

$\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ  
(GGCT)および GGCT-PHB2 タンパク質  
相互作用の阻害によるがん細胞の増殖抑制  
メカニズムの解明

2021 年度

京都薬科大学大学院 博士課程学位論文

【薬学】臨床腫瘍学分野

高木寛子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Hiroko Takagi, Hiromi Ii, Susumu Kageyama, Eiki Hanada, Keiko Taniguchi, Taku Yoshiya, Tokuhiro Chano, Akihiro Kawauchi, Susumu Nakata. Blockade of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase enhances docetaxel growth inhibition of prostate cancer cells. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

[第 1 章]

- 2) Hiroko Takagi, Chiami Moyama, Keiko Taniguchi, Kota Ando, Ryohei Matsuda, Shota Ando, Hiromi Ii, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Nora Chouha, Laurent Désaubry, Susumu Nakata. Fluorizoline blocks the interaction between prohibitin-2 and  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase, and induces p21Waf1/Cip1 expression in MCF7 breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

[第 2 章]

# 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程

氏名 (英字名) : 高木寛子 (Hiroko Takagi)

学位論文題目 :  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)および GGCT-PHB2 タンパク質相互作用の阻害によるがん細胞の増殖抑制メカニズムの解明

## 序章 (はじめに)

$\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)は、泌尿器系がん組織に高発現するタンパク質として発見された。その後、乳がん、肺がん、子宮頸がん等を含む様々ながん種において正常組織と比較して高発現することが報告され、GGCT の高発現は予後不良因子であることも示されている。一方、RNA 干渉法を用いた GGCT ノックダウンおよび GGCT 阻害剤による酵素活性の阻害は、*in vitro* および *in vivo* において種々のがん細胞の増殖を抑制することが報告されている。また近年、GGCT の相互作用タンパク質として prohibitin2(PHB2)が新たに同定された。GGCT は、転写抑制性調節因子である PHB2 の核内移行を促進する因子として機能し、PHB2 の細胞増殖抑制因子  $p21^{WAF1/CIP1}$  ( $p21$ ) プロモーターへの結合を促進して、その転写を抑制することが明らかとなっている。これらの背景から、GGCT および GGCT-PHB2 相互作用は、がんの治療標的として有望である可能性が推測された。そこで本研究では、前立腺がん PC3 細胞に対する GGCT 阻害剤 pro-GA による増殖抑制効果を評価し、そのメカニズムについて解析を行った。また、前立腺がんに標準的に用いられる殺細胞性抗悪性腫瘍薬ドセタキセルの効果を、pro-GA の併用処理が増強する可能性について検証した。さらに、PHB1/2 阻害剤であるトリフルオロチアゾリン類似化合物 fluorizoline によるがん細胞の増殖抑制効果における、GGCT と PHB2 の結合阻害効果および  $p21$  発現誘導の寄与について解析を行った。

## 第 1 章 pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制作用の増強

本章ではまず、正常前立腺組織と比較して前立腺がん組織で、また、ヒト正常前立腺 PrEC 細胞と比較してヒト前立腺がん PC3、DU-145、LNCaP 細胞で、それぞれ GGCT が高発現することを、免疫組織化学染色法および Western blot 解析で明らかにした。PC3 細胞において GGCT の発現を抑制したところ、増殖抑制効果を認めたものの、DNA 断片化や、PARP、caspase-3、caspase-8 の切断は観察されなかったことから、アポトーシス細胞死は惹起しないことが明らかとなった。次に、GGCT 阻害剤 pro-GA 添加による PC3 細胞の増殖抑制効果を WST-8 アッセイおよび細胞数計測によって解析したところ、濃度依存的に増殖の抑制がみられた。また、pro-GA 処理により細胞老化が誘導されることを、 $\beta$ -galactosidase 染色法および  $\beta$ -galactosidase 活性測定によって明らかにした。さらに、GGCT ノックダウンまたは pro-GA 処理と、抗がん剤ドセタキセルとの併用効果について検証した。PC3 細胞において GGCT ノックダウンとドセタキセルを併用すると、いずれか単独よりも有意に細胞増殖が抑制された。細胞周期解析ではドセタキセルによる SubG1 期の割合の増加が見られたが、GGCT ノックダウンの併用は SubG1 期の割合には変化を生じなかった。PC3 細胞と LNCaP 細胞において pro-GA とドセタキセルの増殖抑制における併用効果を combination index(CI)法によって評価した。CI は、 $CI < 0.9$  相乗効果、 $0.9 \leq CI \leq 1.1$  相加効果、 $1.1 < CI$  拮抗効果とみなした。その結果、PC3 細胞では pro-GA 50  $\mu$ M とドセタキセル 0.5 ng/mL を併用すると相加効果( $CI=0.916$ )を、LNCaP 細胞では pro-

GA 40  $\mu$ M とドセタキセル 0.2 ng/mL を併用すると相乗効果(CI=0.774)を発揮することを明らかにした。以上の結果から、GGCT の阻害は前立腺がん細胞に対するドセタキセルの効果を増強するために有用である可能性が示唆された。

## 第2章 fluorizoline による細胞増殖抑制とそのメカニズム

GGCT は PHB2 と結合して p21 の発現を抑制し細胞増殖を促進することから、PHB 阻害剤である fluorizoline の増殖抑制効果における、GGCT と PHB2 の相互作用および p21 の発現誘導の寄与につき検証した。ヒト乳がん MCF7 細胞、ヒト膠芽腫 A172 細胞およびヒト前立腺がん PC3 細胞に対して fluorizoline を作用させたところ、濃度依存的な増殖の抑制が観察された。また、fluorizoline による p21 発現誘導を検証したところ、MCF7、A172 および PC3 細胞において p21 の発現上昇を認めた。この結果と合致して、MCF7 と A172 細胞に対して fluorizoline を作用させると、G0/G1 期の増加と S 期の減少を認め、fluorizoline は細胞周期停止を誘導することが明らかとなった。また、fluorizoline による増殖抑制効果は p21 ノックダウンによって阻害された。すなわち、p21 の発現上昇は、fluorizoline による増殖抑制効果に寄与することが明らかとなった。次に、PHB2 を強制発現させた MCF7 細胞を用いて細胞増殖の評価を行った。その結果、fluorizoline の増殖抑制効果に対する、PHB2 強制発現による回復効果が観察された。また、fluorizoline による p21 の発現誘導も、PHB2 強制発現によって抑制されること、また PHB2 強制発現により fluorizoline 処理により減少した S 期の細胞の割合が回復することを明らかにした。これらの結果は、fluorizoline による増殖抑制効果に、PHB2 機能の阻害を介した p21 発現の誘導が関与していることを示唆している。さらに、fluorizoline が PHB2 と GGCT の結合および PHB2 局在に与える影響を、免疫沈降法とタンパク質分画法および蛍光染色法により検証した。その結果、fluorizoline により、PHB2 と GGCT タンパク質の結合の抑制が認められ、核内に局在する PHB2 タンパク質が減少することを明らかにした。以上の結果から、fluorizoline による GGCT と PHB2 の相互作用の阻害は、p21 発現誘導を介してがん細胞の増殖を抑制するために、有用である可能性が示唆された。

## 総括（結論）

本研究により、pro-GA および fluorizoline を用いた GGCT 機能の阻害は、がん細胞の増殖を抑制するために有用であることを明らかにした。GGCT 阻害剤 pro-GA は、前立腺がん細胞に対して、細胞老化を介した増殖抑制作用を惹起し、アポトーシスを誘導する既存の抗がん剤ドセタキセルと、細胞老化を誘導する pro-GA の併用により、増殖抑制効果を増強することを発見した。さらに、GGCT と相互作用する PHB2 タンパク質の阻害剤 fluorizoline は、p21 タンパク質発現の誘導を介してがん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。すなわち、GGCT と PHB2 タンパク質との間の相互作用を fluorizoline によって阻害することにより、核内 PHB2 量の減少を引き起こし、p21 発現の誘導を介し、がん細胞に対して細胞周期の停止を誘導することを明らかにした。以上の知見は、GGCT および GGCT-PHB2 相互作用を治療標的とすることにより、がん細胞の制御されない無秩序な増殖を阻害するための、新しい治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

## 目次

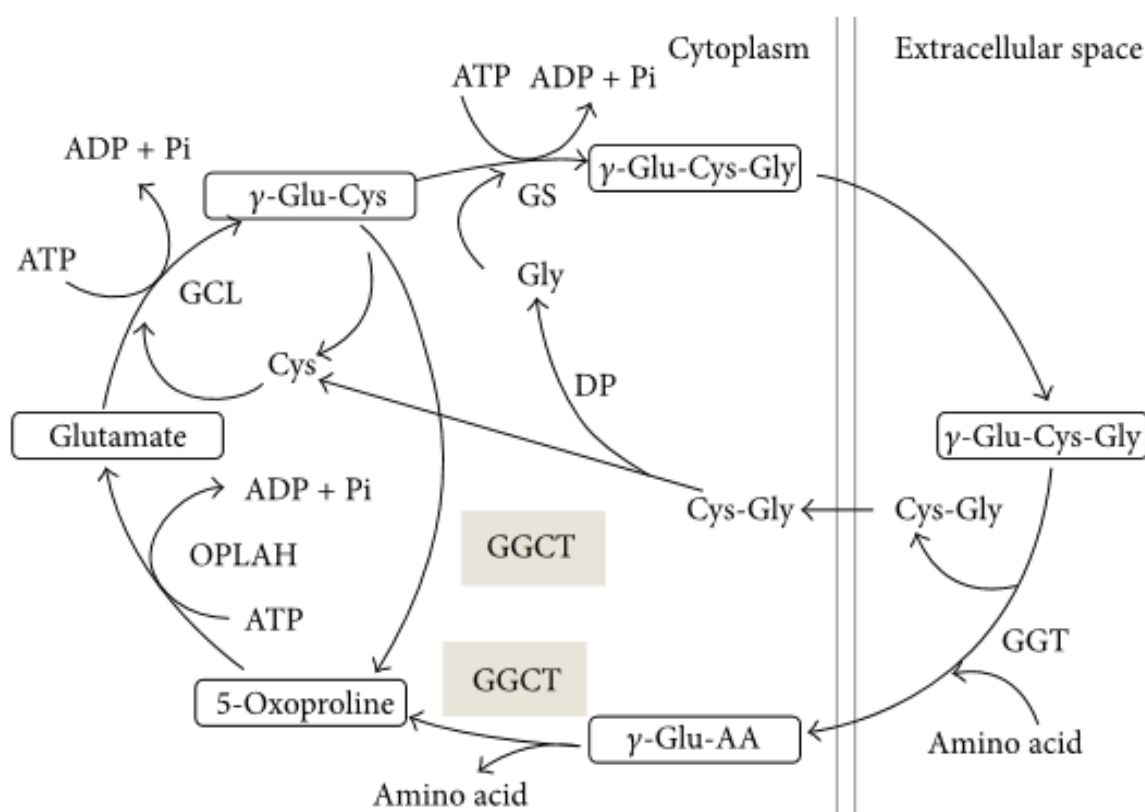
序論.....	1
第 1 章 pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制作用の増強	
1-1. 緒言.....	10
1-2. 実験方法.....	12
1-2-1. 細胞と培養条件.....	12
1-2-2. 抗体.....	12
1-2-3. 組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学的解析.....	12
1-2-4. siRNA 導入トランスフェクション条件.....	13
1-2-5. ウェスタンブロッティング法.....	13
1-2-6. WST-8 アッセイ.....	13
1-2-7. トリパンプブルー排出実験.....	14
1-2-8. 断片化 DNA 検出アッセイ.....	14
1-2-9. 細胞周期解析.....	15
1-2-10. Senescence-associated beta-galactosidase(SA-β-Gal)染色法.....	15
1-2-11. SA-β-ガラクトシダーゼ活性測定.....	15
1-2-12. 統計学的処理.....	15
1-3. 実験成績.....	16
1-3-1. 前立腺がん組織および細胞での GGCT の発現.....	16
1-3-2. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンの確認.....	17
1-3-3. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンのアポトーシスへの寄与.....	18
1-3-4. 前立腺がん細胞での GGCT 阻害剤 pro-GA による細胞増殖の抑制.....	20
1-3-5. 前立腺がん細胞での GGCT 阻害剤 pro-GA による細胞老化の誘導.....	22
1-3-6. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンによるドセタキセルの抗腫瘍効果の増強.....	24
1-3-7. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンとドセタキセルによる細胞周期への影響.....	25
1-3-8. 前立腺がん細胞における GGCT 阻害剤 pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制効果の増強.....	26
1-4. 考察.....	28
第 2 章 fluorizoline による細胞増殖抑制とそのメカニズム	
2-1. 緒言.....	30
2-2. 実験方法.....	32
2-2-1. 細胞と培養条件.....	32
2-2-2. トリパンプブルー排出実験.....	32

