

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

羽原 誠, 島田 緑

1. はじめに

エストロゲン受容体 α (estrogen receptor α : ER α)は核内受容体に分類され、リガンド依存性の転写因子として機能する。リガンドの結合によりER α のホモ二量体化が誘導され、核内に蓄積する。核内でER α は標的遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域に結合し、コレギュレーターとともに転写を制御する。これらのシグナル伝達の制御において、リン酸化、ユビキチン化を含む多彩なER α への翻訳後修飾が重要な役割を果たす。

主要な女性ホルモンであるエストロゲンはER α を介して、生殖機能の発達・維持をはじめとした多彩な生理現象を制御している。一方がんにおいて、ER α は細胞の増殖や生存に関与する遺伝子の発現を誘導し、がんの進行に中心的な役割を果たす。乳がんの70%以上はER α 陽性であり、ER α を標的とした選択的エストロゲン受容体分解薬 (selective estrogen receptor degrader: SERD) や選択的エストロゲン受容体モジュレーターが内分泌治療法として開発され、臨床応用されてきた。しかしながら内分泌治療症例の約半数は耐性化、再発を起こす¹⁾。内分泌治療抵抗性となったER陽性進行再発乳がんに対し、CDK4/6阻害薬の併用が有効であることが示されている。しかし、副作用や抵抗性が課題となっており、依然として乳がん関連の死亡の多くはER陽性乳がんに起因している¹⁾。耐性獲得後も乳がん細胞の増殖はER α に依存する場合が多く²⁾、耐性化克服にはER α の発現および機能の制御メカニズムのさらなる理解が必要である。本稿ではER α の制御について、タンパク質の安定性を中心に、著者らの最近の研究内容を含めて紹介したい。

2. ユビキチン化によるER α の安定性制御

ユビキチン化はタンパク質の安定性を制御する主要な翻訳後修飾である。ユビキチン化ではE3リガーゼによりユビキチンが標的タンパク質のリシン残基にイソペプチド結合で付加される。多くの場合ユビキチン中のリシン残基に連鎖的にユビキチンが結合し、ポリユビキチン鎖を形成する。ユビキチンの48番目のリシン残基 (K48) を介して形成されたポリユビキチン鎖は、26Sプロテアソームの調節サブユニットにより認識されプロテアソームにより分解される。

ER α においてもユビキチン化を介した安定性の制御がよく知られている。SERDであるフルベストラントは、ER α に対する完全アンタゴニスト作用とユビキチン-プロテアソーム系によるER α 分解促進作用によりER α を阻害し、抗腫瘍効果を発揮する。ユビキチン化によるER α の制御は乳がんの治療標的として注目されており、ユビキチン化によりER α の分解を誘導するE3リガーゼとER α 結合分子のキメラ分子 (proteolysis targeting chimeric: PROTACs) などが開発され、一部 (ARV-471, AC0682) は乳がんを対象とした臨床試験が行われている。ユビキチン化は部位特異性が低く、標的のリシンを欠失させても近傍のリシンがユビキチン化されるため、ER α のユビキチン化部位の詳細な理解は進んでいない。少なくともK302, K303はBRCA1/BARD1による主要なモノユビキチン化部位³⁾、フルベストラントによる主要なポリユビキチン部位であることが報告されている⁴⁾。詳細な標的部位は不明なものの、多くのE3リガーゼ、脱ユビキチン化酵素がER α のユビキチン化状態の制御を介して、安定性を調節していることが知られている (表1)。E3リガーゼのなかでもE6AP, STUB1, MDM2, TRIM25, SKP2などのER α のポリユビキチン化を触媒するものは、一般的にER α の分解を促進する。一方でBRCA1/BARD1, RNF8, RNF31, TRIM11などER α のモノユビキチン化を触媒する酵素は分解を抑制する。TRIM56, RNF181はK63特異的ポリユビキチン化を触媒することによりK48特異的ポリユビキチン化とそれに続く分解を抑制する。2019年にXiaらによりER α の最初の脱ユビキチン化酵素としてUSP7が同定されてから⁵⁾、OTUD7B, MINDY1, USP15, USP22, USP35などがER α の脱ユビキチン化を触媒し、安定化させることが明らかになってきている。

