

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670337

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーによるエストロゲン陽性乳癌の病因解明と化学予防法の開発

研究課題名(英文)The investigation for the critical cause of ERalpha-positive breast cancer and the establishment of its chemoprevention using chemical biology

研究代表者

渡邊 元樹 (Watanabe, Motoki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40723581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本邦において乳癌の罹患率は増加傾向にあり、その病因解明と化学予防法の確立は喫緊の課題である。本研究においてまずエストロゲンレセプター(ER⁺)陽性乳癌の増殖を抑制し、かつ細胞増殖に本質的な役割を担うcyclin D1の発現を低下させる化合物3種を見出した。次にこれら3化合物共通の結合タンパク質としてミトコンドリア内膜タンパク質ANT2を同定した。さらにANT2はcyclin D1をmRNA及びタンパク質レベルにおいて多面的に制御している可能性について示した。以上より、ANT2を標的とした癌予防は、乳癌をはじめとしたcyclin D1を過剰発現する多くの癌腫に対し、有望な戦略であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer incidence has been increasing in Japan, which gives us urgent issues of the investigation for the critical cause of breast cancer and the establishment of its chemoprevention. First, we conducted a screen for compounds which inhibited the growth of ERalpha-positive breast cancer cells, and found three hit compounds which reduced the expression level of cyclin D1. Second, we identified the inner mitochondrial membrane protein ANT2 as a common binding protein of these compounds. Finally, we suggested that ANT2 pleiotropically regulated the expression level of cyclin D1 at mRNA and protein levels. Taken together, ANT2 is expected to be a promising target against cyclin D1-overexpressing cancer, including breast cancer.

研究分野：分子標的癌予防

キーワード：ANT2 cyclin D1 breast cancer sesaminol perillyl alcohol troglitazone chemical biology

1. 研究開始当初の背景

現在、日本では年間5万人以上の女性が乳癌と診断され、乳癌は本邦における女性の癌罹患率第1位である。さらに乳癌の罹患率は年々増加傾向にあり、日本人女性にとって乳癌に対する抜本的な予防対策が急務である。なかでも乳癌の大半を占めるエストロゲンレセプター(ER⁺)陽性乳癌の本質的病因の理解と、科学的根拠に基づいた乳癌の化学予防法の確立は極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

これまで申請者らの教室で行ってきた癌細胞増殖を抑制する食品・天然物スクリーニングのノウハウに加え、ナノ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジーの先端技術を応用することで、(1)ER⁺陽性乳癌の増殖の要であるER⁺の発現を抑制する食品成分を探索し、(2)それら食品成分の直接の標的タンパク質をケミカルバイオロジーの技術を用いて同定する、ことでER⁺陽性乳癌の増殖における『黒幕分子』の発見を目指す。『黒幕分子』の発見により、ER⁺陽性乳癌の本質的病因が明らかになるとともに、『黒幕分子』を標的とした強力かつ効率的な分子標的乳癌予防法の実現が期待される。

3. 研究の方法

(1) ER⁺発現を抑制する食品成分のスクリーニング

ER⁺陽性ヒト乳癌細胞株 MCF7 に対し、細胞増殖抑制効果をもたらす化合物を WST-8 assay により1次スクリーニングを行う。続いて、1次スクリーニングでヒットした化合物群の中から、ER⁺の発現を抑制する物質をウエスタンブロット法により選別する。この2段階のスクリーニングを経て、乳癌細胞の増殖を抑制し、かつER⁺の発現を抑制する食品成分が選別される。

(2) 上記化合物に共通する結合タンパク質の同定

上記のスクリーニングでヒットした化合物をナノ磁性ビーズに固定化し、MCF7の細胞抽出液とを混合し、各ヒット化合物の結合タンパク質を精製する。各化合物に共通の結合タンパク質に着目し、それらを質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いて同定する。

(3) RNA 干渉を用いた上記結合タンパク質の機能解析

上記の行程で同定した結合タンパク質を siRNA により発現抑制し、MCF7 細胞内での ER⁺発現への影響や、細胞増殖抑制作用の有無や細胞周期への影響等について検証する。