2-2-3. 細胞増殖能の評価.....	32
2-2-4. 抗体.....	32
2-2-5. ウェスタンブロッティング法.....	33
2-2-6. siRNA 導入トランスフェクション条件.....	33
2-2-7. PHB2 強制発現 MCF7 細胞の樹立.....	34
2-2-8. 定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)法.....	35
2-2-9. BrdU 細胞増殖アッセイ.....	35
2-2-10. 細胞周期解析.....	36
2-2-11. アポトーシスアッセイ.....	36
2-2-12. 共免疫沈降法.....	36
2-2-13. 細胞質/核タンパク質分画.....	37
2-2-14. 蛍光免疫染色法.....	37
2-2-15. 統計学的処理.....	38
2-3. 実験成績.....	39
2-3-1. fluorizoline によるがん細胞の増殖抑制.....	39
2-3-2. fluorizoline によるがん細胞での p21 の発現上昇.....	41
2-3-3. fluorizoline による乳がん細胞での短時間の p21 発現上昇.....	43
2-3-4. がん細胞における fluorizoline による細胞周期停止.....	44
2-3-5. p21 ノックダウンによる fluorizoline 処理されたがん細胞の増殖回復.....	45
2-3-6. 乳がん細胞における PHB2 強制発現の確認.....	46
2-3-7. PHB2 の強制発現による fluorizoline 処理された乳がん細胞の増殖回復.....	47
2-3-8. PHB2 の強制発現による fluorizoline 処理された乳がん細胞の p21 の発現抑制.....	49
2-3-9. PHB2 の強制発現による fluorizoline 処理された乳がん細胞の細胞周期回復.....	50
2-3-10. がん細胞における fluorizoline の PHB2 と GGCT との相互作用に与える影響.....	52
2-3-11. がん細胞における fluorizoline の PHB2 細胞内局在に与える影響.....	54
2-3-12. 乳がん細胞における fluorizoline による核内 PHB2 の減少.....	56
2-4. 考察.....	58
総括.....	61
謝辞.....	62
引用文献.....	63

## 【略語表】

AMPK	AMP-activated protein kinase
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
BCA	bicinchoninic acid
C7orf24	human chromosome 7 open reading frame 24
CDK	cyclin-dependent kinase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
GA	N-glutaryl-L-alanine
GAPDH	glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase
GGCT	$\gamma$ -glutamylcyclotransferase
HRP	horseradish peroxidase
NP-40	nonidet P-40
OE	overexpression
p16	p16 <sup>INK4A</sup>
p21	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>
PBS	phosphate-buffered saline
PHB	prohibitin
PI	propidium iodide
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RIPA buffer	radioimmunoprecipitation assay buffer
SA- $\beta$ -Gal	senescence-associated $\beta$ -galactosidase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
TBS	tris-buffered saline
TE buffer	tris-EDTA buffer
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1
V5	V5 epitope tag

C7orf24 はプロテオーム解析により、膀胱がんを高発現する 15 種類のタンパク質の一つとして発見された(1,2)。C7orf24 は 188 個のアミノ酸からなる分子量 21 kDa、等電点 5.1 のタンパク質である(2)。のちに、C7orf24 は GGCT であることが同定された(3)。GGCT はクロモソーム 7p14-15 に存在し、4 個のエクソンを持ち 8 kb に広がっている。GGCT はグルタチオン(GSH)の合成・分解系に關与する  $\gamma$ -グルタミルサイクルの構成酵素であり、細胞質において  $\gamma$ -グルタミルペプチドから 5-オキソプロリンとアミノ酸を生成する反応を触媒している (Fig. 1)。酵素活性にはグルタミン酸(Glu<sup>98</sup>)が必要であり、Glu<sup>98</sup> が Ala や Gln に変異すると完全に活性を失う。GGCT は細胞質においてホモ二量体として存在しており、アミノ酸の 61-120 の残基が細胞質での局在に必要である(4)。



**Figure 1.  $\gamma$ -glutamyl cycle.**

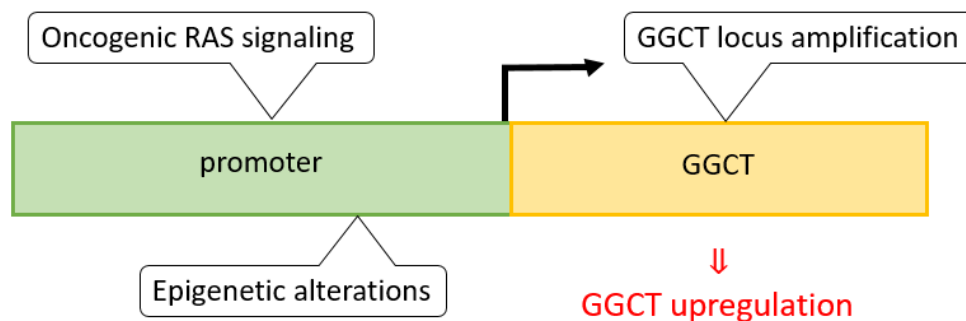
GGCT, gamma-glutamylcyclotransferase; GGT, gamma-glutamyltranspeptidase; GCL, glutamate cysteine ligase; GS, glutathione synthase; OPLAH, 5-oxoprolinase;  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly, glutathione; DP, dipeptidase.

This Figure was cited from Fig. 1 in Kageyama et al. *Biomed Res. Int.* **2015**, 2015, 345219.

GGCT は膀胱がん以外にも、乳がん、子宮頸がん、肺がん、大腸がん、食道がん、卵巣がん、胃がん、骨肉腫、膠芽腫など様々ながん種で高発現していることが知られており、がん組織における GGCT の高発現は、患者の予後不良と相関があることが報告されている(5,6,7,8,9,10)。本研究では、GGCT の機能を化合物で阻害することにより、がん細胞の増殖を抑制するメカニズムを解明し、新たながん治療戦略を提唱することをその目的とした。



現在までに考えられているがん細胞での GGCT 高発現のメカニズムとして、1 つ目に GGCT 遺伝子座の増幅によるコピー数多型(CNV)に伴った発現の増加がある(11)。様々ながん種において正常組織と比較して CNV の増幅が見られ、肺腺がん患者組織では GGCT の CNV と mRNA の発現には正の相関がある。2 つ目に GGCT プロモーターのエピジェネティックな変化による転写促進がある(12,13)。がん細胞の GGCT プロモーターでは転写活性化に関わるヒストン修飾が多く集積し、非がん細胞では転写抑制に関わるヒストン修飾が多く集積している。非がん細胞における GGCT 遺伝子の転写は、DNA メチル化によるプロモーター領域の安定的なヘテロクロマチン形成によって抑制されていることも知られている。3 つ目に活性型 Ras シグナルによる GGCT の転写促進がある(11)。マウス胎児線維芽 MEF 細胞において、活性型 Ras を発現させると GGCT mRNA の発現が増加し、逆に MEK 阻害剤である trametinib を添加して Ras シグナル下流を阻害すると GGCT mRNA の発現が減少する。ヒト子宮頸がん HeLa 細胞、ヒト肺腺がん A549 細胞、ヒト非小細胞肺がん H1299 細胞において、ヒト GGCT プロモーターを導入した pGL3 vector を使用し trametinib 処理すると、GGCT プロモーター活性が顕著に低下する。このことから、Ras の活性化は GGCT プロモーター活性を促進し、GGCT の mRNA の発現を誘導していると考えられる(Fig. 2)。さらに、骨肉腫細胞や組織においては miR-877 の発現が減少しているという報告がある(14)。miR-877 は GGCT を標的として GGCT の発現を抑制することで、細胞浸潤と遊走、増殖を抑制する。がん細胞における GGCT の高発現は、以上のような機序が、複合的に関与してもたらされると考えられている。



**Figure 2. Expression regulation mechanisms of GGCT in cancer cells.**

がん細胞が増殖する際に ROS が発生するが、グルタチオン GSH には抗酸化作用がある(15,16)。GGCT は  $\gamma$ -グルタミルサイクルを促進し、GSH による ROS 代謝を調節することで、がんの増殖促進に関与していると考えられる(11)。また、がん細胞では有酸素下でもミトコンドリアでの酸化的リン酸化よりも解糖系が亢進するワールブルグ効果が起こる。GGCT は HIF-1 $\alpha$  の発現上昇を介して酸素正常状態における好気性解糖を促進することが報告されている(17)。

骨芽細胞において GGCT をノックダウンしても細胞増殖に変化は見られないが、5 種類の骨肉腫細胞では GGCT siRNA を添加すると時間、濃度依存的に細胞増殖が抑制される(18)。さらに、細胞の浸潤と遊走の抑制も引き起こされる。肺がん細胞においても GGCT をノックダウンすると、G0/G1 期での細胞周期停止を介した細胞増殖の抑制が見られる(19)。横紋筋

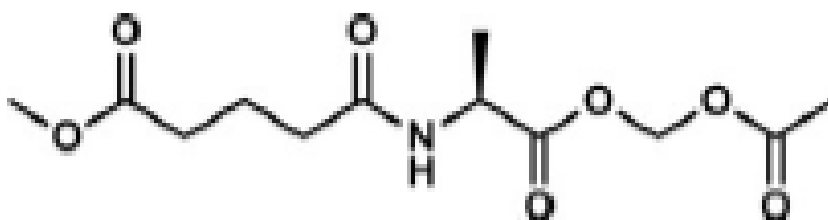
肉腫細胞においてグルタチオンの枯渇はオーラノフィンによる細胞増殖抑制効果を増強する(20)。