山口大学共同獣医学部 (〒753-8515 山口県山口市吉田1677-1 農学部・共同獣医学部棟209)

Decoding estrogen receptor regulation to develop novel therapies for ER-positive breast cancer

Makoto Habara and Midori Shimada (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, Yamaguchi, 753-8515, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950546

© 2023 公益社団法人日本生化学会

表1 ER α の安定化に関わるユビキチン化酵素および脱ユビキチン化酵素. 幅広く記載するため, 直接ER α を触媒することが証明されていない分子も含めた.

E3 リガーゼおよび関連分子					
遺伝子名	別名	分類	ER α への作用		コメント
			ユビキチン化	分解	
STUB1	CHIP	RING (U-box)	Poly \uparrow	促進	
SKP2	FBL1	RING (F-box)	Poly \uparrow	促進	
SPOP		RING (Cullin)	Poly \uparrow	促進	
MDM2		RING	Poly \uparrow	促進	
TRIM25	EFP	RING	Poly K48 \uparrow	促進	
VHL	pVHL	RING	Poly \uparrow	促進	
ZNF598*	HEL2	RING	(Poly \uparrow)	促進	*ZNF598 自身による ER α のユビキチン化の変化は確認していない
UBE3A	E6AP	HECTc	Poly \uparrow	促進	
KAT7	HBO1	非典型	Poly \uparrow	促進	
CUEDC2*		—	(Poly \uparrow)	促進	*酵素活性はない. E3 リガーゼ複合体の相互作用分子
RBCK1*	HOIL-1	RING (RBR)	(Poly K48 \downarrow)	抑制	*ER α をユビキチン化することは証明されていない RNF31 と複合体を形成するため, それを介した作用かもしれない
RNF31	HOIP	RING (RBR)	Mono \uparrow	抑制	
BRCA1/ BARD1		RING	Mono \uparrow	抑制	
RNF181		RING	Poly K63 \uparrow , (K48 \downarrow)	抑制	
RNF8		RING	Mono \uparrow	抑制	
TRIM11		RING	Mono \uparrow (poly K11, 27, 48 \downarrow)	抑制	
TRIM56	RNF109	RING	Poly K63 \uparrow , (K48 \downarrow)	抑制	
SMURF1*		HECT	(poly K48 \downarrow)	抑制	*ER α をユビキチン化することは証明されていない
SHARPIN*	SIPL1	—	(Mono \uparrow)	抑制	*酵素活性はない RNF31 と複合体を形成するため, それを介した作用かもしれない
ZNF213*		—	(poly K48 \downarrow)	抑制	*酵素活性は知られていない
脱ユビキチン化酵素					
遺伝子名	別名	分類	ER α への作用		コメント
			ユビキチン化	分解	
USP14*		USP	(Poly \downarrow)	抑制	*特異的阻害剤での結果
USP15		USP	Poly K48 \downarrow	抑制	
USP22		USP	Poly K48, K63 \downarrow	抑制	
USP35		USP	Poly \downarrow	抑制	
USP7	HAUSP	USP	Poly K48 \downarrow	抑制	
UCHL5*	UCH37	UCH	(Poly \downarrow)	抑制	*特異的阻害剤での結果
OTUD7B		OTU	Poly K11, K48 \downarrow	抑制	
MINDY1		MINDY	Poly K48 \downarrow	抑制	

RING : really interesting new gene domain, HECT : homologous to E6AP carboxy terminus domain, USP : ubiquitin specific protease, UCH : ubiquitin C-terminal hydrolase, OTU : ovarian tumor domain protease, MINDY : motif interacting with Ub-containing novel DUB family.

