 Ub リガーゼ複合体足場タンパク質 CUL3 (Cullin-3) は、その基質認識タンパク質 KCTD10 と基質タンパク質 RhoB と三者複合体を形成し、RhoB を Ub 化し、分解に導く。HER2 陽性乳癌細胞株 SKBR-3 cells において、CUL3 または、KCTD10 を発現抑制すると、RhoB の Ub 化及び、分解が阻害され、RhoB が蓄積した。更に、この蓄積した RhoB が原因となり、細胞運動や増殖シグナル伝達に重要な機能を有する細胞膜の隆起構造 (ラッフル膜) の形成が著しく阻害された。ラッフル膜の形成には Rac1 の活性化が必須であるので、CUL3 または、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells において Rac1 の活性化を Rac1-FRET イメージングで観察した結果、HER2 シグナル依存的な Rac1 の活性化は著しく阻害された。更に、CUL3 または、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では、RhoB の蓄積が原因で Rac1 が細胞内小胞に留まり、細胞膜へ輸送されず活性化されていないことを突き止めた。また、CUL3 または、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では、細胞増殖も著しく阻害された (Murakami *et al.*, Cancer Sci. 2019)。

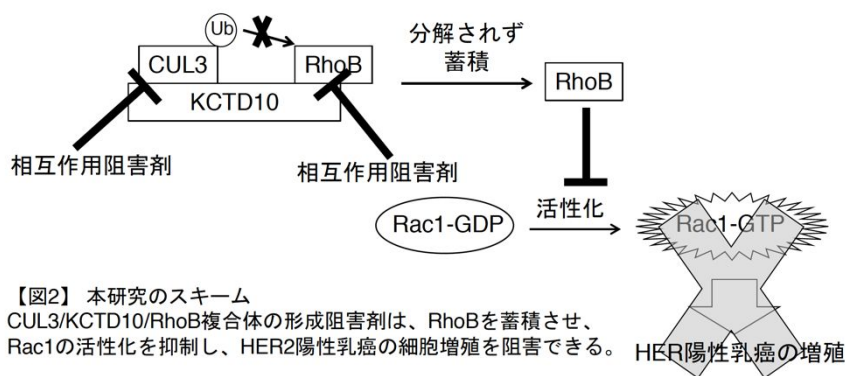


HER2陽性乳癌の増殖

### 2. 研究の目的

上述の SKBR-3 cells の表現型は RhoB 依存的事から、申請者は「CUL3/KCTD10 複合体が RhoB を Ub 化し、分解に導くことで、RhoB のタンパク質量が常に低く保たれ、Rac1 が適切に活性化される」という全く新しい Rac1 活性化の新規分子基盤の解明に成功した (Murakami *et al.*, Cancer Sci. 2019)。

一方で、蓄積した RhoB が、どのように Rac1 活性化を制御しているかの詳細な分子機構は不明なままであった。RhoB は Rac1 を不活性化するので、RhoB が CUL3/KCTD10 により Ub 化を受け、分解されて常に低い発現量に保たれることで Rac1 が活性化される。従って、CUL3/KCTD10/RhoB 複合体の形成阻害剤は、RhoB のタンパク質量を増大させ、Rac1 を不活性化に導き、抗腫瘍効果を発揮することが可能であると考えた (図 2)。そこで本研究では、CUL3/KCTD10 依存的な恒常的な RhoB 分解による Rac1 活性化の分子基盤の解明と、当該分子基盤に対する人為的制御剤の HER2 陽性乳癌に対する新たな治療薬としての導出の二点を目的とした。



### 3. 研究の方法

#### (1) RhoB による Rac1 活性化機構の解明

CUL3/KCTD10 依存的に RhoB が恒常的に分解されることで、EGF 刺激依存的な Rac1 活性化が生じるため、RhoB は Rac1 活性化を負に制御する。現在までに、RhoB と Rac1 が直接結合するという結果は得られていないことから、RhoB は何らかの結合タンパク質を介して、Rac1 活性化を負に制御しているという仮説が考えられた。そこで、RhoB の直接結合タンパク質を愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有するヒトプロテインアレイとアルファスクリーンにより、探索した。まず、Avi タグを付加したヒトの RhoB の野生型、dominant-negative 型 (DN 型)、constitutive-active (CA 型) を pEU ベクターにクローニングし、コムギ無細胞タンパク質合成系により、リコンビナントタンパク質の合成を行った。この時、ビオチンリガーゼである BirA と d-ビオチンを添加することで、ビオチン化も同時に行った。タンパク質の発現はウェスタンブロットングにより確認した。愛媛大学プロテオサイエンスセンターは、384 well plate に分注された約 28,000 種のヒトの完全長リコンビナントタンパク質アレイを保有している。本研究では、このうち、約 4,000 タンパク質のアレイの中から、RhoB 結合タンパク質の探索を実施した。プロテインアレイのタンパク質には FLAG-GST タグが付加されているので、FLAG 抗体の存在下でアルファスクリーンを行うことで、FLAG-GST タグ付きタンパク質とビオチン化 RhoB との相互作用を検出できると考えた。

