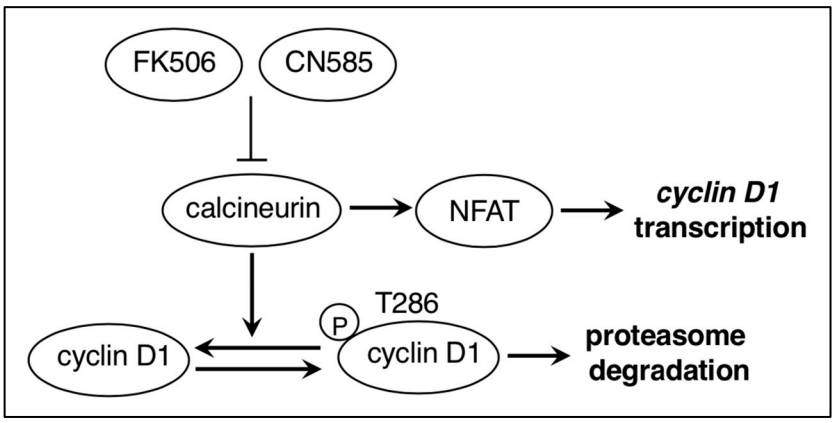
46　トリプルネガティブ乳癌の新規抗がん剤開発	島田　緑

【目的】サイクリン D1 は CDK4、6 と結合して主に G1/S 期の細胞周期進行を制御する。予後不良な乳癌のサブタイプとして知られているトリプルネガティブ乳癌を含む多くのがんでは、サイクリン D1 が過剰発現していることが知られている。サイクリン D1 の発現制御、特にタンパク質分解制御にはサイクリン D1 の Thr286 のリン酸化がプロテアソームによるタンパク質分解を誘導する。本研究ではサイクリン D1 の発現制御に関わる新たな分子としてカルシニューリンを同定した。その分子機構の解明はトリプルネガティブ乳癌治療における新たなターゲットの発見につながる可能性がある。

【方法】トリプルネガティブ乳癌細胞株である Hs578T をカルシニューリン阻害薬である FK506、CN585 で処理し、FACS を用いた細胞周期解析、ウエスタンブロッティングおよび real time PCR を用いた細胞周期関連タンパク質の発現解析を行った。FK506 存在下でプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて、サイクリン D1 分解における FK506 の影響を解析した。リコンビナントカルシニューリン、精製した Flag-サイクリン D1 を用いて、サイクリン D1 分解制御に重要である Thr286 の脱リン酸化作用を *in vitro* で検証した。またレンチウイルスの系を用いた shRNA により、カルシニューリンをノックダウンすることにより、サイクリン D1 への発現への影響を検証した。

【結果】Hs578T を FK506、CN585 で処理すると G1/S 期の進行が遅延することが分かった。G1／S 期の進行に必要なサイクリン D1 の発現が顕著に低下し、サイクリン D1 を過剰発現すると部分的に G1/S 期の進行遅延が抑制された。またサイクリン D1 の発現減少はタンパク質分解が亢進することにより引き起こされていることが分かった。*in vitro* の脱リン酸化アッセイにより、カルシニューリンがサイクリン D1 の Thr286 を脱リン酸化することを見出した。さらにカルシニューリンをノックダウンすると、サイクリン D1 の発現量は減少した。以上のことから、カルシニューリンはサイクリン D1 の Th286 を脱リン酸化することにより、サイクリン D1 の発現を制御していることを明らかとした。