4. 研究成果

(1) ER⁺発現を抑制する食品成分のスクリー

ニング

WST-8 assay による細胞増殖抑制効果をもたらす化合物のスクリーニング(1次スクリーニング)

申請者の教室で保有する食品成分や医薬品を対象に WST-8 assay によりスクリーニングした結果、ゴマの成分である **sesaminol**、シソやハーブの成分である **perillyl alcohol**、糖尿病治療薬として以前は使用されていた **troglitazone** の3化合物がそれぞれ濃度依存性に MCF7 の細胞増殖を抑制することを見出した(図1)。

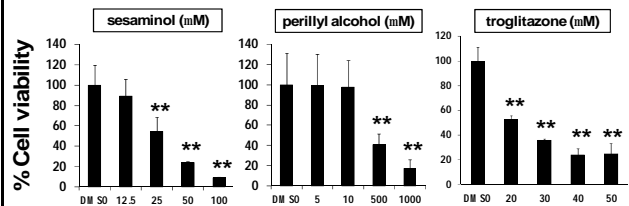


図1. sesaminol, perillyl alcohol, troglitazone による細胞増殖抑制効果 (培養剤72hr処理後/WST-8 assay) (**:p<0.01)

ヒット化合物による ER⁺発現抑制効果の検証(2次スクリーニング)

上記の3化合物の ER⁺発現抑制効果について、ウエスタンブロット法により検証した結果、3化合物とも濃度依存性に ER⁺の発現を抑制した。さらに ER⁺により転写制御され、細胞増殖促進に本質的な役割を担う cyclin D1 タンパク質の発現も併せて確認したところ、**cyclin D1 も濃度依存性の減少**を認めた(図2)。ここで当初の研究計画を進展させ、乳癌以外の癌細胞においても、細胞周期進行および細胞増殖に極めて重要な働きを担う cyclin D1 に解析対象を移行する方針に修正した。

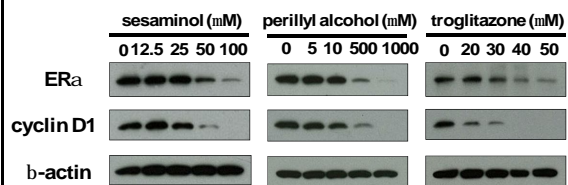


図2. sesaminol, perillyl alcohol, troglitazone によるERαおよびcyclin D1タンパク質の発現低下 (培養剤24hr処理後/ウエスタンブロット法)

(2) MALDI-TOF MS による3化合物共通の結合タンパク質の同定

sesaminol、perillyl alcohol、troglitazone をそれぞれナノ磁性ビーズに固定化し、MCF7細胞抽出液と混合後、精製した各化合物の結合タンパク質を銀染色にて検出した。これらの結合タンパク質を MALDI-TOF MS にて同定した結果、3化合物共通の結合タンパク質として、ミトコンドリア内膜タンパク質として知られる **ANT2** の同定に成功した(図3(a))。

さらに ANT2 に対する特異的抗体を用いてウエスタンブロット法を行い、ANT2 が3化合

物共通の結合タンパク質であることを確認した(図3(b))。

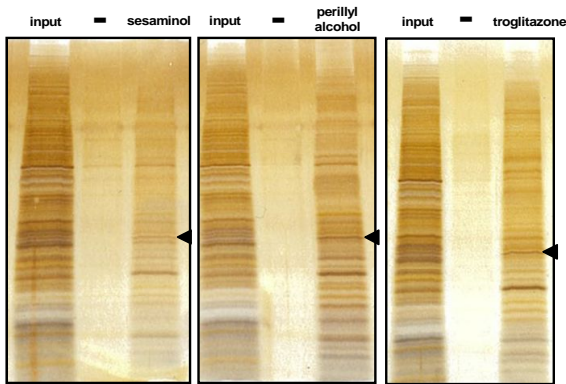


図3(a). sesaminol, perillyl alcohol, troglitazone 結合タンパク質の染色像



図3(b). ANT2特異的抗体によるANT2の検出(ウエスタンブロット法)