我々の研究グループの以前の研究で、GGCT siRNA を用いた GGCT ノックダウンにより、ヒト乳がん MCF7 と MDA-MB-231 細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった(21)。さらに、GGCT ノックダウンによって、平坦で拡張した老化細胞特徴的な形態をとり SA- $\beta$ -Gal 染色陽性の老化細胞が見られた。MCF7 細胞では、GGCT ノックダウンによって p21 の mRNA の上昇と G0/G1 期の増加が見られ、GGCT と p21 を共にノックダウンすると G0/G1 期の増加が抑えられ細胞老化も抑制された。MDA-MB-231 細胞では、GGCT と p21 を共にノックダウンしても GGCT ノックダウンによる細胞老化は抑えられないが、GGCT と p16<sup>INK4A</sup>(p16)を共にノックダウンすると細胞周期の停止が解除され細胞老化が抑制された。これらの結果から、がん細胞において GGCT ノックダウンは、細胞周期を制御する CDK inhibitor を誘導し、細胞老化を引き起こして細胞の成長を抑制するといえる。また、GGCT ノックダウンによって誘導される CDK inhibitor は細胞の種類によって異なると考えられる。

次に、GGCT ノックダウンによる CDK inhibitor の発現上昇と細胞増殖抑制にどのような機構が関与しているのかを検証した。一つ目にオートファジーの誘導が挙げられる(22)。MCF7 細胞と PC3 細胞では、GGCT ノックダウンによる LC3-II の発現上昇が見られ、Atg5 も同時にノックダウンすると LC3-II の発現上昇が抑制される。Atg5 ノックダウンによりオートファジーを抑制すると、GGCT ノックダウンによる CDK inhibitor の発現上昇と細胞周期の停止が抑えられ、細胞老化が阻害されて細胞の成長が回復する。さらに、MCF7 細胞と PC3 細胞における GGCT ノックダウンは、AMPK-ULK1 経路を活性化し、mTORC2-AKT 経路を不活性化する。したがって、がん細胞での GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制にはオートファジーが関わっているといえる。二つ目に PHB2 との相互作用がある(23)。酵母ツーハイブリット法と共免疫沈降法により、GGCT と相互作用する新規のタンパク質として PHB2 が発見された。MCF7 細胞で GGCT をノックダウンすると、PHB2 の核内への移行が阻害され、p21 のプロモーターとの結合が抑制される。さらに、PHB2 を単独でノックダウンすると p21 が顕著に上昇し、G0/G1 期の増加、細胞老化、成長抑制が起こる。すなわち、がん細胞で GGCT をノックダウンすると、PHB2 の核内移行の抑制を介して p21 の発現が上昇するといえる。その他に報告されていることとして、A172 細胞と PC3 細胞で GGCT ノックダウンは、FOXO3a の発現上昇と AMPK のリン酸化促進によってリン酸化 FOXO3a を増加させる(24)。リン酸化 FOXO3a は p21 の発現を上昇し細胞増殖を抑制する。ヒト卵巣がん組織では GGCT ノックダウンによる PI3K/AKT/mTOR シグナル経路の不活性化を介した上皮間葉転移(EMT)の抑制が見られる(7)。子宮内膜がんにおいて GGCT は EMT を促進するとともに、EMT 時に GGCT は免疫逃避機構に関与する PD-L1 の発現を上昇させる(25)。大腸がん細胞においても GGCT ノックダウンによって、EMT 関連遺伝子の発現抑制を介した細胞浸潤と遊走の抑制が起こる(26)。大腸がん細胞で GGCT 阻害と 5-フルオロウラシルを併用すると細胞増殖の抑制効果が増強する(27)。神経膠芽腫 T98G と U251 細胞で GGCT をノックダウンすると Notch-Akt シグナルの抑制による増殖抑制が起こる(10)。

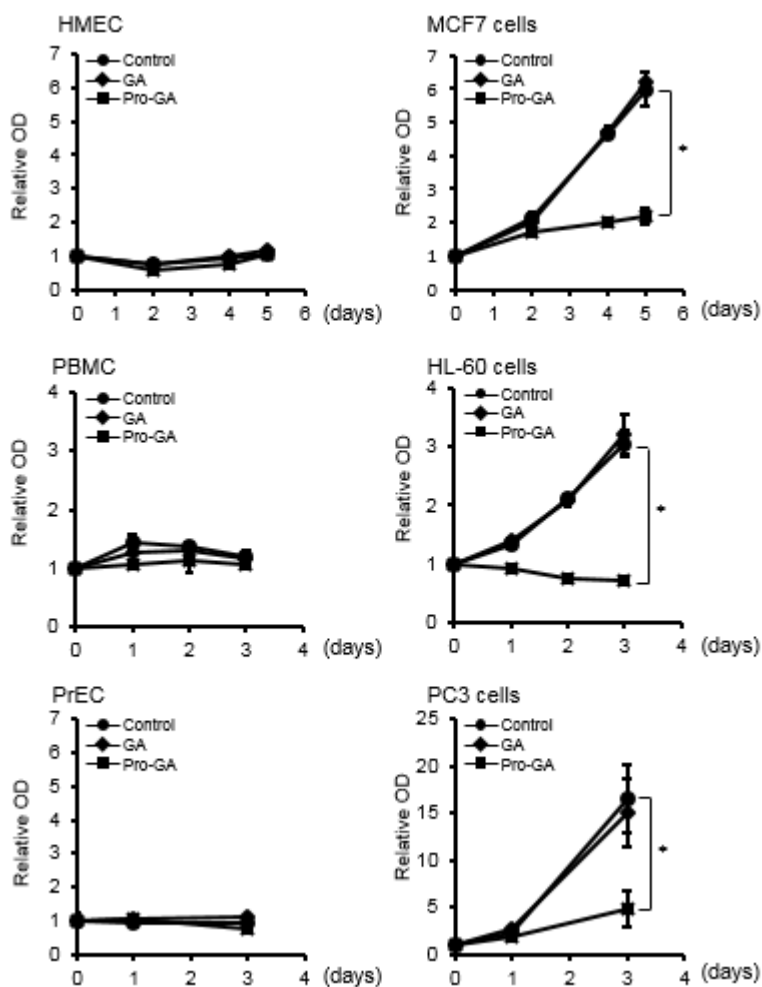
さらに、肺扁平上皮がん EBC-1 細胞移植マウスに needle-free jet injection (JI)により anti-GGCT siRNA を投与した場合、腫瘍の成長が顕著に抑制される(28)。また、anti-GGCT siRNA を含んだ PEG 化したヒアルロン酸を修飾したリポソーム(PEG-HA-NP)をアドリアマイシン抵抗性の MCF7 細胞を移植したマウスに投与すると、腫瘍の増殖が抑制される一方で、マウスの体重に変化は見られなかった(29)。よって、*in vivo* においても投与方法を工夫することにより anti-GGCT siRNA によるがん細胞の増殖抑制効果を期待でき、マウスに対する毒性も見られないと考えられる。

次に、我々の研究グループおよび共同研究者によって、GGCT 阻害剤 pro-GA の開発が行われた(Fig. 3)。18 個の N-acyl-L-alanine のアナログを合成し、GGCT 活性に対する阻害効果を評価した結果、GGCT の基質をもとに合成した N-glutaryl-L-alanine (GA)が、最も GGCT 活性阻害効果が高いことが判明した(30)。しかし、GA は細胞ホモジネートに対しては GGCT 阻害作用を示すが、生細胞に対しては GGCT 活性の阻害作用を示さなかった。そこで、GA をジエステル化することで細胞膜透過性を付与した pro-GA が、プロドラッグ型 GGCT 阻害物質として新規開発された(31)。pro-GA は、GGCT を過剰発現させたマウス胎児線維芽 NIH-3T3 細胞や白血病 HL-60 細胞、MCF7 細胞、PC3 細胞を含むヒトがん細胞に対しては増殖抑制効果を示した。一方で、正常細胞に対しては大きな影響を与えなかった(Fig. 4)。



**Figure 3. Structure of pro-GA.**

This Figure was cited from Experimental Section in Ii et al. *ChemMedChem*. **2018**, 13, 155-163.



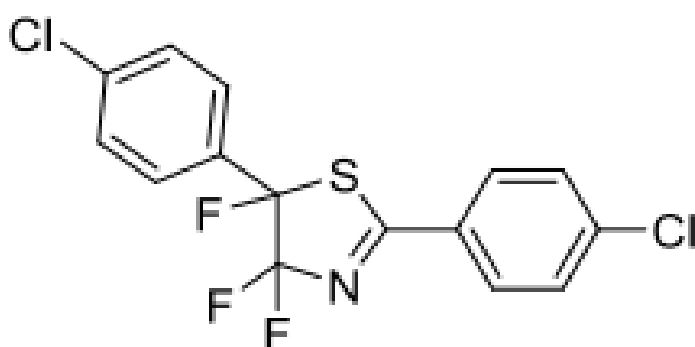
**Figure 4. Pro-GA inhibits the proliferation of GGCT-expressing cells.**

This Figure was cited from Fig. 5 in Ii et al. *ChemMedChem*. 2018, 13, 155-163.

膀胱がん細胞においても pro-GA は濃度依存的に細胞増殖を抑制し、マイトマイシン C による抗腫瘍効果を増大させた(32)。さらに、PC3 細胞を異種移植したマウスモデルに pro-GA を投与したところ腫瘍の成長の有意な抑制が観察され、*in vivo* での効果も示された(31)。これらの結果から、GGCT はがんの治療標的や診断マーカーとしての役割が期待でき、pro-GA による GGCT 阻害は GGCT が高発現している腫瘍の治療戦略として有用であると考えられる。

次に、GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制効果に PHB2 との結合阻害が関与していることに着目した。まず、PHB 遺伝子はラット肝細胞で抗増殖遺伝子の候補として発見された(33)。ヒト PHB 遺伝子は分子量~33kDa の PHB1 と PHB2 の二つのタンパク質アイソフォームをコードしている(34,35)。ヒト PHB1 遺伝子はクロモソーム 17q21 において 11kb にわたって存在しており、7 個のエクソンを含んでいる(36)。ヒト PHB2 遺伝子はクロモソーム 12q13 において 5.3kb にわたって存在しており、10 個のエクソンを含んでいる。PHB1 および PHB2 は進化的に保存されたタンパク質であり、ミトコンドリア、核、細胞膜など異なる

細胞分画に広く分布しており、多様な生物学的機能を有している(34,35,37,38,39,40)。PHB2 タンパク質のアミノ酸配列には核移行シグナルと考えられる配列が存在することが指摘されており、各種の転写調節因子と相互作用することが報告されている(36,41)。さらに、PHB においてチロシンがリン酸化されることが複数の細胞シグナル伝達経路に関与しているという報告もある(42)。のちに、ヒト食道扁平上皮がん組織において PHB が高発現していることが発見された(43)。また、大腸がん患者の血清では健康な人の血清よりも PHB の量が顕著に高く検出されることが報告されている(44)。このことから、PHB を標的とする新たな小分子の合成が必要であると考えられている。その中の一つの有望な分子として、PHB に直接結合する fluorizoline がある(45)。fluorizoline はアポトーシスを誘導する分子として発見された、ジアリールトリフルオロチアゾリン化合物であり、3 つのフッ素がその活性に重要であることが示されている(Fig. 5)。



**Figure 5. Structure of fluorizoline.**

This Figure was cited from Fig. 9 in Wang et al. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, 77, 3525-46.

