

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02403

研究課題名（和文）高次構造調節による立体的ヒストンコードの解明

研究課題名（英文）Decoding the histone code through higher-order structure

研究代表者

島田 緑（Shimada, Midori）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60444981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：乳がんの予後不良因子として、FKBP52（FK506 Binding Protein 52）を同定した。FKBP52はアミノ酸の一種であるプロリンをシス・トランス体に異性化するプロリン異性化酵素である。乳がんの悪性化に密接に関連するエストロゲン受容体（ER α ）の機能をFKBP52が増強することが判明した。重要なことに、FKBP52阻害は乳がん細胞の増殖を顕著に阻害し、内分泌治療抵抗性の乳がん細胞株に対してもER α の不安定化をもたらし、増殖を阻害した。さらなる解析の結果、FKBP52は増殖を促進する遺伝子の発現をヒストンの修飾を介して活性化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは女性のがんの中で最も罹患患者数が多く、死亡者数も第二位となっており、臨床的に重要な疾患である。ER陽性乳がんに対しては、内分泌療法が効果的であるが、一定の割合でこれらの治療に対して再発することが問題となっている。再発には耐性化が原因だと考えられておりER α の活性化が深く関与している。このような背景からER陽性乳がんの再発を克服する新規治療法の開発が求められている。今回の研究成果は、ER陽性乳がんの患者さんに対して問題となるER α の活性化による乳がんの再発に対して理解を深めることとなり、新たなバイオマーカーの発見、効果的な治療法開発へと展開することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：FKBP52（FK506 Binding Protein 52）was identified as a poor prognostic factor for breast cancer. FKBP52 is a proline isomerase that isomerizes proline into cis and trans forms. It was found that FKBP52 enhances the function of estrogen receptor alpha (ER α), which is closely related to the malignant transformation of breast cancer. Of note, FKBP52 inhibition markedly inhibited breast cancer cell growth and destabilized ER α against endocrine treatment-resistant breast cancer cell lines, inhibiting their proliferation. Further analysis revealed that FKBP52 activates the expression of genes that promote proliferation via histone modifications.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん エストロゲン受容体 プロリン異性化酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんは日本人女性が罹患する悪性腫瘍の第 1 位であり、その罹患数ならびに死亡数は年々増加している。女性ホルモンの一種であるエストロゲンと結合する受容体 (ER) が発現している乳がん (ER 陽性乳がん) は、乳がんの約 70% を占めている。ER 陽性乳がんに対しては、ER の働きを抑制する内分泌療法が奏効する。しかしながら、ER 陽性転移乳がん患者に内分泌療法を行った場合、治療当初には内分泌療法に効果を認めても、内分泌療法に対して耐性を示すことが多い。

2. 研究の目的

ER 陽性乳がんの内分泌療法に対する耐性メカニズムの解明とその克服が大きな臨床的課題となっている。そこで、ER の活性化に關与する、乳がんの悪性化因子を同定し、ER 陽性乳がんに対する新たな治療標的となりうる可能性を検証することを目的とした。同定した FKBP52 (FK506 Binding Protein 52) はプロリンのシス・トランス異性化反応を触媒し、タンパク質の高次構造を変化させるプロリン異性化酵素 (ペプチジルプロリルイソメラーゼ、略称 PPIase) に分類される。FKBP52 のがんの病態と關連した機能解明を行うことで新たな乳がん治療法の開発に貢献したいと考えている。

3. 研究の方法

下記の 4 つの基準を満たす因子を探索し、乳がんの予後不良因子として、FKBP52 を同定した。(1) ER α と相互作用する [IntAct または BioGRID データベースにて解析] (2) mRNA 発現が ER α mRNA 発現量と正の相関関係を示す [TCGA BRCA (The Cancer Genome Atlas Breast Cancer) にて、ピアソン相関係数 > 0.2] (3) mRNA 発現が、がん周囲正常組織よりも ER 陽性乳がんが高い [TCGA BRCA にて、 $\log_2(\text{ER 陽性乳がん/正常}) > 1$] (4) mRNA の高発現が、ER 陽性乳がん患者の無再発生存期間の短縮と相關する [Kaplan-Meier Plotter (gene chip) にて、ハザード比 > 1 、 $p < 0.01$]

FKBP52shRNA をコードする遺伝子配列を導入し、レンチウイルストランスフェクションにより、doxycycline 誘導的に shFKBP52 を発現するヒト乳がん細胞株を作製した。さらにこれらの樹立した細胞株を用いて Xenograft 実験を実施した。

プロリンの異性化を検出する方法として、キモトリプシン法の構築を行なった。最初にキモトリプシン法に用いるヒストンペプチドの合成を行った。FKBP52 が異性化すると推測されるプロリン残基までは通常のペプチド配列を合成し、直後にフェニルアラニンとペプチジル-パラニトロアニリンを融合させた。