カルシニューリンによる Th286 脱リン酸化を介したサイクリン D1 の分解制御



46. トリプルネガティブ乳癌の新規抗がん剤の開発

島田　緑

*山口大学 共同獣医学部 生体機能学講座 生化学教室

Key words：カルシニューリン，サイクリンD1，乳癌，細胞周期

緒　言

乳癌は日本人女性が罹患する悪性腫瘍の第1位であり、その罹患数及び死亡数は増加の一途をたどっている。乳癌の70%にはホルモン療法が有効であるが、その後に治療抵抗性である再発性乳癌が起こるという重大な課題がある。また、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2全てが陰性のいわゆるトリプルネガティブ乳癌に対しては、薬物療法は化学療法に限定され、その予後は極めて不良である。したがって乳癌に対する有効な分子標的治療の開発が緊急課題となっている。カルシニューリンはCa^{2+}／カルモジュリン依存性に活性化されるSer／Thr脱リン酸化酵素である。最近カルシニューリンが乳癌検体、特にトリプルネガティブ乳癌において活性化していると報告されており［1］、カルシニューリンは乳癌治療における新規バイオマーカーとして期待される。また、細胞周期G1／S期の進行に重要であるサイクリンD1はトリプルネガティブ乳癌を含め、多くのがんで高発現しており、その主な原因としてはタンパク質分解異常であると考えられている［2，3］。カルシニューリンは細胞周期の進行に重要であることが報告されており［4］、カルシニューリン阻害作用のあるシクロスポリンA、タクロリムス（FK506）によりサイクリンD1発現への影響を示唆する報告が複数ある。しかしながらその詳細はほとんど分かっていない。サイクリンD1はThr286がリン酸化されると、SCF（Skp、Cullin、F-box containing）E3ユビキチンリガーゼによりユビキチン化され分解される。Thr286をリン酸化する酵素としてはGSK3β、ERK、p38が報告されているが［5］、脱リン酸化の制御については不明である。本研究ではカルシニューリンがThr286を脱リン酸化することによってサイクリンD1の分解を抑制し、G1/S期の進行を制御していることを明らかとした。

方　法

1.　カルシニューリン阻害薬であるFK506、CN585を用いた細胞周期制御の解析

トリプルネガティブ乳癌細胞株Hs578TおよびMDA-MB-231を10μM、50μMFK506、25μM、50μMCN585で処理し、細胞増殖への影響と、FACSを用いた細胞周期の解析を行った。細胞周期調節に重要であるサイクリンA2、B1、D1、E、Rb、Cdk4などについてウエスタンブロッティングにより発現状態を検討した。同様にアポトーシスのマーカーであるcleaved caspase3、cleaved PARP1［6］の発現状態を検討した。またダブルチミジンブロックによるG1／S期同調下でFK506、CN585を添加し、G1/S期からリリースさせFACSによる細胞周期の進行およびウェスタンブロットによるタンパク発現量を検討した。

2.　カルシニューリン阻害薬によるサイクリンD1発現抑制の解析

カルシニューリン阻害薬によるサイクリンD1の発現減少について、FK506と同時にプロテアソーム阻害薬MG132で処理し、サイクリンD1発現量への影響をウエスタンブロッティングで解析した。

3.　カルシニューリン阻害薬存在下におけるサイクリンD1過剰発現による細胞周期制御の解析

Flag-サイクリンD1をドキシサイクリン添加により過剰発現できるHs578Tを作製し、ダブルチミジンブロック法により細胞周期をG1/S期に同調させ、細胞周期の進行をFACSにより解析した。

*現在の所属：山口大学 共同獣医学部 生体機能学講座 獣医生化学教室

4. *in vitro* ホスファターゼアッセイを用いた、カルシニューリンによるサイクリン D1 の Thr286 脱リン酸化解析

レンチウイルスベクターを用いて Flag タグ付きサイクリン D1 を Hs578T に発現させた。回収した細胞からタンパク質を抽出し、Flag pull down 法を用いて Flag-サイクリン D1 を精製した。リコンビナントカルシニューリンと反応させ、サイクリン D1 の Thr286 脱リン酸化への影響についてサイクリン D1 Thr286 リン酸化抗体を用いてウェスタンブロットにより解析した。

5. カルシニューリンノックダウンによるサイクリン D1 発現への検証

Hs578T、MCF7 細胞においてカルシニューリンをターゲットにした shRNA をレンチウイルスの系を用いて発現させ、カルシニューリンノックダウンによるサイクリン D1 発現への影響をウェスタンブロットにより解析した。

