

ID No.	242
研究課題名	新規エストロゲン受容体活性制御分子の生体機能解明と革新的乳癌治療薬の開発
研究代表者	片桐 豊雅 (徳島大学先端酵素学研究所・教授)
研究組織	
受入教員	津本 浩平 (東京大学医科学研究所・教授)
研究分担者	吉丸 哲郎 (徳島大学先端酵素学研究所・助教) 長門石 暁 (東京大学医科学研究所・助教)
研究報告書	
<p>本年度は下記の件について、検討を行った。</p> <p>1. BIG3-PHB2 結合阻害天然化合物の同定</p> <p>申請者らが開発した BIG3-PHB2 相互作用阻害ドミナントネガティブ・ペプチド (ERAP ペプチド) よりも安定的に抗腫瘍効果を導くことができる化合物として、PHB2 との結合を認めることが報告されていた天然化合物キサントフモールに着目し、BIG3-PHB2 の相互作用阻害および ER 陽性乳がんに対する <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 抗腫瘍効果を検討した。その結果、キサントフモールは、ERAP ペプチドと同様に、PHB2 と直接的に結合することで、BIG3 と PHB2 の相互作用を効率的に阻害し、その結果 PHB2 の ERα 活性の抑制機能を誘導し、E2 依存性乳がん細胞増殖の顕著な抑制および乳癌細胞移植ヌードマウスモデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示した。</p> <p>2. PHB2 核内移行メカニズムの解明</p> <p>(1) 核内移行タンパク質ファミリー (KPNA:KPNA1-7) の ERα 陽性乳がん細胞株 11 種および正常乳腺における発現を <i>real-time</i> PCR にて調べた結果、KPNA1-6 は正常乳腺細胞およびいずれの乳がん細胞株においても高い発現を認めたが、KPNA7 のみほとんどの細胞株にて発現を認めなかった。</p> <p>(2) 乳がん細胞にて発現を認めた KPNA1-6 と PHB2 の相互作用について過剰発現系にて調べた結果、KPNA1,2,5,6 のそれぞれと相互作用を認める一方、E2 刺激下にて KPNA1,2,5,6 と PHB2 の細胞内局在を調べたところ、KPNA1,5,6 と PHB2 の共発現では PHB2 の核移行が認められたが、KPNA2 においては PHB2 の核移行が認められなかった。</p> <p>(3) ERα 陽性乳がん細胞株 MCF-7, KPL-3C における RNA 干渉法 (siRNA) にて</p>	

BIG3 および各 KPNA (KPNA1-6) の発現抑制時の E2 依存性 PHB2 核移行への影響について、核・細胞質分画を用いた Western Blot 法を行った。その結果、BIG3 発現抑制細胞および ERAP ペプチド投与細胞のどちらにおいても、KPNA1, 5, 6 それぞれ発現抑制することで PHB2 の核内移行が阻害されたが、KPNA2 においてのみ阻害されなかった。また、KPNA1, 5, 6 にて発現抑制 ER α 標的遺伝子である BIG3 および TFF1 の有意な発現抑制も確認した。

(4)各 KPNA1,5,6 それぞれと PHB2 との結合領域を調べたところ、いずれの KPNA も PHB2 の 1-199 アミノ酸残基の領域に結合を認めた。また、BIG3 も KPNAs と同じく PHB2 の 1-199 アミノ酸残基の領域に結合を認めた。

3. BIG3-PHB2 結合阻害化合物のスクリーニング

共同研究者である津本教授、長門石助教によって進められている PHB2 リコンビナントタンパク質と BIG3 部分長のリコンビナントタンパク質の発現、精製に成功した。