

論 文 内 容 要 旨

題目 The survival and proliferation of osteosarcoma cells are dependent on the mitochondrial BIG3-PHB2 complex formation

(骨肉腫細胞の生存と増殖はミトコンドリア局在 BIG3-PHB2 複合体形成に依存する)

著者 Shunichi Toki, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Hitoshi Aihara, Masaya Ono, Koichi Tsuneyama, Koichi Sairyo, Toyomasa Katagiri

令和3年10月1日発行 Cancer Science 第112巻10号4208ページ～4219ページに発表済み

内容要旨

高悪性度骨肉腫のうち、初診時転移を有する症例や治療後再発例では5年全生存率は13-45%と予後不良であり、新規治療法開発が喫緊の課題である。BIG3は、乳癌など悪性腫瘍細胞において発現が亢進している足場タンパク質であり、細胞質に局在し癌抑制分子 PHB2 を負に制御して増殖促進に寄与することが報告されており、BIG3-PHB2 タンパク質相互作用阻害ペプチド (stERAP) の創薬が進行中である。本研究では骨肉腫細胞における BIG3 の機能を解明し、stERAP を利用した新規治療法の開発を目的とした。

骨肉腫細胞株 Saos-2、U-2 OS、MG-63、HOS を用いて *in vitro* での qRT-PCR、ウェスタンブロット、RNA 干渉、免疫細胞染色、免疫沈降法、フローサイトメトリー、増殖解析、創傷治癒アッセイ、プロテオーム解析を行い、さらにゼノグラフトマウスモデルを用いた *in vivo* 解析を行った。以下の結果が得られた。

1. 骨肉腫細胞株においては、正常骨芽細胞と比較して有意に mRNA およびタンパク共に BIG3 発現が亢進していた。
2. MG-63 の BIG3 発現を抑制すると、コントロール群と比べて有意に細胞増殖が抑制された。
3. 細胞内局在解析では、骨肉腫細胞 BIG3-PHB2 複合体はミトコンドリアに局在し、stERAP 処理においてもその局在は維持されていた。
4. ミトコンドリア BIG3 は stERAP 処理にて PHB2 との相互作用が顕著に阻害され、濃度依存的に増殖抑制 ( $IC_{50} = 99 - 754 \text{ nM}$ ) が観察された。

様式(8)

5. stERAP 処理による発現タンパクの変動を 2DICAL にて網羅的に解析 (DAVID、GSEA) すると、処理後 24 時間以降にミトコンドリア (内) 膜関連パスウェイの有意な低下を認めた。
6. stERAP 処理を行うと、細胞膜ブレブ形成やアポトーシス小体様小胞が出現し、Annexin V、細胞周期解析にて濃度依存的かつ時間依存的に 72 時間以降で G2/M 期、sub-G1 期増加、アポトーシス画分の著明な増加を認めた。
7. stERAP 処理後 48 時間頃に PARP 発現が亢進し、72 時間頃に切断型が出現した。また、PARP の微小画分はミトコンドリアに局在し、BIG3-PHB2 複合体形成の阻害は PARP-AIF 経路を活性化させることが示唆された。
8. *in vivo* 解析では、stERAP 処理群はコントロール群に比較して有意に腫瘍増殖が抑制され、摘出腫瘍を用いた生化学的解析にて、stERAP 処理により BIG3-PHB2 複合体形成の阻害とアポトーシスの誘導が確認された。

本研究の結果から、ミトコンドリア局在 BIG3-PHB2 複合体形成を阻害することで、骨肉腫細胞の増殖を抑制し、結果として細胞死を誘導させることが明らかとなり、骨肉腫の新規治療法として、ミトコンドリア局在 BIG3-PHB2 複合体を標的とする stERAP ペプチドの可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1513</b> 号	氏名	土岐俊一
審査委員	主査 西岡安彦 副査 金山博臣 副査 池田康将		

題目 The survival and proliferation of osteosarcoma cells are dependent on the mitochondrial BIG3-PHB2 complex formation  
 (骨肉腫細胞の生存と増殖はミトコンドリア局在 BIG3-PHB2 複合体形成に依存する)。

著者 Shunichi Toki, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Hitoshi Aihara, Masaya Ono, Koichi Tsuneyama, Koichi Sairyō, Toyomasa Katagiri  
 令和3年10月1日発行 Cancer Science 第112巻10号  
 4208 ページ～4219 ページに発表済み  
 (主任教授 西良浩一)

要旨 進行期骨肉腫の5年全生存率は13-45%と不良であり、新規治療法開発が喫緊の課題である。申請者は乳癌をはじめとする悪性腫瘍に特異的に高発現し、現在新規ペプチド治療薬の開発が進行している標的分子 brefeldin A-inhibited guanine nucleotide exchange protein 3 (BIG3)、ならびに相互作用分子 prohibitin 2 (PHB2) との複合体形成に着目し、骨肉腫における新規治療法開発の可能性を検討した。方法は骨肉腫細胞株を用いた *in vitro* での解析、およびゼノグラフトマウスモデルを用いた *in vivo* 解析とした。得られた結果は以下の通りである。

1. 骨肉腫細胞では有意に BIG3 発現が亢進しており、BIG3 の発現を抑制すると、コントロール群と比べて有意に細胞増殖が抑制された。
2. 骨肉腫細胞の BIG3 と PHB2 の複合体はミトコンドリアに局在

- し、BIG3-PHB2 タンパク質相互作用阻害ペプチド(stERAP)処理においてもその局在は維持されていた。
3. ミトコンドリア BIG3 は stERAP 処理にて PHB2 との相互作用が顕著に阻害され、濃度依存的に骨肉腫細胞の増殖抑制が観察された。
  4. stERAP 処理による発現タンパクの変動を網羅的に解析すると、処理後 24 時間以降にミトコンドリア膜および内膜関連パスウェイの有意な低下を認めた。
  5. stERAP 処理を行うと、細胞膜ブレブ形成やアポトーシス小体様小胞が出現し、濃度依存的かつ時間依存的に 72 時間以降で G2/M 期、sub-G1 期の増加、アポトーシス画分の著明な増加を認めた。
  6. stERAP 処理後 48 時間で骨肉腫細胞内の PARP 発現が亢進し、72 時間で切断型が出現した。また、PARP の微小画分はミトコンドリアに局在し、BIG3-PHB2 複合体形成の阻害は PARP-AIF 経路を活性化させることが示唆された。
  7. *In vivo* 解析においても、stERAP 処理群では有意に骨肉腫の増殖が抑制され、摘出腫瘍を用いた生化学的解析で、BIG3-PHB2 複合体形成の阻害とアポトーシスの誘導が確認された。

以上の結果から、ミトコンドリア局在 BIG3-PHB2 複合体形成を阻害することで、骨肉腫細胞の増殖を抑制し、結果として細胞死を誘導させることが明らかとなった。本研究は骨肉腫に対する新規ペプチド治療薬開発の可能性を示しており、その臨床的意義は大きく、学位授与に値するものと判定した。