結　果

1. カルシニューリン阻害薬である FK506、CN585 を用いた細胞周期制御の解析

FK506 は FKBP12 との結合を介する間接的なカルシニューリン阻害薬［7］、CN585 は直接的なカルシニューリン脱リン酸化酵素阻害薬として報告されている［8］。Hs578T を FK506、カルシニューリン酵素活性阻害薬 CN585 で処理すると細胞増殖は顕著に抑制され、処理後 24 時間では細胞死が誘導されていることが判明した。そこで詳細な細胞周期への影響について FACS を用い検討すると、カルシニューリン阻害薬存在下では S 期細胞が減少し、細胞死集団を意味する Sub G1 期細胞が増加することが分かった。細胞周期の進行に必須な複数のサイクリン、Cdk などの発現をウエスタンブロッティングで検討したところ、G1／S 期の進行に必要なサイクリン D1 の発現が減少し、サイクリン D1／Cdk4 の標的である Rb の Ser780 リン酸化［9］が減少することが分かった。ダブルチミジンブロック法を用いて G1／S 期に細胞を同調させ FK506 で処理後にリリースすると、G1／S 期の進行が顕著に遅延した。G1／S 期に同調した系においてもサイクリン D1 の発現減少および Rb の Ser780 リン酸化が減少することが分かった。CN585 を用いた場合においても、サイクリン D1 の発現減少、G1/S 期の進行が遅延するなど、同様の結果が得られた。以上のことから、カルシニューリンはサイクリン D1 の発現および G1/S 期の進行に重要である可能性が示唆された。また、FK506 処理により cleaved caspase 3、cleaved PARP1 が増加し、アポトーシスが誘導されていることが判明した（図 1）。

2. カルシニューリン阻害薬によるサイクリン D1 発現抑制の解析

カルシニューリン阻害によりサイクリン D1 タンパク質分解が亢進することで、サイクリン D1 の発現が減少している可能性について、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて検討した。その結果、MG132 存在下では FK506 によるサイクリン D1 の発現減少が抑制されることが分かった（図 2）。従ってカルシニューリンはサイクリン D1 のタンパク分解を抑制している可能性が示唆された。また細胞周期への影響を検討するために、M 期のマーカーであるヒストン H3-Ser10 のリン酸化状態を調べると、FK506 処理で減少していた H3-Ser10 のリン酸化は、MG132 を同時に処理することにより回復した。このことからサイクリン D1 の分解を抑制することにより、細胞周期の異常も回復することが示唆された。

3. カルシニューリン阻害薬存在下におけるサイクリン D1 過剰発現による細胞周期制御の解析

カルシニューリン阻害によりサイクリン D1 の発現が減少することにより、G1／S 期の進行が遅延する可能性を検証するために、ドキシサイクリン添加により Flag-サイクリン D1 を過剰発現させ細胞周期の進行を FACS 解析により検討した。ダブルチミジンブロックで G1/S 期に同調させリリースすると、FK506 存在下においてサイクリン D1 を発現させると部分的に G1／S 期の進行遅延が回復した。この結果からカルシニューリンを阻害するとサイクリン D1 の発現が減少することにより、G1/S 期の進行が遅延する可能性が示された。

4. *in vitro* ホスファターゼアッセイを用いた、カルシニューリンによるサイクリン D1 の Thr286 脱リン酸化解析

カルシニューリン阻害薬 *in vitro* ホスファターゼアッセイを行った結果、カルシニューリン存在下においてサイクリン D1-Thr286 のリン酸化が減少した。従ってカルシニューリンがサイクリン D1 を直接的に脱リン酸化する可能性が示され、カルシニューリンはこれまで未同定だったサイクリン D1 の脱リン酸化酵素であることが示唆された。

5. カルシニューリンノックダウンによるサイクリンD1発現への検証

シクロスポリンAとFK506は、それぞれ細胞内でシクロフィリンまたはFKBP（FK506 binding protein）と呼ばれる一群のタンパク質と結合し、複合体となってカルシニューリンの活性を阻害する特性をもつ。従ってこれまで阻害剤を用いて発見されてきた現象がカルシニューリンの生理機能を阻害しているのか、他の分子の阻害によるものであるかを厳密に検証する必要がある。そこで我々はレンチウイルスの系を用いてカルシニューリンをノックダウンし、カルシニューリンがサイクリンD1の発現に与える影響を検討した。その結果、カルシニューリン阻害によりサイクリンD1の発現が減少したことから、カルシニューリンがサイクリンD1の発現に必要であることが分かった。