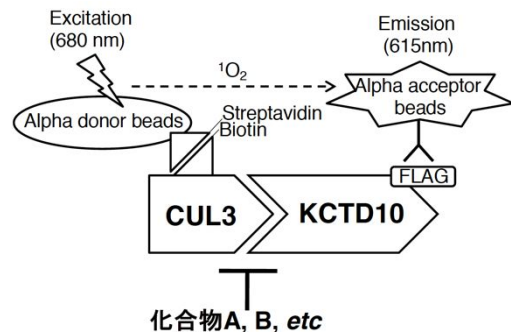
#### (2) アルファスクリーンを用いた CUL3/KCTD10/RhoB 複合体、RhoB 結合タンパク質に対する制御剤の探索

CUL3/KCTD10/RhoB 複合体は HER2 陽性乳癌細胞の増殖を正に制御する。即ち、CUL3/KCTD10/RhoB 複合体の形成阻害剤は、HER2 陽性乳癌細胞の増殖を抑制でき、HER2 陽性乳癌の新規治療薬のシーズとして期待される。また、実験 で同定される RhoB 結合タンパク質に対する介入も HER2 陽性乳癌細胞の増殖を抑制できる可能性がある。そこで、アルファスクリーンを用いて、CUL3/KCTD10、RhoB 結合タンパク質/Rac1 の相互作用を阻害するような制御剤の探索を行った。具体的には、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、FLAG-KCTD10、ビオチン化 CUL3、FLAG-Rac1、ビオチン化 RhoB 結合タンパク質を合成した。次に、CUL3/KCTD10、RhoB 結合タンパク質/Rac1 の結合を検出するアルファスクリーンの系を構築した。スクリーニングのために、n=30 のアッセイを行い、実験間の誤差が少ないアッセイ系を構築した。系の構築後は、当該アルファスクリーンに対して、共同研究先企業が有するコア化合物ライブラリー (1,000 化合物) を供して、結合シグナルが negative control の 10 倍以下に低下させる化合物の探索を試みた (図 3)。

### 4. 研究成果

#### (1) RhoB 結合タンパク質の同定と Rac1 活性化機構の解明

ヒトプロテインアレイ 4,000 種から、RhoB に直接結合するタンパク質の同定を試みた結果、RhoB-CA 型に結合し、野生型や DN 型には結合しないタンパク質を 2 種類 (Protein X, Protein Y)、同定することに成功した。更に、Protein X について、解析を進めた結果、興味深いことに、Protein X は Rac1 と直接結合することを見出した。Protein X を HER2 陽性乳癌細胞において発現抑制すると、Rac1 活性化依存的に生じるラッフル膜の形成が阻害され、細胞増殖も阻害された。これらの結果は、Protein X が Rac1 と結合する事で、Rac1 活性化を正に制御する事を強く示唆するものである。実験を進めた結果、Protein X には複数の protein phosphatase が直接相互作用することも分かった。Protein X の多機能性が示唆された。尚、実験 の化合物スクリーニングにおいては、protein X と Rac1 の相互作用検出系が安定しなかったため、protein X の probe として protein phosphatase A (PPA) を採用した。