4. 研究成果

乳がん細胞株(MCF7)において、FKBP52 の発現を抑制すると、エストロゲン受容体 ER α の分解が亢進するため ER α の発現量が減少し、がん細胞の増殖を顕著に阻害した。重要なことに、内分泌治療抵抗性となった乳がん細胞株(MFR: MCF7 derived fulvestrant resistance)に対しても、FKBP52 を阻害することで、ER α の発現量およびがん細胞の増殖を抑制できる結果が得られた。PPIase の中で FKBP ファミリーは免疫抑制剤 FK506 に結合する特徴を持ち、ヒトでは 16 種類存在する。FKBP ファミリーには相同性の高い類似分子が存在しており、FKBP52 にも構造的に類似した FKBP51 が存在する。これらの FKBP はコシャペロンとしての機能を有し、核内受容体の機能調節や微小管結合タンパク質 Tau の制御に重要であること報告されている。

本研究結果から、ER 陽性乳がん細胞株において FKBP52 の発現を抑制すると、ER のユビキチン依存性分解が亢進して ER の発現量が減少し、がん細胞の増殖が顕著に阻害されることがわかった。つまり FKBP52 は ER のユビキチン化を阻害してタンパク質を安定化させる機能を持つ。重要なことに、内分泌治療抵抗性となった乳がん細胞株に対しても、FKBP52 を阻害することで、ER の発現量を減少させがん細胞の増殖を抑制できる。FKBP52 による ER の安定化機構を解明するために、ER および FKBP52 と相互作用するユビキチン化酵素を網羅的に探索した結果、乳がんの発症と關連するがん抑制因子 BRCA1 を同定した。BRCA1 は ER をモノユビキチン化することが知られているが、私たちは BRCA1 が ER の安定化に必須であること、FKBP52 は BRCA1 と ER の結合を促進することで ER を安定化することを解明した。興味深いことに、正常組織と比べてほぼすべての種類のがん組織で FKBP52 の発現は高く、乳がんにおいては FKBP52 の発現量が高いほど予後不良となることがわかった。つまり FKBP52 は ER の安定化を通じてその機能を増強し、がん細胞の増殖を促進させるために、FKBP52 の高発現が予後不良につながっているものと推察される。以上の研究成果は、ER の

基本的な発現調節機構を解明することによって、乳がんの治療抵抗性や再発のメカニズムに対して理解を深めることとなり、新たなバイオマーカー、効果的な治療法開発へと展開することが期待できる。

一方、FKBP52 と相同性の高い FKBP51 は正常組織と比べてほとんどのがんで発現が減少しており、さらに予後との相関解析を行うと FKBP51 の発現が高いと予後良好であることがわかった。構造的に類似している 2 つの FKBP の発現パターンや予後との相関が全く逆であるという現象は非常に興味深い。そこでこの現象の基盤となるメカニズムを解析した結果、FKBP51 は FKBP52 と競合して ER と結合し、ER の分解を促進する機能を持つことがわかった。以上のように乳がんにおいて FKBP52、FKBP51 の発現のバランスが ER の安定性を制御し、乳がんの進行に関与すると考えられる。FKBP52、FKBP51 は乳がん以外のがんにおいても転写因子や受容体の機能調節をする結果が得られており、これらのプロリン異性化酵素によるがんへの影響と治療介入の可能性を今後明らかにしたいと考えている。