3. 翻訳後修飾を介したユビキチン化の制御

1) ユビキチン化に影響する翻訳後修飾と相互作用分子

ER α のユビキチン化および安定性を制御するのはユビキチン化を触媒する酵素のみではない。ER α の相互作用分子の結合や、リン酸化、糖鎖付加などによる翻訳後修飾もER α の安定性を制御する。たとえばプロリン異性化酵素であるPin1はER α のS118のリン酸化依存的にER α に結合し、E3リガーゼE6APの結合を阻害することでER α を安定化させる⁶⁾。リン酸化酵素MAPKによるER α のS294のリン酸化は、E3リガーゼSKP2の結合およびそれに続くユビキチン化と分解を促進する⁷⁾。興味深いことに、ER α の主要な標的遺伝子であるGREB1はER α のT553/554に糖鎖を付加しER α を安定化させる。GREB1ノックアウト乳がん細胞株ではE3リガーゼであるZNF598の結合とER α のユビキチン化が増加する⁸⁾。他にも多くの翻訳後修飾がER α を制御するが、詳細は拙稿を参照いただきたい⁹⁾。

2) カルシニューリンは脱リン酸化を介してER α を制御する

リン酸化は最も多く報告されているER α の翻訳後修飾である。ER α をリン酸化するキナーゼは多数知られているが、脱リン酸化酵素についてほとんど報告がない。我々の知る限りPP2AとPP5がER α のS118の脱リン酸化を介してエストロゲン応答時のER α の転写活性を抑制することが知られているのみである^{10,11)}。我々は、Ca²⁺依存性のセリン/トレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (calcineurin: CaN) が脱リン酸化を介してER α の安定性と活性を増強することを明らかにした¹²⁾ (図1)。カルシニューリンはPP2Bとしても知られ、NFATの脱リン酸化による転写活性化経路がよく研究されている。CaN/NFAT経路は多くのがんで活性化しており、がんの発生・進行に寄与していると考えられている¹³⁾。ER α のS294のリン

酸化は、E3リガーゼE6APによるポリユビキチン化とその後のER α の分解を促進する。CaNはER α のS294を直接脱リン酸化することで、ER α からE6APを遊離させ、ER α を安定化させる。さらに、CaNは細胞増殖シグナルの重要な経路であるAkt-mTOR経路のエストロゲン (E2) 依存的な活性化に必要であった。NFATc1はAktの上流で働くIRS2 (insulin receptor substrate 2) の転写を活性化することから、CaNを阻害するとIRS2の発現が減少しAkt経路が活性化されない可能性が考えられる。またmTORはER α の活性化に重要なS118のリン酸化を促進することを明らかにした。すなわち、CaNはエストロゲン (E2) 依存的にAkt-mTOR経路の活性化を介してER α の活性化に寄与すると思われる¹²⁾。これらの結果と一致して、内分泌治療を行った乳がん患者において、CaNの高発現は無再発生存期間を短縮させ、ER陽性乳がんの再発への関与が示唆された。

3) FKBP52はBRCA1とともにER α を安定化させる

ER α のポリユビキチン化と分解を阻害するようなER α の相互作用分子が多く報告されている。これらには転写制御因子、キナーゼ、ヌクレアーゼなど多彩な機能を持つタンパク質が含まれている¹⁴⁾。その多くは乳がん組織で発現が上昇し、ER α の安定性と乳がんの進行を促進する。このように、ER α の安定性を促進するタンパク質は、ER α の発現量を増加させ、標的遺伝子の発現、細胞増殖、内分泌治療抵抗性に関連している。我々はER陽性乳がんの新たな治療標的因子を同定するために、複数の生命科学データベースを横断的に解析し、以下の条件にてER α と密接に関連する乳がん予後不良因子を探索した¹⁵⁾。

- ① ER α の相互作用因子 (IntActまたはBioGRIDデータベース)
- ② mRNA発現がER α mRNAの発現と相関する [TCGA BRCA (The Cancer Genome Atlas Breast Cancer) にて、ピアソン相関係数>0.2]