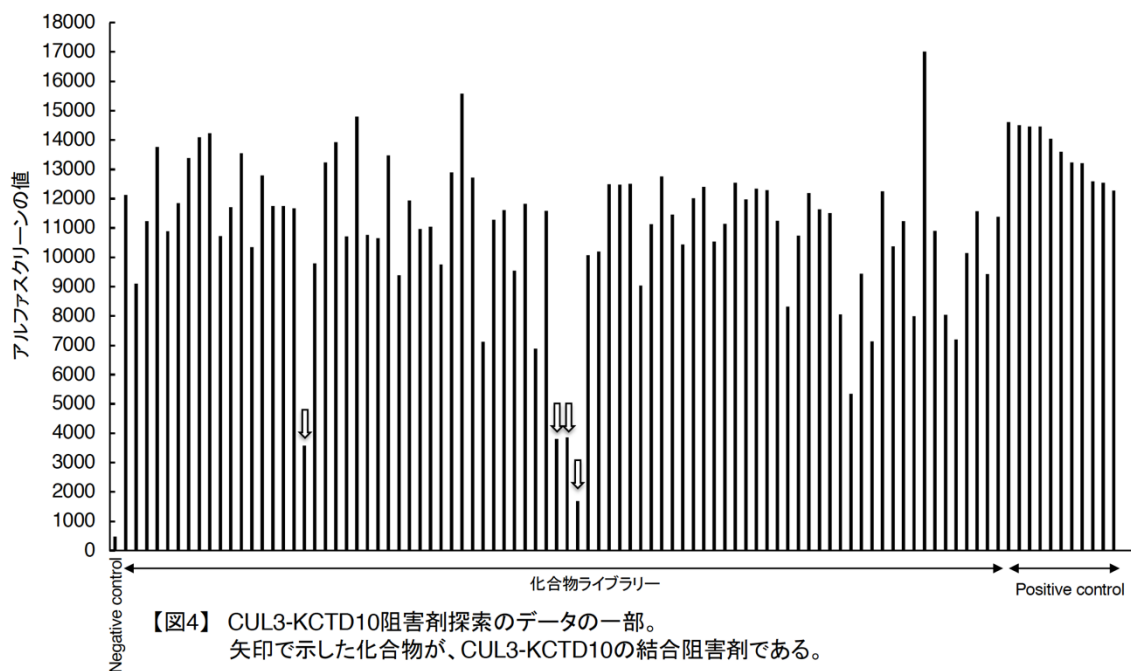


【図3】 CUL3-KCTD10のアルファスクリーンの値が低下するような低分子化合物を探索する

#### (2) アルファスクリーンを用いた CUL3/KCTD10 結合阻害剤および、RhoB 結合タンパク質の阻害剤探索

構築した CUL3/KCTD10 及び、protein X/protein phosphatase (PPA) の結合検出系に対して、コア化合物ライブラリー (1,000 化合物) を供した。その結果、CUL3/KCTD10 や、protein X/PPA の結合を阻害する化合物を複数同定することに成功した (図 4)。これらのヒット化合物は、また、HER2 陽性乳癌細胞のラッフル膜形成や細胞増殖を阻害することも見出した。今後は、これらの化合物の類縁体を用いたスクリーニングを行い、化合物の構造最適化を進める必要がある。有望な化合物についてはマウスモデルに供していく。尚、当初は、KCTD10/RhoB の相互作用を指標に阻害剤探索を試みたが、KCTD10/RhoB の結合シグナルをアルファスクリーンでは安定して得ることができなかった。この理由として、RhoB の翻訳後修飾の影響が考えられる。RhoB は脂肪酸修飾やリン酸化を受ける事が知られており、コムギ無細胞タンパク質合成系ではこれらの RhoB の翻訳後修飾が適切に行われていないため、KCTD10 と RhoB の直接の結合を検出できていないと考

えられた。今後は、RhoB の KCTD10 結合領域を細胞レベルでの免疫沈降法で検証し、RhoB の truncation form を用いて、安定して in vitro で KCTD10 との結合を検出するアルファスクリーンの系を構築していく必要があると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nishiyama Kanako, Maekawa Masashi, Nakagita Tomoya, Nakayama Jun, Kiyoi Takeshi, Chosei Mami, Murakami Akari, Kamei Yoshiaki, Takeda Hiroyuki, Takada Yasutsugu, Higashiyama Shigeki	4. 巻 4
2. 論文標題 CNKSR1 serves as a scaffold to activate an EGFR phosphatase via exclusive interaction with RhoB-GTP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101095	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishiyama K, Maekawa M, Murakami A, Utsunomiya K, Takemoto K, Kusakabe E, Noda H, Aoki R, Taguchi K, Yamashita M, Nakagita T, Nakayama J, Chosei M, Kiyoi T, Kamei Y, Takeda H, Takada Y, Higashiyama S
2. 発表標題 A novel mechanism of phosphatase activation for EGFR by Cullin-3/KCTD10 ubiquitin E3 complex in HER-2-positive breast cancer cells.
3. 学会等名 The 2021 San Antonio Breast Cancer Symposium（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 -27) 西山加那子、村上朱里、奥島久美子、竹本佳菜、日下部恵梨菜、志田原智広、野田令菜、青木玲奈、田口加奈、山下美智子、亀井義明、高田泰次
2. 発表標題 HER2陽性乳癌細胞株における恒常的なRhoBタンパク質分解の生理機能の解析
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 -44) 西山加那子、前川大志、中山 淳、村上朱里、亀井義明、高田泰次、東山繁
2. 発表標題 HER2陽性乳癌細胞におけるEGFRフォスファターゼ活性化の新規メカニズム
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------