現在までに報告されている PHB の分子機能と、fluorizoline を含む PHB 阻害剤の効果について、以下に述べる。ミトコンドリア内膜にある PHB1 と PHB2 は相互作用し、ミトコンドリアの安定性に関与している(46,47,48)。ミトコンドリアの融合機能に必要なダイナミン様 GTPase である OPA1 は、long(L-OPA1) isoform と short(S-OPA1) isoform のバランスに活性が依存している。PHB が欠損すると、L-OPA1 が不足することでミトコンドリアのクリステの形態形成の異常が起こり、細胞増殖が抑制される。ミトコンドリアにおいて PHB 複合体の欠損は、活性酸素種の生成を促進し、mitoflash を引き起こす(49)。神経膠芽腫幹細胞(GSCs)において PHB は、ミトコンドリアの ROS 産生を制御し GSC の放射線治療抵抗性を誘導する(50)。これは、PHB が peroxiredoxin3(PRDX3)と結合し、ユビキチンプロテアソーム経路を阻害することで PRDX3 のタンパク質を安定化するためだと考えられている。ヒト胎児腎細胞に SV40 large T を組み込んだ HEK293T 細胞において酸化ストレスを与えると、PHB2 は核からミトコンドリアへ移行し、OPA1 や HAX1 と相互作用することでミトコンドリアの形態維持に関与する(51)。急性腎障害患者では Bax inhibitor 1(BI1)の発現が減少している(52)。BI1 は PHB2 と直接と結合することで、PHB2 の細胞質からミトコンドリアへの移行を促進する。これにより、ミトコンドリアの恒常性を維持し、細胞を保護している。骨髄性白血病細胞においてカプサイシンは、PHB2 と結合し PHB2 のミトコンドリアから核への移行を促

進する(53)。ミトコンドリアでは PHB2 が形態維持に関与しているため、PHB2 を失うことでアポトーシスが誘導される。核では PHB2 が p53 の転写活性を促進し、同じくアポトーシスを誘導する。

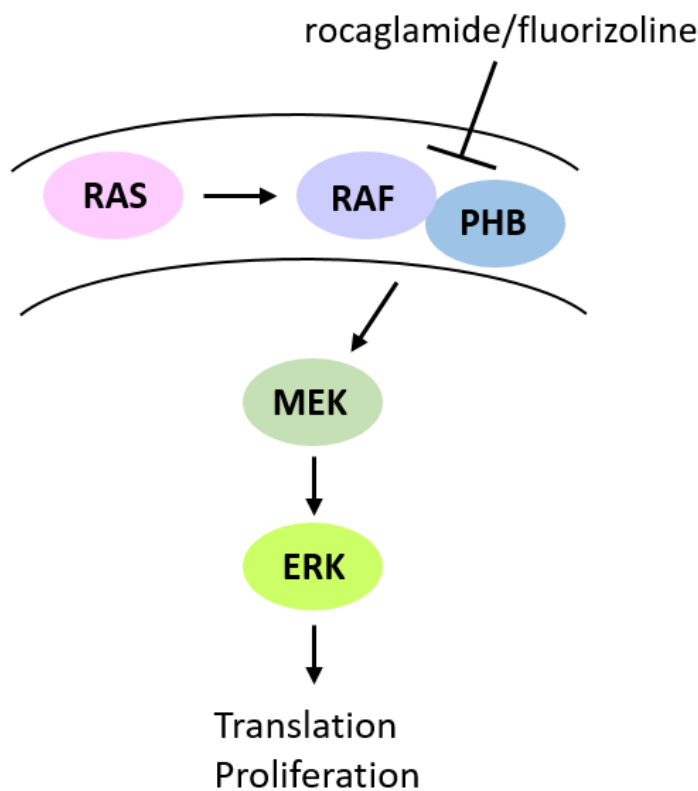
PHB は細胞基質の相互作用にも関与しており、がん細胞で PHB をノックダウンすると、細胞の形態が変化して細胞間接着が抑制される(54)。前立腺がん細胞において PHB2 過剰発現は AKT2 の発現を抑制し、PHB2 ノックダウンは AKT2 の発現を上昇する(55)。AKT2 過剰発現は遊走を抑制し、AKT2 ノックダウンは遊走を促進する。つまり PHB2 は AKT2 の発現を抑制することで遊走を促進する。肝細胞がん(HCC)の急速な増殖は低酸素状態を引き起こす(56)。HCC では PHB2 の発現が顕著に上昇しており、PHB2 を阻害すると細胞増殖とコロニー形成が抑制される。さらに PHB2 阻害は、HCC の低酸素環境への適応と化学療法によるアポトーシスへの抵抗を抑制する。すなわち、HCC において PHB2 は低酸素状態での増殖促進をサポートし、頸動脈化学塞栓術で PHB2 の阻害剤が効果を示す可能性が考えられる。横紋筋肉腫細胞においてインスリン様成長因子(IGF)結合タンパク(IGFBP)-6 は、PHB2 と細胞膜上で結合することで間接的に PHB2 のチロシンリン酸化を促進する(57)。これにより、IGF 非依存的に横紋筋肉腫細胞の遊走を誘導する。さらに、横紋筋肉腫細胞で PHB2 をノックダウンすると細胞の増殖が抑制される(58)。これは、核に存在する PHB2 が、c-Myc の rDNA 転写活性を促進し MyoD の rDNA への結合を阻害することで、rDNA の合成を促進するためである。核の PHB2 は主にセントロメアの凝集を保護し細胞の成長促進に関与すると考えられる(59,60)。未分化マウス胚性幹細胞では PHB2 が高発現しているが、幹細胞が分化する際は PHB2 の発現が減少する(61)。多能性幹細胞で PHB2 をノックダウンすると顕著にアポトーシスを誘導するが、PHB2 の発現誘導は幹細胞の増殖に寄与する。逆に、PHB2 の発現誘導は幹細胞の神経細胞や内胚葉細胞への分化を強力に阻害する。

一方で、乳がん細胞では、細胞質で BIG3 が PHB2 と結合することで、核内の PHB2 が減少し、ER $\alpha$  への結合が抑制されることで ER $\alpha$  転写活性が促進して細胞増殖が誘導される(62,63)。ER $\alpha$  activity-regulator synthetic peptide (ERAP)は、BIG3-PHB2 の結合を阻害する(64)。このことによって核内に移行した PHB2 は ER $\alpha$  と結合し、乳がん細胞におけるエストロゲンの刺激による細胞増殖を抑制する。ERAP の持続作用を向上させた stapledERAP も、MCF7 細胞において細胞増殖を抑制することが報告されている(65)。*In vivo* においても、ヒト乳がん KPL-3C 細胞を異種移植したマウスに stapledERAP を投与すると、抗腫瘍効果が見られる。さらに、MCF7 細胞において、stapledERAP とタモキシフェン、フルベストラント、エベロリムスをそれぞれ併用すると、増殖抑制作用の相乗効果が引き起こされる。

別の研究では、PHB 阻害剤の合成を目的として、PHB と結合する melanogenin のアナログを 57 種類合成した結果、Mel9 と Mel41 の 2 つがメラニン形成細胞においてメラニンの形成を促進することが明らかとなった(66)。Mel9 と Mel41 は PHB2 との結合を介して、LC3/ERK/MITF シグナル経路を抑制し、色素沈着を引き起こす。

細胞膜に存在する PHB1 はウイルスや細菌の受容体として機能し、これらの微生物の宿主細胞への侵入を促進する(67)。PHB 阻害作用を発揮する rocaglamide は HCV 感染を抑制する作用を有することが報告されている。一方、細胞膜の脂質ラフトに存在する PHB1 は Raf-1

に作用して活性化する(68)。Raf-1 は進化的に保存されたがん遺伝子であり ERK を活性化してがん発生を促進する。KRas はヒト非小細胞肺癌において最も頻繁に変異するがん遺伝子の一つである。Ras タンパクは、Raf-MAPK 経路を含む複数のシグナル経路の引き金として機能する。Raf は Ras が直接作用するがん化経路に必要な因子である。細胞膜において Raf が PHB1 と相互作用することは Raf が活性化するうえで重要な機能を果たす rocaglamides は PHB1 の Raf との結合を阻害することが報告されている(69)。細胞増殖抑制の  $IC_{50}$  が低い rocaglamides は ERK の活性を強く抑制する。このことから、rocaglamides は ERK シグナル経路をブロックすることで増殖を抑制すると考えられる。rocaglamides は濃度依存的に CRaf のリン酸化(Ser338)を阻害して、CRaf の下流の MEK と ERK のリン酸化を抑制する。最終的に G0/G1 期での細胞周期停止が誘導される。fluorizoline も同じく PHB1 に結合することで、Ras による Raf 活性化を抑制する(Fig. 6)。



**Figure 6. Targeting of PHB with two chemical ligands (rocaglamide and fluorizoline) inhibits RAS induced RAF activation.**

fluorizoline は、マウス胎児線維芽 MEF 細胞、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞においてアポトーシスを誘導することが報告されている(70)。慢性リンパ性白血病細胞、急性骨髄性白血病細胞、多発性骨髄腫細胞に対してもアポトーシスを誘導する(71,72,73)。慢性リンパ性白血病においては、fluorizoline とイブルチニブ、AICA リボシド、ベネトクラクスとの併用でそれぞれ相乗効果があることが報告されている(74)。fluorizoline によるアポトーシスは、内在性経路で NOXA、BIM 等の上昇によって引き起こされる(70)。fluorizoline はストレス応答を誘導し、ATF3 と ATF4 を介して NOXA の転写を促進する(75)。線虫細胞やヒト細胞で、

fluorizoline によるアポトーシス誘導には PHB2 が必要であることが裏付けされている(76)。さらに、fluorizoline は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの上昇を介してそれぞれのリン酸化酵素を活性化することで開始因子 2(eIF2)および伸長因子 2(eEF2)のリン酸化を促進し、タンパク質の合成を阻害する(77)。一方で HEK293T 細胞と U2OS 細胞においては例外的に、fluorizoline による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベル上昇を介した ATF4 や CHOP の発現誘導が、fluorizoline の NOXA の発現上昇を経由したアポトーシスから細胞を保護するという報告もある(78)。

上述のように、PHB の分子機能ががん細胞の増殖に対して促進性に果たす影響について様々な報告が存在しており、PHB の機能を阻害することが報告されている fluorizoline の抗腫瘍メカニズムの解明は、PHB を標的としたがん治療の有望な戦略となり得ると考えられる。しかしながら、GGCT と PHB2 の相互作用によるがん細胞の増殖に与える影響に対して、fluorizoline による PHB 阻害がいかなる影響を及ぼすかについては全く不明であった。本研究では、GGCT が PHB2 と相互作用してその細胞内局在に影響を与えることに着目し、PHB2 と GGCT との結合への影響を含めた fluorizoline の新たな作用機序について検証した。これらの実験を通して、GGCT および GGCT と PHB2 タンパク質との相互作用に対して化合物を用いて阻害することによって、がん細胞の増殖を抑制するメカニズムを詳細に解明し、新しいがん治療戦略を提唱することを本研究の目的とした。