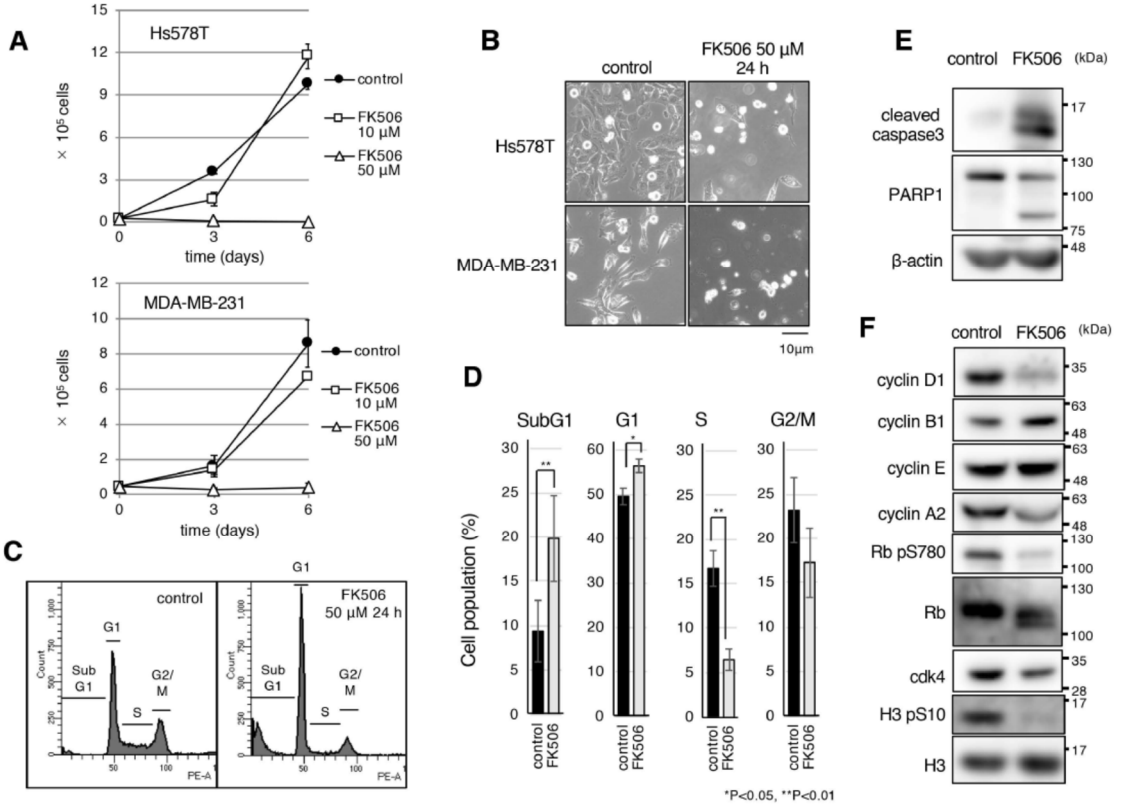


図1. カルシニューリン阻害による細胞周期への影響解析

A) Hs578T、MCF7をFK506で処理したときの細胞増殖曲線を示している。Hs578T、MCF7ともにFK506 10μMでの変化はわずかだが、50μMでは増殖が抑制された。

B) FK506 50μM 24h処理しFACSを用いた解析を行った結果を示している。SubG1細胞の増加、G1期細胞の増加とS期細胞の減少を認めている。

C) ダブルチミジンブロック法を用いてHs578T細胞を同調しFK506 50μM存在下でリリースしFACSで細胞周期解析を行った結果を示している。4h、8hにてFK506存在下ではG1/S期進行の遅延がみられる。

D、E) FK506 50μM 24h処理しFACSを用いた解析を行った結果を示している。Cleaved caspase3、cleaved PARP1が増加したことからアポトーシスが誘導されたと考えられる。サイクリンD1とその下流であるRb-Ser780のリン酸化が減少した。