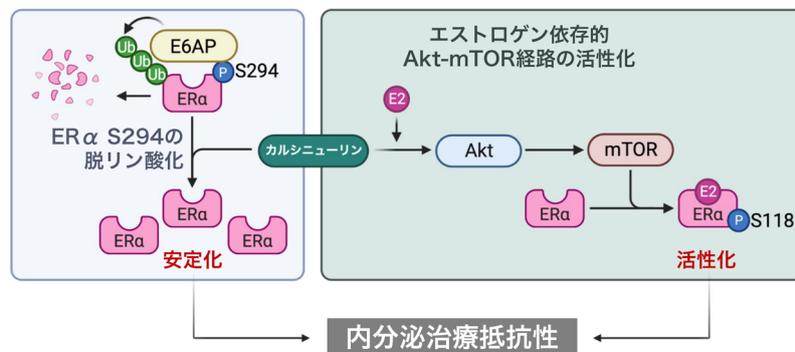


図1 カルシニューリンによる脱リン酸化を介したER α の安定性および活性の制御

カルシニューリンはER α S294を直接脱リン酸化し、E6APによるポリユビキチン化と分解を防ぐことでER α を安定化する(左)。さらに、カルシニューリンはエストロゲン (E2) 刺激でAkt-mTOR経路を活性化し、ER α のS118のリン酸化を誘導する(右)。(Masaki and Habara et al., *PNAS*, 2021¹²⁾ より一部改変)

- ③ mRNA 発現レベルが、がん周囲正常組織よりも ER 陽性乳がんで高い [TCGA BRCA にて, \log_2 (ER 陽性乳がん/正常) > 1]
- ④ mRNA 高発現が ER 陽性乳がん患者の無再発生存の短縮と関連する [Kaplan-Meier Plotter (gene chip) にて, ハザード比 > 1, $p < 0.01$]

このすべての条件を満たす分子として FKBP52 (FK506 binding protein 52), Cyclin D1, Grainyhead like transcription factor 2 を取得した。これらの中で FKBP52 は最も高いハザード比を示すにもかかわらず、ER 陽性乳がんとの関連がほとんど知られていなかったことから FKBP52 に注目した。FKBP はプロリン残基のシス・トランス変化を促進し、構造変化を促すプロリン異性化酵素に分類される。FKBP は広義では 17 種あり、免疫抑制剤として有名な FK506 に結合するファミリーである。FKBP52 は異性化酵素活性 (FK1) ドメイン、FK1 に類似しているが酵素活性を持たない FK2 ドメイン、タンパク質間相互作用に重要なテトラトリコペプチドリピート (TPR) ドメインを持つ。ホモログである FKBP51 とともに核内受容体の構成因子として知られており、受容体の機能を制御する。乳がん細胞株において FKBP52 は ER α の安定性を高めるが、これらの作用には、FK1 ドメインと ER α の相互作用に必要な TPR ドメインが必須であった。ER α の制御と一致して、ノックダウンおよび化合物による FKBP52 の阻害は、乳がん細胞の増殖を顕著に抑制した。重要なことに、この腫瘍抑制効果は、乳がん細胞株移植マウスやフルベストラント耐性乳がん細胞株でも確認された。一方、FKBP51 は、ER 陽性乳がんよりもがん周囲正常組織で多く発現し、ER α の安定性を低下させ、FKBP51 の高発現は ER 陽性乳がん患者の無再発生存期間の延長と関連していた。FKBP51, 52

の ER α 制御機能の差が生じるメカニズムを明らかにするため、E3 リガーゼに着目した。FKBP52, ER α と相互作用する E3 リガーゼを探索した結果、がん抑制因子として重要な BRCA1 を同定した。BRCA1 は上述したように ER α をモノユビキチン化することが知られている E3 リガーゼである。そこで BRCA1 の ER α 安定性への役割を調べたところ、FKBP52 と同様に、BRCA1 は ER 陽性乳がんを高発現する予後不良因子であり、ER α の安定性を増加させた。FKBP52 を阻害すると、BRCA1 と ER α の相互作用が減少したことから、FKBP52 は BRCA1 と ER α の相互作用を促進し、ER α を安定化させると考えられた。FKBP51 は、FKBP52 のこの効果に競合し、結果として ER α の安定性を増加させるのかもしれない (図 2)。乳がんにおいて FKBP52, 51 の発現のバランスが ER α の安定性を制御し、乳がんの進行に関与する可能性がある。今後は抗がん剤開発につなげるため FKBP52 阻害剤の開発や ER α に対するプロリン異性化の意義について検討していきたい。