FKBP52 はほとんどのがんで高発現していることから、基本的な細胞増殖に関する機能を持つことが示唆される。しかしながら FKBP52 の基質はほとんど同定されていない。私は FKBP52 と結合するヒストンに注目し、FKBP52 とヒストンの異性化との関連性を検証した。In vitro 異性化反応系を構築し、合成ペプチドはプロリン残基が異性化されることによりキモトリプシンによりペプチジル-パラニトロアニリンが遊離し吸光度が上昇することを利用し、酵素活性を測定した。さらにヒストンの異性化特異的抗体を作製し、プロリンのシス体、トランス体、FKBP52 がゲノム上のどの領域に存在するかを網羅的に検証した。さらなる解析の結果、FKBP52 は増殖を促進する遺伝子の発現をヒストンの修飾を介して活性化することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Masaki Takahiro, Habara Makoto, Shibutani Shusaku, Hanaki Shunsuke, Sato Yuki, Tomiyasu Haruki, Shimada Midori	4. 巻 641
2. 論文標題 Dephosphorylation of the EGFR protein by calcineurin at serine 1046/1047 enhances its stability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.017	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 Habara Makoto, Shimada Midori	4. 巻 44
2. 論文標題 Estrogen receptor revised: Expression, structure, function, and stability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 2200148 ~ 2200148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202200148	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 Habara Makoto, Sato Yuki, Goshima Takahiro, Sakurai Masashi, Imai Hiroyuki, Shimizu Hideyuki, Katayama Yuta, Hanaki Shunsuke, Masaki Takahiro, Morimoto Masahiro, Nishikawa Sayaka, Toyama Tatsuya, Shimada Midori	4. 巻 119
2. 論文標題 FKBP52 and FKBP51 differentially regulate the stability of estrogen receptor in breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2110256119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2110256119	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 Masaki Takahiro, Shimada Midori	4. 巻 23
2. 論文標題 Decoding the Phosphatase Code: Regulation of Cell Proliferation by Calcineurin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1122 ~ 1122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031122	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 Masaki Takahiro, Habara Makoto, Sato Yuki, Goshima Takahiro, Maeda Keisuke, Hanaki Shunsuke, Shimada Midori	4. 巻 118
2. 論文標題 Calcineurin regulates the stability and activity of estrogen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114258118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114258118	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 Maeda Keisuke, Habara Makoto, Kawaguchi Mitsuyasu, Matsumoto Hiroaki, Hanaki Shunsuke, Masaki Takahiro, Sato Yuki, Matsuyama Hideyasu, Kunieda Kazuki, Nakagawa Hidehiko, Shimada Midori	4. 巻 16
2. 論文標題 FKBP51 and FKBP52 regulate androgen receptor dimerization and proliferation in prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 940 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13030	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 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Masaki Takahiro, Maeda Keisuke, Sato Yuki, Nakanishi Makoto, Shimada Midori	4. 巻 112
2. 論文標題 PP1 regulatory subunit NIPP1 regulates transcription of E2F1 target genes following DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2739 ~ 2752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14924	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 Hanaki Shunsuke, Shimada Midori	4. 巻 114
2. 論文標題 Impact of FKBP52 on cell proliferation and hormone dependent cancers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2729 ~ 2738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15811	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 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Sato Yuki, Tomiyasu Haruki, Miki Yosei, Shibutani Shusaku, Shimada Midori	4. 巻 175
2. 論文標題 Dephosphorylation of NFAT by Calcineurin inhibits Skp2-mediated degradation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 235 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad103	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 羽原 誠, 島田 緑	4. 巻 95
2. 論文標題 ER陽性乳がんの新規治療法開発に向けたエストロゲン受容体制御メカニズムの解明	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 546-550
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 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12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 カルシウムシグナル伝達経路によるがん細胞の増殖制御機構
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 がんの新規治療標的因子の同定および病態機能の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 啓介、羽原 誠、松本 洋明、花木 駿介、正木 貴大、佐藤 悠紀、島田 緑
2. 発表標題 プロリン異性化酵素によるアンドロゲン受容体機能調節メカニズムの解明
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 正木 貴大、羽原 誠、佐藤 悠紀、前田 啓介、花木 駿介、島田 緑
2. 発表標題 カルシウムシグナル伝達経路によるがん細胞の増殖制御機構
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花木 駿介、羽原 誠、正木 貴大、前田 啓介、佐藤 悠紀、島田 緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写調節機構の解明
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽原 誠、正木 貴大、佐藤 悠紀、前田 啓介、花木 駿介、島田 緑
2. 発表標題 カルシニューリンはエストロゲン受容体 の安定性および活性を制御する
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hanaki S, Habara S, Masaki T, Maeda K, Sato Y, Shimada M
2. 発表標題 DNA damage induces downregulation of E2F1 target genes by the dissociation of PP1 and its regulatory subunit NIPP1
3. 学会等名 The 6th International Symposium Association of Japan-Indonesia Veterinary Education 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤悠紀、羽原誠、花木駿介、正木貴大、富安遥己、三木陽清、島田緑
2. 発表標題 カルシウムシグナルの破綻がもたらす細胞増殖異常とがん
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花木 駿介、羽原 誠、佐藤 悠紀、正木 貴大、富安 遥己、三木 陽清、島田 緑
2. 発表標題 プロリン異性化酵素FKBP52によるp53安定性制御機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羽原誠、花木駿介、佐藤悠紀、富安遥己、三木陽清、太田智彦、島田緑
2. 発表標題 BRCA1はがん細胞においてc-Mycを安定化させ、細胞増殖を促進する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤悠紀、羽原誠、花木駿介、正木貴大、富安遥己、三木陽清、島田緑
2. 発表標題 カルシウムシグナルによるがん細胞の増殖制御
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤悠紀、羽原誠、花木駿介、正木貴大、富安遥己、三木陽清、島田緑
2. 発表標題 FBXW7とカルシニューリンによる転写因子E2F1の分解制御機構
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>乳がんの再発に関わる新たな制御因子を発見 新規治療法の開発に期待 https://www.yamaguchi-u.ac.jp/wp-content/uploads/2023/02/21102601wp.pdf 乳がん治療の開発に新たな光 プロリン異性化酵素による乳がんの悪性化機構を発見 https://www.yamaguchi-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/04/22040501.pdf 山口大学 共同獣医学部 獣医生化学分野 島田研究室 https://www.shimadamidori-lab.com</p>

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
---------	---------