## 第 1 章

### pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制作用の増強

#### 1-1. 緒言

GGCT は、プロテオーム解析によって膀胱がんをはじめとする泌尿器系悪性腫瘍組織に特異的な高発現がみられるタンパク質として同定された(1,2)。その後、GGCT は泌尿器系悪性腫瘍のみならず、幅広いがん種の組織で、対応する正常組織と比較して高発現することが追試され、さらに、がん組織での GGCT 高発現は予後不良と相関がみられるため、GGCT は新しい治療標的として有望であると考えられている(79,80)。RNA 干渉法を主体とした手法にて GGCT の発現量を抑制することは、*in vitro* において様々ながん細胞で増殖抑制効果を示すという報告がなされている。さらに近年、*in vivo* における抗腫瘍効果も明らかになりつつある(28,29)。また、GGCT の特異的酵素活性阻害剤で GGCT を標的することにより、*in vivo* における抗腫瘍効果がみられることも報告されている(31)。

前立腺がんは、肺がん、乳がんに次いで世界で 3 番目に多いがんである(81)。我が国においてもその罹患率は増加の一途を辿っており、近年は我が国の男性における部位別がん罹患率の第一位を占めるに至っている。典型的な前立腺がんの症例では、診療の初期段階においては、アンドロゲン除去療法(ADT)が奏効する場合も多いものの、多くの場合、1～3 年の治療の継続に引き続いて、ADT に耐性が生じることが、臨床上の大きな問題になっている(82)。一旦 ADT を惹起した場合、その治療は困難であり、骨転移を主体とした遠隔転移が大きな問題になる。そのような状態に陥った前立腺がんは致死的になる場合が多い。そこで、去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)への新規治療法が早急に必要である。現在 CRPC に対する治療薬としてはドセタキセルをはじめとしたタキサン系殺細胞性抗がん剤が、標準的治療薬として、最も多く用いられている。しかしながら、ドセタキセル治療によって再発転移性前立腺がん症例を完全に治癒させることは極めて困難であり、早晩に生じてくる前立腺がん細胞のドセタキセルに対する耐性が大きな問題となっている。従って、ドセタキセル治療と併用し、その効果を増強する新しい手法を開発することは、前立腺がんの臨床を改善するために有用であると考えられる。

本章では、まず、正常前立腺組織と比較して、前立腺がん組織における GGCT タンパク質の発現を免疫組織化学的手法にて解析した。次に、典型的で汎用されているヒト前立腺がん培養 PC3、DU-145、LNCaP 細胞と、ヒト正常前立腺 PrEC 細胞における GGCT 発現を比較した。また、前立腺がん細胞における GGCT 発現の意義を明らかにするために、PC3 細胞における GGCT の発現を、RNA 干渉法を用いて効率よくノックダウンするための条件検討を行った。検討した GGCT をノックダウンする条件に基づき、PC3 細胞の増殖が抑制されるかについて解析を行った。さらに、その際の表現型についてさらに詳細に明らかにするために、特に DNA 断片化およびカスパーゼの切断による活性化を指標としたアポトーシス細胞死の特

徴が検出されるかについて検証を行った。

次に、GGCT 酵素活性を阻害する細胞膜透過型化合物である pro-GA の処理が、PC3 細胞の増殖を抑制するののかについて定量的に評価を行った。さらに、PC3 細胞に対して pro-GA を処理した際に、ノックダウンで検出された細胞老化現象が検出されるかについて解析した。

上記の種々の解析の結果に基づいて、GGCT の活性を阻害することにより、前立腺がん細胞に対するドセタキセルの効果を増強するのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、PC3 細胞に対する RNA 干渉法を用いた GGCT ノックダウンと、臨床で用いられる既存のアポトーシス誘導抗腫瘍薬であるドセタキセルを併用することによって、細胞増殖の抑制が有意に増強されるかについて解析した。さらにその機序の一端を解明することを目的として、細胞周期に与える影響を解析した。

最後に、この GGCT 阻害とドセタキセルの併用による効果増強が、GGCT の RNA 干渉法によるノックダウンのみならず、GGCT の酵素活性を薬理的に阻害することで達成できるかについて解明することを目的とした。これを検証するために、PC3 細胞と LNCaP 細胞に対し、pro-GA とドセタキセルを同時併用することにより、ドセタキセルの抗腫瘍効果を、pro-GA が増強するののかについて検証し、その併用効果を検出することを試みた。

## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. 細胞と培養条件

ヒト正常前立腺 PrEC 細胞は、Lonza(Basel, Switzerland)から購入し、細胞の付随された最適化された培地で培養した。ヒト前立腺がん LNCaP 細胞と PC3 細胞、ヒト白血病 HL-60 細胞は、RIKEN BRC(Tsukuba, Japan)から購入し、RPMI1640 に 10% ウシ胎児血清(FBS, Hyclone, South Logan, USA)および 1% penicillin/streptomycin(Wako, それぞれ 100 units/mL、100 µg/mL)を加えたものを培地として用いた。ヒト前立腺がん DU-145 細胞は、ATCC(Virginia, USA)から購入し、DMEM(Wako, Osaka, Japan)に 10% ウシ胎児血清(FBS, Hyclone, South Logan, USA)および 1% penicillin/streptomycin(Wako, それぞれ 100 units/mL、100 µg/mL)を加えたものを培地として用いた。37°C、5% CO<sub>2</sub>、100%湿潤環境のインキュベーター内で培養した。ドセタキセル(Wako)は ethanol/DMSO で溶解し、pro-GA(Funakoshi, Tokyo, Japan)とエトポシド(Wako)は DMSO で溶解した。

### 1-2-2. 抗体

一次抗体には、ヒツジ由来 IgG 抗体として、GGCT(1:200; AF5086, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA for tissue microarray)、マウス由来 IgG 抗体として、GGCT(1:1000; 6-1E, Cosmo Bio, Tokyo, Japan for Western blot)、GAPDH(1:1000; 016-25523, Wako)、 $\beta$ actin(1:1000; 017-24551, Wako)、ウサギ由来 IgG 抗体として、PARP-1(1:4000; ALX-210-302-R100, Enzo, Farmingdale, NY, USA)、Caspase-3(1:1000; #9665, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、Caspase-8(1:1000; #9746, Cell Signaling Technology)を用いた。二次抗体として、Horse anti-mouse IgG-horseradish peroxidase(HRP)を Vector Laboratories(1:2000; PI-2000, Burlingame, CA, USA)、Goat anti-rabbit IgG-HRP を Cell Signaling Technology(1:2000; 7074)、Rabbit anti-sheep IgG-HRP を (1:200; 81-8620, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)からそれぞれ購入した。

### 1-2-3. 組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学的解析

組織マイクロアレイ(TMAs)は SUPER BIO CHIPS (Seoul, Republic of Korea)から購入した。スライドを 60°C で 1 時間加熱した後、キシレンとエタノール希釈系列を用いて脱パラフィン処理を行った。その後 SuperBlock (TBS) Blocking Buffer (#37535, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 5 分間ブロッキングを行い、その後、一次抗体として GGCT 検出のため抗 CRF-21 抗体を 200 倍に希釈し、室温で一時間反応させた。一次抗体を洗浄した後、0.3%(w/v)過酸化水素-メタノール溶液に 15 分間室温で漬けて内因性ペルオキシダーゼを除去した。洗浄後二次抗体は HRP-conjugated anti-sheep IgG (Thermo Fisher Scientific)を 200 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。検出には、ストレプトアビジン(Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)を 5 分作用させた後、ヒストファイン SAB-PO(M)キット (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)を使用して発色させた。染色強度の判定基準は、染色された細胞の割合を Image J で定量化し、25%より少ない場合を weak、25-75%を moderate、75%

より多い場合を strong とした。

#### 1-2-4. siRNA 導入トランスフェクション条件

2×10<sup>5</sup> cells/well の PC3 細胞を 6 well plate に播種した。24 時間後、10 pmol/well の Non-targeting siRNA(control siRNA)もしくは GGCT siRNA と 5 µL の Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)試薬をトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)中で混合し、20 分間室温にて静置させた。これを血清除去した培地に交換した Opti-MEM 培養細胞に添加し、終濃度 5 nM の siRNA の存在下でトランスフェクションを行った。使用した siRNA 配列を Table 1 に示す。24 時間後 10% FBS-DMEM 培地に交換し、さらに 5 日間培養後各種アッセイを行った。

Table 1

Target gene	Sense(5'→3')	Anti-sense(5'→3')
Non targeting	GUACCGCACGUCAUUCGUAUC	UACGAAUGACGUGCGGUACGU
GGCT	UGACUAUACAGGAAAGGUCTT	GACCUUCCUGUAUAGUCATT

#### 1-2-5. ウェスタンブロッティング法

培養細胞を PBS で洗浄したのち、37°Cで約 1 分間のトリプシン処理にて細胞を接着面から遊離させ遠心処理にて細胞を回収した。回収した細胞を RIPA Buffer(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate-Na, 0.1% SDS)にプロテアーゼ阻害剤(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を加えたもので溶解し、氷冷させながら超音波処理にて破碎した。溶解液を 4°C、20,000×g で 15 分間遠心分離し、上清に含まれる可溶性のタンパク質抽出液を回収した。タンパク質抽出液は BCA タンパク質測定法(Bio-RAD, Hercules, CA, USA)を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 20 µg に sample buffer(125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、0.04% ブロモフェノールブルー)を加え、95°Cで 5 分間熱変性を行い、10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法を用いて分離した。セミドライ式転写装置(170 mA/gel, 75 分)を用いて PVDF メンブレン(Millipore, Burlington, MA, USA)にタンパク質を転写した後、5% スキムミルクおよび 0.05% Tween-20 を含有するリン酸緩衝溶液 (PBST) で室温下で 1 時間ブロッッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を 4°Cで一晩緩やかに振とうさせながら反応させた。PBST にて 5 分間 2 回洗浄したのち、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。抗体希釈液には 3%のウシ血清アルブミン (BSA, Nacalai Tesque) を含有する PBST を使用した。タンパク質の発現シグナルは、メンブレンを PBST で 5 分間 3 回洗浄したのちに PBS で 2 回洗浄し、Clarity Western ECL Substrate (Bio-RAD)を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus (Bio-RAD) の CCD カメラで検出した。

#### 1-2-6. WST-8 アッセイ

96 well plate に PC3 細胞を 1000 cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、pro-GA 50 µM ま

たは pro-GA 75  $\mu$ M を添加した。3、5、6 日後の生存率を cell count reagent SF kit(Nacalai Tesque)を用いて 450 nm における吸光度を測定することにより評価した。相対生存値は 0 日目における吸光度を 1 として算出した。

96 well plate に PC3 細胞もしくは LNCaP 細胞を 1000 cells/well で播種した。24 時間後に PC3 細胞には DMSO/pro-GA 50  $\mu$ M と DMSO/ドセタキセル 0.5 ng/mL を添加した。LNCaP 細胞には DMSO/pro-GA 40  $\mu$ M と DMSO/ドセタキセル 0.2 ng/mL を添加した。5 日後の生存率を cell count reagent SF kit を用いて 450 nm における吸光度を測定することにより評価した。相対生存値は DMSO のみにおける吸光度を 100%として算出した。