(3) siRNA を用いた ANT2 の機能解析

次に ANT2 を siRNA を用いて発現抑制し、MCF7 における cyclin D1 の発現や細胞増殖および細胞周期に対する影響について検証した。異なる配列を標的とする 2 種の siRNA (siANT2 #1, #2) を用いて、ANT2 の発現を抑制したところ、cyclin D1 の発現は減少した(図4(a))。

さらに siANT2 による MCF7 の細胞増殖抑制効果(図4(b))および G1 期停止(図4(c))を認めた。

以上の通り、siANT2 処理における挙動は sesaminol、perillyl alcohol、troglitazone 処理時の挙動と一致し、これらの化合物が ANT2 と結合することで、その機能を抑制している可能性が示唆された。

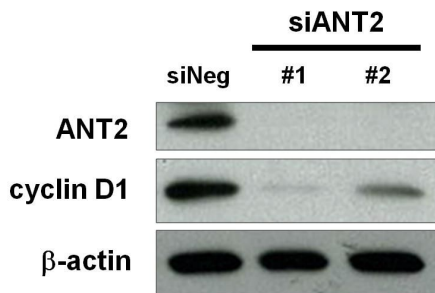


図4(a). siANT2によるcyclin D1の発現減少 (siANT2トランスフェクション後48hr/ウエスタンブロット法)

(4) ANT2 の cyclin D1 制御メカニズムの解析

ANT2 の cyclin D1 発現制御メカニズムの詳細について以下の実験により検証した結果、3つの異なるメカニズムにより、ANT2 は cyclin D1 の発現を制御しているものと考えられた。

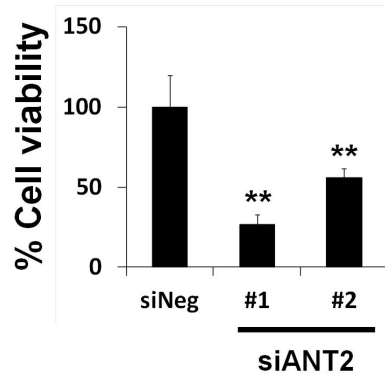


図4(b). siANT2による細胞増殖抑制効果 (siANT2トランスフェクション後72hr/WST-8 assay) (**; p<0.01)

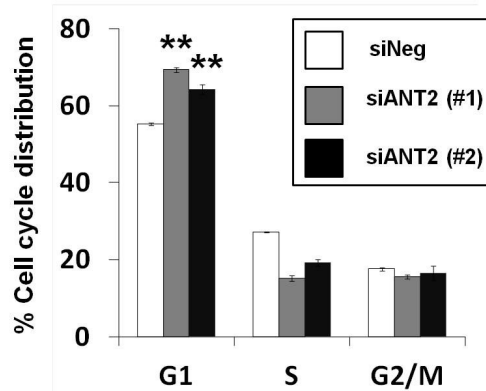


図4(c). siANT2によるG1期停止誘導 (siANT2トランスフェクション後72hr/フローサイトメトリー)(**; p<0.01)

第1の制御メカニズムとして、siANT2 処理時における cyclin D1 mRNA の発現量について real time RT-PCR 法により解析した結果、siANT2 により cyclin D1 mRNA は減少したことより(図5(a))、ANT2 は cyclin D1 を mRNA レベルで正に制御していると考えられた。

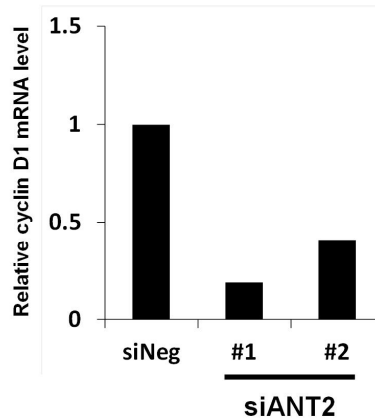


図5(a). siANT2によるcyclin D1 mRNAの発現減少 (siANT2トランスフェクション後72hr/real time RT-PCR)