4. まとめと展望

ER α は乳がんの有望な治療標的であり、内分泌療法の進歩により、乳がん患者の予後は著しく改善されている。しかし、再発や治療抵抗性は依然として大きな課題であり、新たな治療法の検討が続けられている。ER α は治療標的としての重要性から盛んに研究が行われ、多くのデータが蓄積されてきている。相互作用データベース上には 2000 を超える ER α の相互作用分子が登録されているが、相互作用の意義が不明の分子は非常に多い。また、質量分析により同定された翻訳後修飾の意義も十分には理解されていない。ChIP-Seq 等から得られるシストロームの情報は転写

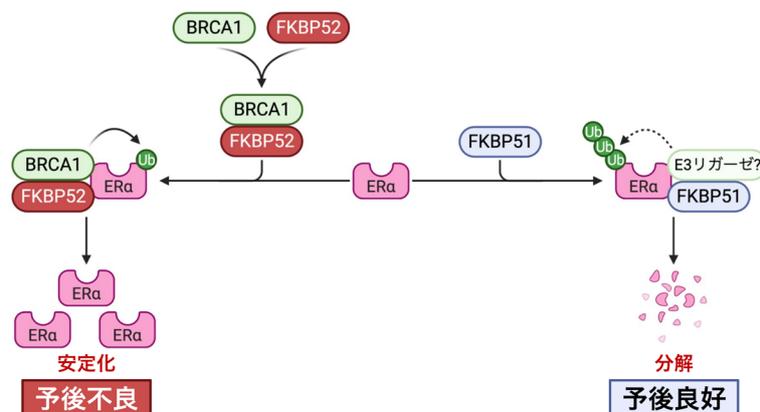


図 2 FKBP による ER α 安定性の制御

FKBP52 は BRCA1 とともに ER α と相互作用し、ER α を安定化・活性化する。FKBP52 の高発現は、ER 陽性乳がん患者の無再発生存期間の短縮と関連している。一方、FKBP51 は ER α への結合において FKBP52 と競合し、タンパク質を不安定化させる可能性がある。FKBP51 の高発現は、ER 陽性乳がん患者における無再発生存期間の延長と関連している。(Habara et al., *PNAS.*, 2022¹⁵⁾ より一部改変)

因子を特徴づける重要な要素であるが、ER α の翻訳後修飾とシストロームの関連については、活性化に重要なS118のリン酸化以外報告がない。相互作用分子や翻訳後修飾を介した未知のER α の制御メカニズムの解明が新たながん治療法開発につながることを期待される。

謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、山口大学共同獣医学部生体機能学講座獣医学生理学のメンバーをはじめ、多くの共同研究者のご尽力により達成されたものです。この場を借りて、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lei, J.T., Anurag, M., Haricharan, S., Gou, X., & Ellis, M.J. (2019) Endocrine therapy resistance: new insights. *Breast*, **48**(Suppl 1), S26–S30.
- 2) Metcalfe, C., Friedman, L.S., & Hager, J.H. (2018) Hormone-targeted therapy and resistance. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, **2**, 291–312.
- 3) Eakin, C.M., Maccoss, M.J., Finney, G.L., & Klevit, R.E. (2007) Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5794–5799.
- 4) Berry, N.B., Fan, M., & Nephew, K.P. (2008) Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol. Endocrinol.*, **22**, 1535–1551.
- 5) Xia, X., Liao, Y., Huang, C., Liu, Y., He, J., Shao, Z., Jiang, L., Dou, Q.P., Liu, J., & Huang, H. (2019) Deubiquitination and stabilization of estrogen receptor α by ubiquitin-specific protease 7 promotes breast tumorigenesis. *Cancer Lett.*, **465**, 118–128.
- 6) Rajbhandari, P., Schalper, K.A., Solodin, N.M., Ellison-Zelski, S.J., Ping Lu, K., Rimm, D.L., & Alarid, E.T. (2014) Pin1 modulates ER α levels in breast cancer through inhibition of phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation. *Oncogene*, **33**, 1438–1447.
- 7) Bhatt, S., Xiao, Z., Meng, Z., & Katzenellenbogen, B.S. (2012) Phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase promotes estrogen receptor α turnover and functional activity via the SCF(Skp2) proteasomal complex. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 1928–1943.
- 8) Shin, E.M., Huynh, V.T., Neja, S.A., Liu, C.Y., Raju, A., Tan, K., Tan, N.S., Gunaratne, J., Bi, X., Iyer, L.M., et al. (2021) GREB1: An evolutionarily conserved protein with a glycosyltransferase domain links ER α glycosylation and stability to cancer. *Sci. Adv.*, **7**, eabe2470.
- 9) Habara, M. & Shimada, M. (2022) Estrogen receptor α revised: Expression, structure, function, and stability. *BioEssays*, **44**, e2200148.
- 10) Lu, Q., Surks, H.K., Ebling, H., Baur, W.E., Brown, D., Pal-las, D.C., & Karas, R.H. (2003) Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4639–4645.
- 11) Ikeda, K., Ogawa, S., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kato, S., Muramatsu, M., & Inoue, S. (2004) Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1131–1143.
- 12) Masaki, T., Habara, M., Sato, Y., Goshima, T., Maeda, K., Hanaki, S., & Shimada, M. (2021) Calcineurin regulates the stability and activity of estrogen receptor α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2114258118.
- 13) Masaki, T. & Shimada, M. (2022) Decoding the Phosphatase Code: Regulation of Cell Proliferation by Calcineurin. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1122.
- 14) Tecalco-Cruz, A.C., Macias-Silva, M., Ramirez-Jarquín, J.O., & Ramirez-Jarquín, U.N. (2022) Decoding the therapeutic implications of the ER α stability and subcellular distribution in breast cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **13**, 867448.
- 15) Habara, M., Sato, Y., Goshima, T., Sakurai, M., Imai, H., Shimizu, H., Katayama, Y., Hanaki, S., Masaki, T., Morimoto, M., et al. (2022) FKBP52 and FKBP51 differentially regulate the stability of estrogen receptor in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2110256119.

著者寸描

●羽原 誠 (はばら まこと)



山口大学共同獣医学部生体機能学講座 助教。博士 (獣医学)。

■略歴 東京都出身。2015年日本獣医生命科学大学獣医学科卒業。獣医師免許取得。19年同大学院獣医生命科学研究所博士課程修了。同年より山口大学共同獣医学部助教 (特命) を経て、23年より現職。

■研究テーマと抱負 難治性がんにおける治療標的の同定と治療戦略の開発。がん分野で蓄積されている公共データを活用して、DryとWetの両輪でがんの治療・予防に貢献できるような発見をしていきたいです。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/makotoh>

■趣味 カメラ, 息子と散歩。

●島田 緑 (しまだ みどり)



山口大学共同獣医学部生体機能学講座 教授。博士 (理学)。

■略歴 大阪府出身。1998年大阪市立大学理学部生物学科卒業。2003年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了。名古屋市立大学医学研究科助教。講師を経て、17年より現職。

■研究テーマと抱負 生命現象の根幹である遺伝情報の継承および発現制御機構の解明から、がんにおける治療標的の同定と治療戦略開発に至るまで統合的な研究を行っています。分子の病態機能解明に基づき、新たな治療法を確立し、健康寿命を伸ばすという大きな夢に挑戦したいと考えています。

■ウェブサイト <https://www.shimadamidori-lab.com>

■趣味 読書, 旅行, 美術鑑賞。