#### 1-2-7. トリパンプルー排出実験

6 well plate に PC3 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、pro-GA 75  $\mu$ M または pro-GA 100  $\mu$ M を添加した。6 日後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10  $\mu$ L と同量の 0.4% トリパンプルー(Wako)を混合した懸濁液を作成した。これを 10  $\mu$ L 用いて Countess II automated cell counter(Thermo Fisher Scientific)により細胞数を計測した。トリパンプルーを排出し透明な細胞として検出された細胞を生細胞、トリパンプルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントし、3 回の計測結果から平均値を算出し、細胞数を決定した。

6 well plate に PC3 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて細胞に siRNA を導入した。さらに、24 時間後ドセタキセルを 2.5 ng/mL 添加した。トランスフェクション後 6 日目にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調製し、同様に計数した。

#### 1-2-8. 断片化 DNA 検出アッセイ

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて PC3 細胞に siRNA を導入後、6 日目に PBS で wash 後、スクレイパーで細胞を回収した。再び PBS 200  $\mu$ L で懸濁後、1.5 mL チューブに移し、10 mg/mL RNase A を 10  $\mu$ L、10 mg/mL proteinkinase K を 10  $\mu$ L と 10% SDS を 20  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分インキュベートした。NaI solution (6 M NaI, 13 mM EDTA, 0.5% sodium-*N*-lauroylsarcosinate, 10 mg/mL glycogen, 26 mM Tris-HCl (pH 8.0))を 300  $\mu$ L 加え 60°C で 15 分インキュベートした。さらに 100% イソプロパノールを 500  $\mu$ L 加え十分に混合した後、15 分間、室温で放置した。20,000 $\times$ g で 15 分間、遠心し上清を除去し、ペレットを 50% イソプロパノール 1 mL で再懸濁後、20,000 $\times$ g で 15 分遠心し上清を除去した。70% エタノールで wash 後風乾し、TE バッファーで DNA を溶解させた。ポジティブコントロールとしては、エトポシドを HL-60 細胞に処理したサンプルを用いた。HL-60 細胞由来 DNA を 6  $\mu$ g/レーンまたは各種 siRNA を導入した PC3 細胞由来 DNA を 3  $\mu$ g/レーンで 2% アガロースゲルにアプライし、40 分泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し DNA を UV 下で検出した。検出器には、デジタルカメラ式ゲル撮影装置システム DX-410FS (バイオクラフト, Tokyo, Japan) を用いた。

#### 1-2-9. 細胞周期解析

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて PC3 細胞に siRNA を導入した。さらに、24 時間後に DMSO とドセタキセル 2.5 ng/mL をそれぞれ添加した。トランスフェクション 6 日後に、トリプシン処理した接着細胞を遠心処理にて回収した。回収した細胞を、70% エタノールを含む PBS に -20°C で一晩作用させエタノール固定を行った。次に、20,000×g で 5 分間遠心してエタノールを除去した。100 µg/mL RNase A (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) を含む PBS で懸濁し 37°C で 30 分間静置することにより、RNA の分解を行った。最後に、100 µg/mL propidium iodide (PI) を含む PBS で懸濁し、遮光、室温で 30 分間静置して、含有する DNA を染色した。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、BD LSRFortessa X-20 cell analyzer(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いて DNA 含有量を解析した。それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 1-2-10. Senescence-associated beta-galactosidase(SA-β-Gal)染色法

6 well plate に PC3 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、pro-GA 75 µM または pro-GA 100 µM を添加した。6 日後に細胞老化染色キット (OZ Bioscience, Marseille, France) を用いて、以下のように SA-β-Gal 染色法を行った。細胞を PBS で一度洗浄したのち、2% ホルムアルデヒドを含む 1 mL の Fixing buffer を加えて室温で 15 分間静置することにより細胞を固定した。Fixing buffer を取り除き、PBS で 2 回洗浄したのち、1×SA X Gal を含んだ Staining buffer を 1 mL 加え、37°C で一晩反応させた。Staining buffer を取り除き、PBS で 2 回洗浄したのち、青色に染色された細胞を老化細胞とした。

#### 1-2-11. SA-β-ガラクトシダーゼ活性測定

6 well plate に PC3 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、pro-GA 75 µM または pro-GA 100 µM を添加した。6 日後に 96-Well Cellular Senescence Assay kit(Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)を用いて SA-β-Gal 酵素活性を測定した。相対活性値は DMSO を添加した際の蛍光を 1 として算出した。

#### 1-2-12. 統計学的処理

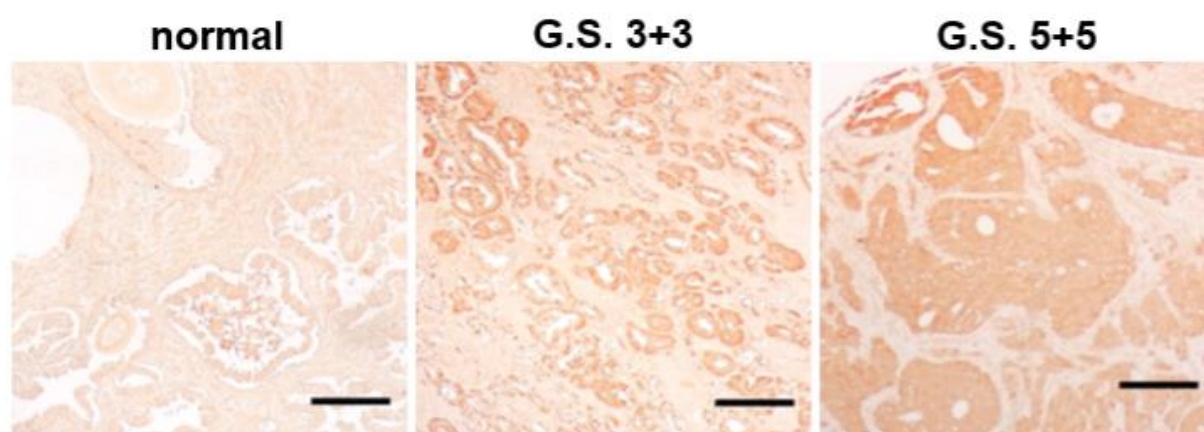
全てのデータはそれぞれ独立した 3 回以上の実験を行うことにより解析した。データは平均値±標準偏差(S.D.)にて表示した。組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学染色のスコアは、Fisher's exact test を行うことで比較した。 $p$  値は Excel software を用いて Student's  $t$ -test 両側検定を行うことにより算出し、得られた  $p$  値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。併用効果は pro-GA 5-80 µM とドセタキセル 0.025-0.5 ng/mL において、それぞれを単独処理および併用処理した結果に基づき、CalcuSyn 2.11 software(Biosoft, Cambridge, UK)を用いた Combination index(CI)により評価した。 $CI < 0.9$ 、 $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 、 $1.1 < CI$  をそれぞれ相乗効果、相加効果、拮抗効果とみなした。

### 1-3. 実験成績

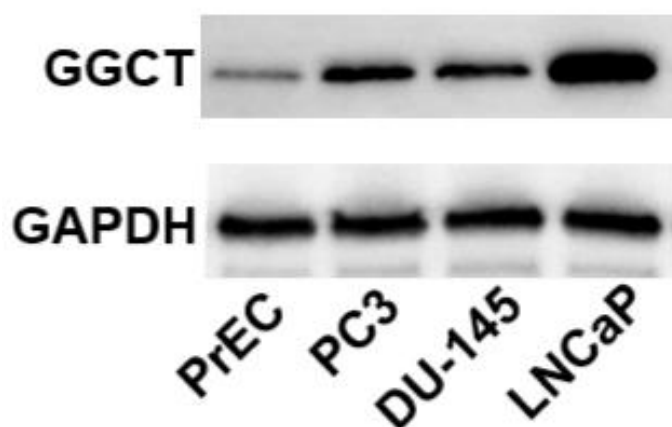
#### 1-3-1. 前立腺がん組織および細胞での GGCT の発現

9個の正常前立腺組織と40個の前立腺がん組織を含む組織マイクロアレイを用いて、GGCTの発現を免疫組織化学染色法により比較した(Fig. 7A)。GGCTの中程度または強度発現は、9個の正常前立腺組織のうち2個、40個の前立腺がん組織のうち35個で見られた。フィッシャーの正確確率検定で、正常前立腺組織と比較して前立腺がん組織においてGGCTが有意に高発現していることが判明した( $p < 0.01$ )。また、ヒト正常前立腺 PrEC 細胞とヒト前立腺がん PC3、DU-145、LNCaP 細胞での GGCT 発現をウエスタンブロット法により比較した(Fig. 7B)。正常前立腺細胞に比べて前立腺がん細胞で、GGCT のタンパクが高発現していることが明らかとなった。

A



B



**Figure 7. GGCT is overexpressed in prostate cancer cells.**

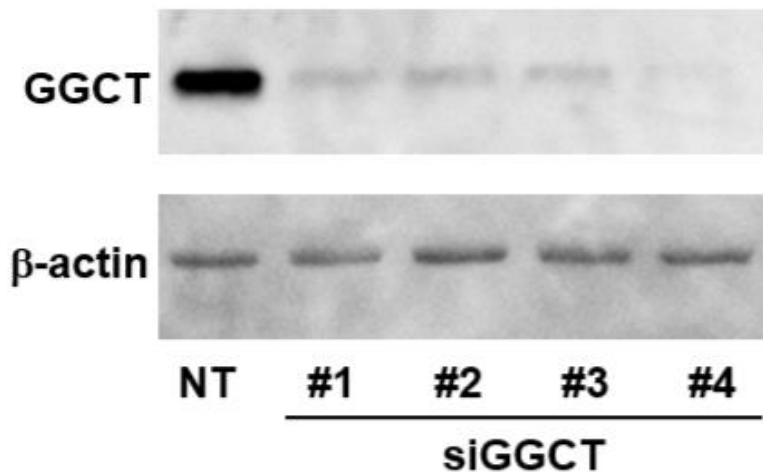
A, Representative images of immunohistochemical staining for GGCT in normal human prostate tissue and prostate cancer tissues (G.S., Gleason score). Scale bars: 200  $\mu$ m.

B, Western blot analysis of GGCT and GAPDH in normal prostate epithelial cells (PrECs) and PC-3, DU-145, and LNCaP prostate cancer cells.