第2のメカニズムとして、siANT2 処理により、cyclin D1 mRNA の翻訳制御において中心的な役割を果たすとされる mTORC1 への影響についてウエスタンブロット法を用いて検

証した。siANT2 処理により mTORC1 の基質である S6K および 4E-BP1 は脱リン酸化し(図 5(b))、このことより ANT2 が mTORC1 の活性を正に調節し、その結果、cyclin D1 mRNA の翻訳が亢進している可能性が示唆された。

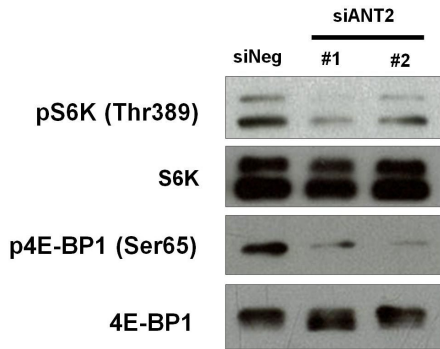


図5(b). siANT2によるmTORC1阻害作用 (siANT2トランスフェクション後48hr/ウエスタンブロット法)

第3のメカニズムとして、ANT2 による cyclin D1 の発現制御が、cyclin D1 タンパク質の安定性維持によるものか否かについて検証した。siANT2 処理に加え、プロテオソーム分解阻害剤である MG132 を処理することにより、siANT2 による cyclin D1 の減少は回復したことから(図 5(c))、ANT2 は cyclin D1 をプロテオソーム分解から保護し、タンパク質レベルで安定化させていることが推察された。

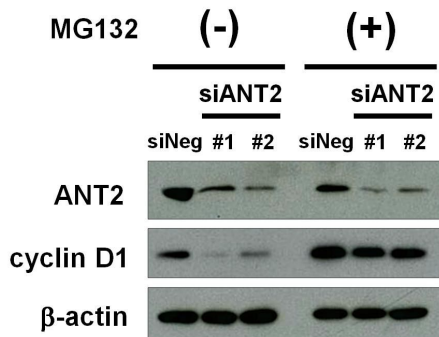


図5(c). siANT2によるcyclin D1低下作用のプロテオソーム分解依存性の評価 (siANT2トランスフェクション後48hr/ウエスタンブロット法)

以上の通り、ANT2 は cyclin D1 の発現を、mRNA レベルでの調節(転写亢進など)、mTORC1 経路の活性化(翻訳亢進など)、およびタンパク質の安定化といったように、多面的に制御している可能性が考えられた(図 6)。

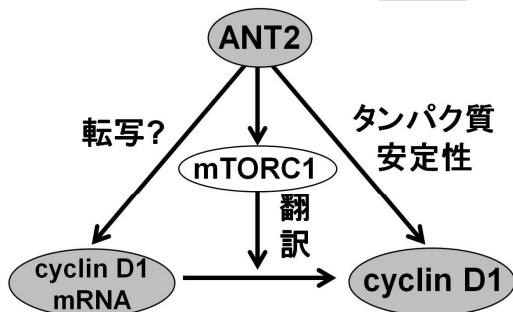


図6. ANT2によるcyclin D1の多面的制御

多くの癌細胞において ANT2 および cyclin D1 が過剰発現していることを考えれば、cyclin D1 を多面的に制御する ANT2 は癌予防における有望な分子標的として期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

The pleiotropic regulation of cyclin D1 by newly identified sesaminol-binding protein ANT2. (Watanabe M, Iizumi Y, Sueno M, Iizuka-Ohashi M, Sowa Y, Sakai T. *Oncogenesis*. 2017 Apr 3;6(4):e311.)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 元樹 (WATANABE, Motoki)
京都府立医科大学・分子標的癌予防医学・助教
研究者番号：40723581

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：