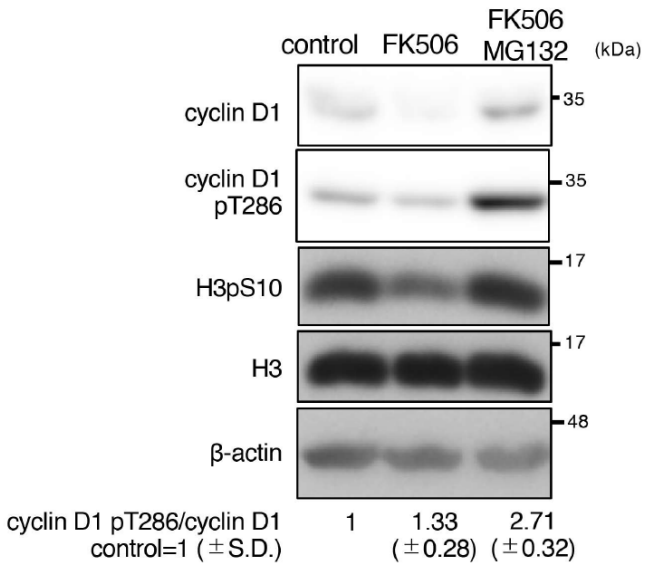


図2. カルシニューリンによるサイクリンD1発現制御の解析

Hs578T細胞をFK506、MG132で処理したサンプルでウエスタンブロッティングを行った結果を示している。MG132存在下ではFK506によるサイクリンD1の発現減少が抑制され、Thr286のリン酸化が増加した。

考　察

カルシニューリンは免疫応答の活性化、細胞の分裂など多様な生命現象に関わり、Ca^{2+}シグナルを仲介する重要なシグナル伝達分子である。カルシニューリン阻害作用を持つシクロスポリンA、FK506を用いた研究により、カルシニューリンがサイクリンD1の転写に重要であることが報告されている［4］。本研究においても長時間FK506を投与すると、サイクリンD1の転写を抑制することを確認したが、短時間処理により転写に影響を与えない場合でも、サイクリンD1のタンパク量は減少した。詳細な解析の結果、カルシニューリンはサイクリンD1の転写活性化以外にも、タンパク分解を阻害することでG1／S期の進行を促進する作用を持つことを見出した。サイクリンD1-Thr286のリン酸化は複数のリン酸化酵素が関与することが報告されているが［5］、脱リン酸化酵素についてはこれまで報告されていなかった。本研究によりトリプルネガティブ乳癌で高活性化しているカルシニューリンがサイクリンD1の発現制御に関与することが明らかとなった。カルシニューリン阻害により、サイクリンD1の発現低下、細胞増殖抑制を引き起こすことができるため、カルシニューリンは新たなトリプルネガティブ乳癌の標的となる可能性が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究は、名古屋市立大学医学研究科細胞生化学分野の加藤洋一教授との共同研究で行いました。この場をお借りして深く御礼申し上げます。

文　献

1) Quang CT, Leoucher S, Passaro D, Fuhrmann L, Nourieh M, Vincent-Salomon A, et al. The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. Cell Death Dis. 2015;6:e1658. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25719243 DOI: 10.1038/cddis.2015.14.

2) Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. Nat Rev Cancer. 2011;11(8):558-72. Epub 2011 Jul 8. PMID: 21734724　DOI: 10.1038/nrc3090.

3) Hartel PH, Donald R2, Fleming. Cyclin D1 expression in triple-negative breast cancer with new treatment implications. Clinics in Oncology. 2016;1:1044.

4) Kahl CR, Means AR. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. Endocr Rev. 2003;24(6):719-36. Epub 2003 Dec 13. PMID: 14671000　DOI: 10.1210/er.2003-0008.

5) Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Molecular cancer. 2007;6:24. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17407548 DOI: 10.1186/1476-4598-6-24.

6) Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta. 2013;1833(12):3448-59. Epub 2013 Jun 19. PMID: 23770045 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.

7) Weischer M, Rocken M, Berneburg M. Calcineurin inhibitors and rapamycin: cancer protection or promotion? Experimental dermatology. 2007;16(5):385-93. Epub 2007 Apr 18. PMID: 17437481 DOI: 10.1111/j.1600-0625.2007.00555.x.

8) Erdmann F, Weiwad M, Kilka S, Karanik M, Patzel M, Baumgrass R, et al. The novel calcineurin inhibitor CN585 has potent immunosuppressive properties in stimulated human T cells. J Biol Chem. 2010;285(3):1888-98. Epub 2009 Nov 20. PMID: 19923214　DOI: 10.1074/jbc.M109.024844.

9) Macdonald JI, Dick FA. Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. Genes & cancer. 2012;3(11-12):619-33. PMID: 23634251
DOI: 10.1177/1947601912473305.