These figures were cited from Fig. 1 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

### 1-3-2. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンの確認

前立腺がん細胞における GGCT の機能を詳細に解析するために、GGCT を RNA 干渉法を用いてノックダウンする手法の確立を試みた。前立腺がん PC3 細胞において、4 種類の GGCT-siRNA の導入を導入し、ウエスタンブロット法により GGCT タンパク質の発現量を解析した。その結果、いずれの GGCT-siRNA 配列においても、高い効率で GGCT タンパク質の発現が抑制されることを確認した(Fig. 8)。これらの実験により、高い効率で GGCT タンパク質の発現をノックダウンする条件を確立した。



**Figure 8. Western blot analysis confirms efficient knockdown of GGCT.**

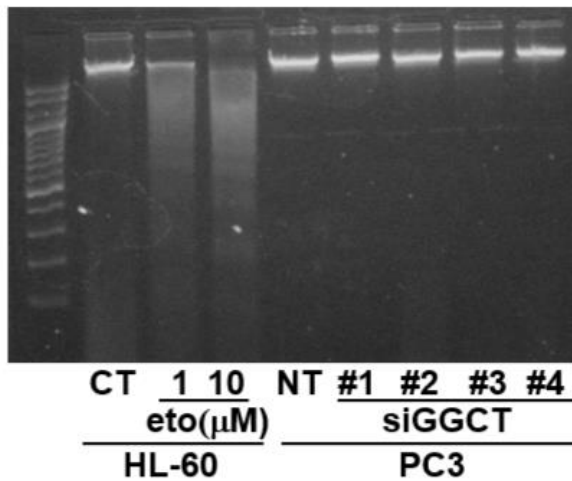
This figure was cited from Fig. 2 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.



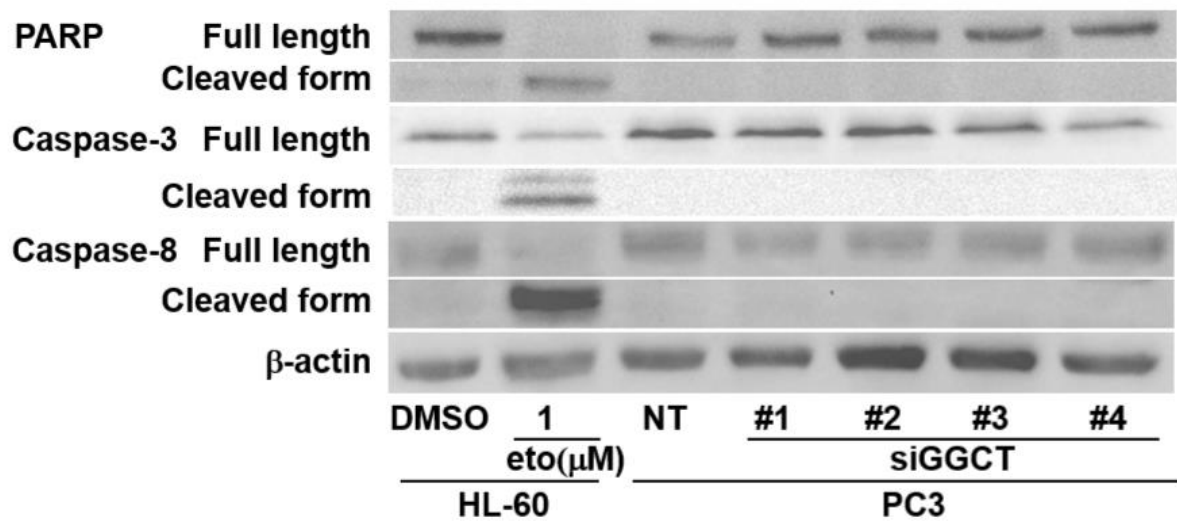
### 1-3-3. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンのアポトーシスへの寄与

これまでの過去の研究において、GGCT の人為的発現抑制は、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞において、アポトーシス細胞死を誘導しないことが報告されている(21)。そこで本研究では、ヒト前立腺がん PC3 細胞において、GGCT の人為的発現抑制が、MCF7 細胞と同様にアポトーシス細胞死を生じないかを解析するために、GGCT ノックダウンによるアポトーシス細胞死に伴って生じる DNA 断片化の有無を、アガロースゲル電気泳動法により検証した(Fig. 9A)。その結果、陽性コントロールとして、白血病 HL-60 細胞にエトポシドを添加すると、アポトーシスによる DNA 断片化が起こっていることを示す DNA ラダーが検出された。一方、PC3 細胞で GGCT をノックダウンしても DNA ラダーは検出されず、DNA の断片化は生じていないと考えられた。次に、PC3 細胞において、GGCT ノックダウンによって、アポトーシスシグナルを仲介するタンパク質である PARP、Caspase-3、Caspase-8 が活性化されて生じる、それぞれの切断されたタンパク質の発現が誘導されるのかを、ウエスタンブロット法により解析した(Fig. 9B)。その結果、陽性コントロールである、HL-60 細胞にエトポシドを添加したサンプルでは、それぞれ断片化した PARP、Caspase-3、Caspase-8 が検出された。しかしながら、一方、PC3 細胞に対して、GGCT をノックダウンしても、PARP、Caspase-3、Caspase-8 の断片化は検出されなかった。したがって、GGCT ノックダウンは前立腺がん PC3 細胞に対してアポトーシスシグナルの活性化を誘導しないと考えられた。

A



B



**Figure 9. GGCT knockdown does not activate apoptotic signaling.**

**A**, Etoposide (eto) treated HL-60 cells, but not PC-3 cells with GGCT knockdown, induced DNA ladder formation.

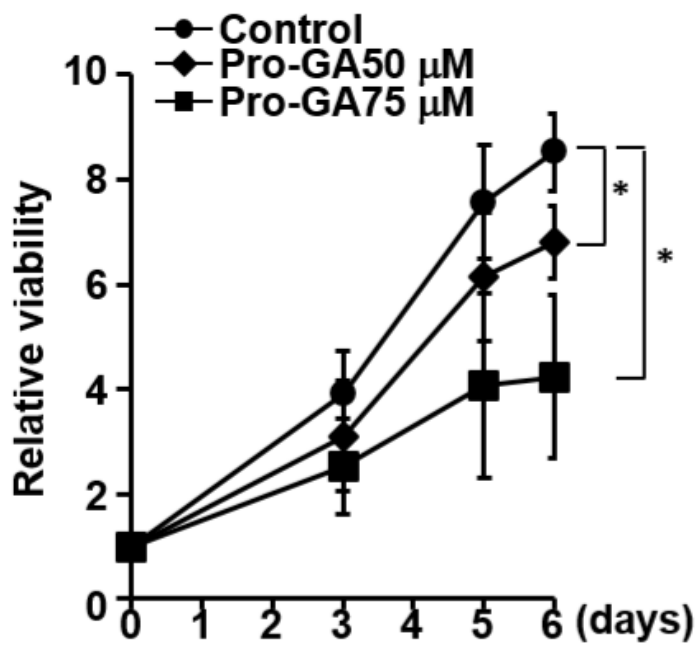
**B**, Western blot analysis of PARP, caspase-3, and caspase-8.

These figures were cited from Fig. 2 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

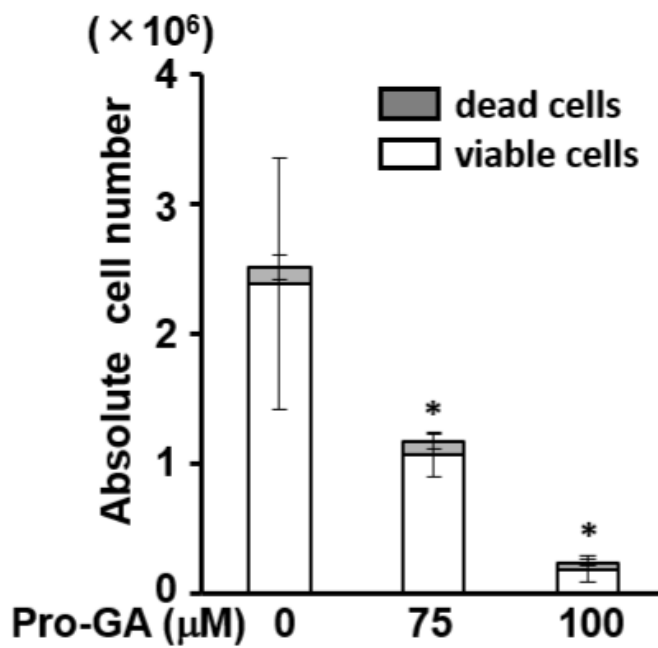
#### 1-3-4. 前立腺がん細胞での GGCT 阻害剤 pro-GA による細胞増殖の抑制

これまでの過去の研究において、ヒト前立腺がん PC3 細胞の移植腫瘍の成長を GGCT 阻害剤 pro-GA の全身投与により抑制することが報告されている(31)。しかしながら、この pro-GA による前立腺がん細胞の増殖抑制メカニズムには、不明な点が多い。そこで、本研究においては、ヒト前立腺がん PC3 細胞に対する GGCT 阻害剤 pro-GA による増殖抑制効果および細胞死誘導効果について、詳細に解析することを目的とし、PC3 細胞を種々の濃度と時間で pro-GA で処理し、WST-8 アッセイ(Fig. 10A)およびトリパンブルー染色法による細胞数計測(Fig. 10B)により、細胞増殖に与える影響について検証した。その結果、いずれの実験方法においても pro-GA の濃度依存的に PC3 細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、ヒト前立腺がん PC3 細胞において、GGCT 酵素活性を阻害すると、その増殖が抑制されることを示していると考えられた。また、トリパンブルー染色法で青色に染色され陽性となる死細胞が占める割合は、有意には増加しなかったため、DNA の断片化およびアポトーシスシグナル伝達型因子の断片化を検出する実験においてアポトーシス細胞死が誘導されなかった実験結果と合致して、GGCT 阻害剤 pro-GA による処理は、PC3 細胞に対して有意な細胞死を誘導しないと考えられた。そのため、GGCT 阻害剤 pro-GA による処理は、PC3 細胞に対して細胞死の誘導ではなく、細胞分裂の抑制を引き起こす可能性が示唆された。

A



B



**Figure 10. The GGCT inhibitor pro-GA inhibits proliferation.**

**A and B,** Assessment of cell growth by cell-viability assay **A** and cell counting **B**.

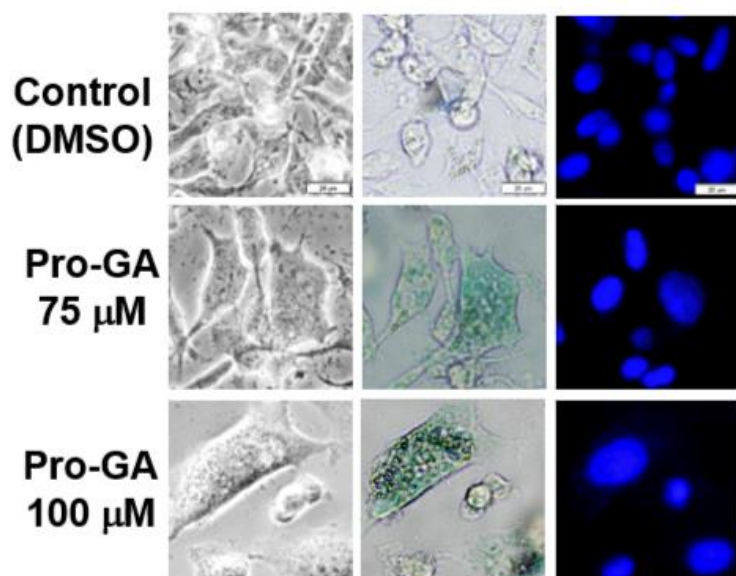
(\* $p < 0.05$ )

These figures were cited from Fig. 3 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

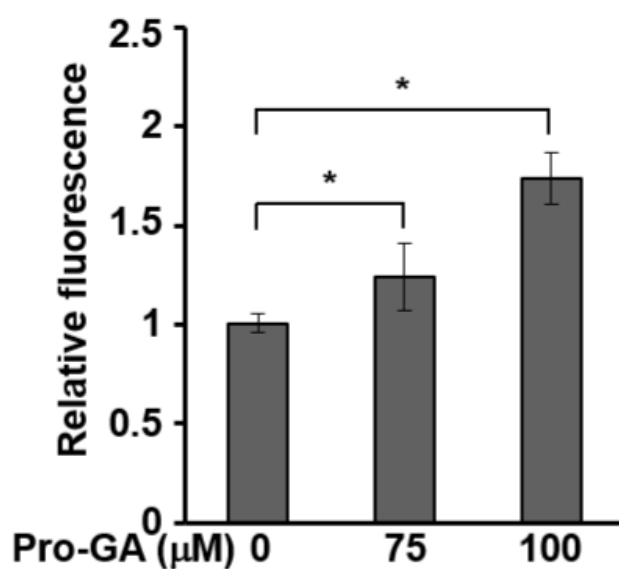
#### 1-3-5. 前立腺がん細胞での GGCT 阻害剤 pro-GA による細胞老化の誘導

これまでの過去の研究において、GGCT の人為的発現抑制は、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞をはじめとした種々のヒトがん細胞株において、細胞老化を誘導することが報告されている(21)。しかしながら、GGCT 阻害剤である pro-GA の処理によって、細胞老化が誘導されるかについては不明であった。そこで、本研究では、ヒト前立腺がん PC3 細胞に対する pro-GA 処理による、細胞老化の誘導へ与える影響について、細胞老化現象を検出するためのマーカーである SA- $\beta$ -galactosidase 染色法(Fig. 11A)と SA- $\beta$ -galactosidase 酵素の活性を測定する方法(Fig. 11B)によって検証した。その結果、PC3 細胞に pro-GA を作用させると、SA- $\beta$ -galactosidase 染色陽性の老化細胞が検出された。さらに、SA- $\beta$ -galactosidase 活性を測定すると、濃度依存的な活性の上昇が認められた。これらの結果は、以前の研究で GGCT ノックダウンが細胞老化を誘導したことと一致して、pro-GA を作用させることによる GGCT の酵素活性を阻害することによって、PC3 細胞に細胞老化を誘導して、その増殖を抑制することを示唆すると考えられた。

A



B



**Figure 11. The GGCT inhibitor pro-GA induces cellular senescence.**

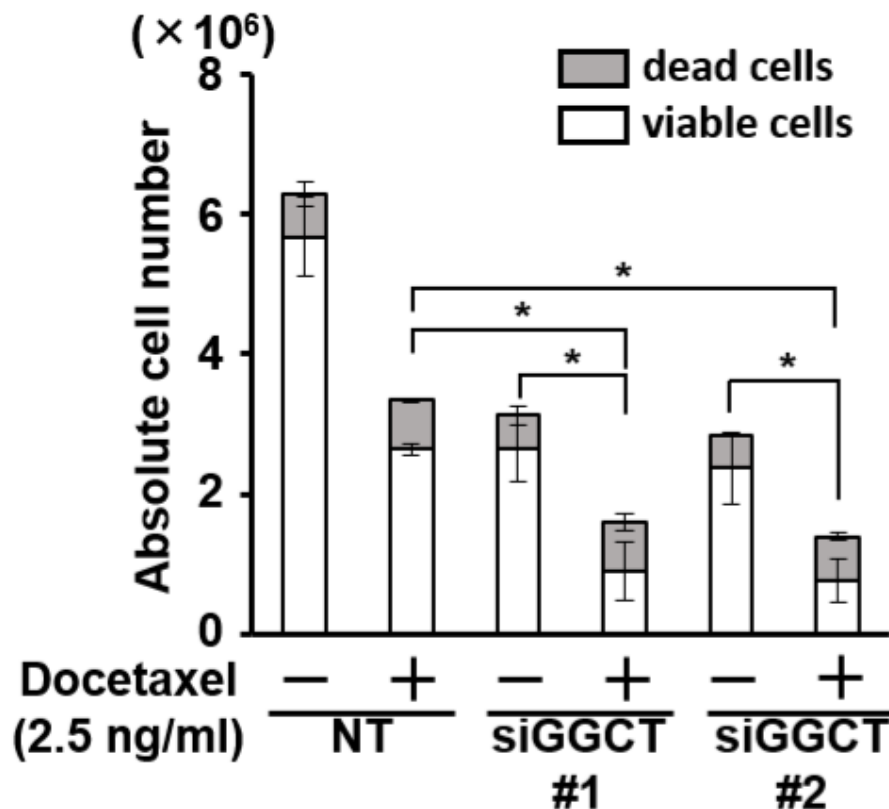
A and B, Representative images of  $\beta$ -galactosidase staining A, and measurement of  $\beta$ -galactosidase activity B, in cells treated with pro-GA. Scale bars: 20  $\mu$ m.

(\* $p < 0.05$ )

These figures were cited from Fig. 3 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

#### 1-3-6. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンによるドセタキセルの抗腫瘍効果の増強

これまでの実験結果により、ヒト前立腺がん PC3 細胞において、GGCT の機能を RNA 干渉法によりノックダウンして阻害すると、アポトーシス細胞死を誘導せずに、細胞増殖を抑制することが明らかとなり、また、GGCT 阻害剤を用いて GGCT 機能を阻害すると、細胞老化現象を引き起こすことが明らかとなった。一方、前立腺がんに対する既存の標準的治療薬である、抗がん剤ドセタキセルは、微小管の脱重合を阻害することにより、細胞周期における M 期の正常な進行を阻害し、アポトーシス細胞死を誘導することが、その主たる作用機序である。そこで、ドセタキセル処理と、GGCT の RNA 干渉法によるノックダウンによる処理を、単独および併用で行うことにより、細胞増殖抑制効果が増強されるかについて解析を行った。その結果、前立腺がん PC3 細胞において、GGCT ノックダウンとドセタキセル 2.5 ng/mL を併用することでそれぞれ単独よりも生細胞数が減少することを、細胞数計測によって発見した(Fig. 12)。これらの結果は、前立腺がん細胞に対し、ドセタキセルと GGCT の阻害を併用すると、増殖抑制効果が増強することを示唆していると考えられた。



**Figure 12. GGCT knockdown enhances the anticancer effects of docetaxel.**

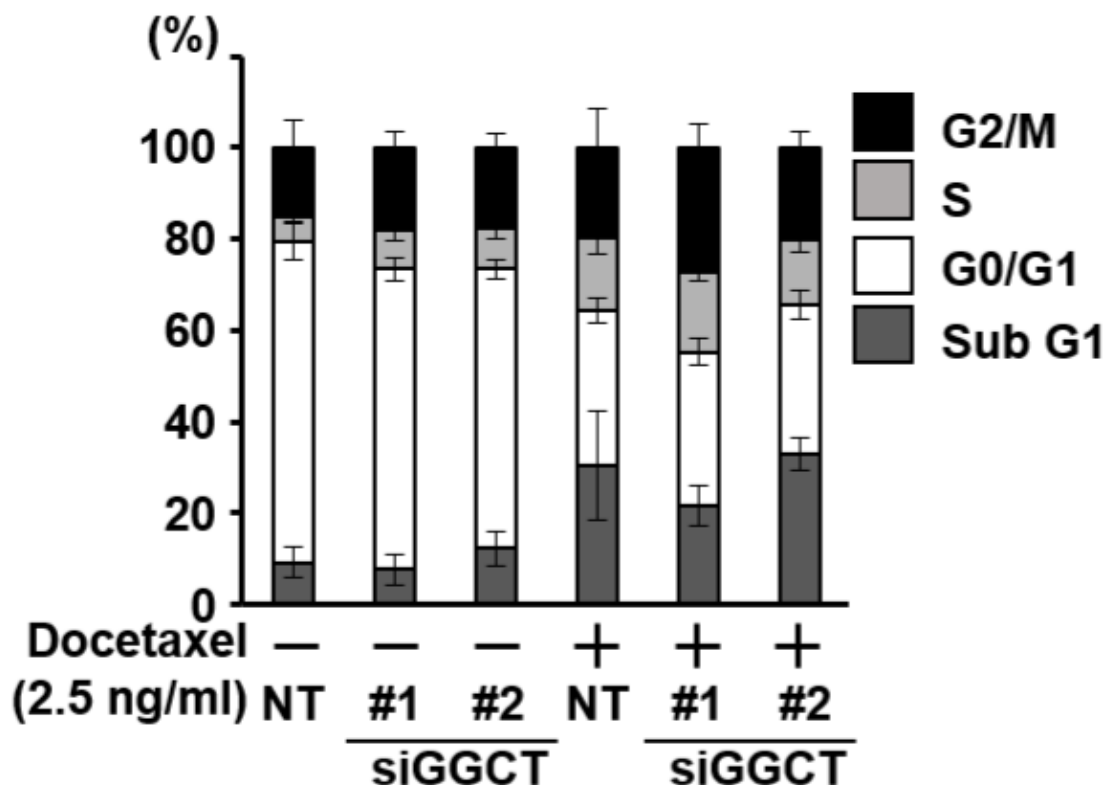
Cell count of PC-3 cells with GGCT knockdown and/or docetaxel treatment.

(\*p<0.05)

This figure was cited from Fig. 4 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

### 1-3-7. 前立腺がん細胞における GGCT ノックダウンとドセタキセルによる細胞周期への影響

前立腺がん細胞に対する GGCT ノックダウンとドセタキセルによる併用効果のメカニズムを詳細に解析することを目的として、フローサイトメトリーによる細胞周期解析により、これらの単独および併用が細胞周期に与える影響について解析した。その結果、前立腺がん PC3 細胞においてドセタキセル 2.5 ng/mL 添加によって、アポトーシス細胞死が誘導された細胞を示す SubG1 期の割合の増加が見られることを確認した。一方 GGCT ノックダウン単独では、SubG1 期の割合の増加は生じないことが明らかとなった(Fig. 13)。これらの結果は、ドセタキセル単独ではアポトーシス細胞死を誘導するが、これまでの実験結果と合致して GGCT のノックダウンでは、アポトーシス細胞死以外の機序で増殖が抑制されるということを示している。さらに、ドセタキセルと GGCT ノックダウンを併用した場合には、細胞周期の解析結果において、ドセタキセルの影響によると考えられる、アポトーシス細胞死を反映した SubG1 期の細胞割合の増加がみられたものの、さらなる増加等の変化はみられなかった。これらの結果は、ドセタキセルはアポトーシスを誘導するが、GGCT ノックダウンはアポトーシスを誘導せず、併用してもドセタキセルによるアポトーシス誘導に影響を及ぼさないと考えられた。



**Figure 13. GGCT knockdown does not affect cell cycle distribution.**

Cell cycle distribution of PC-3 cells with GGCT knockdown and/or docetaxel treatment.

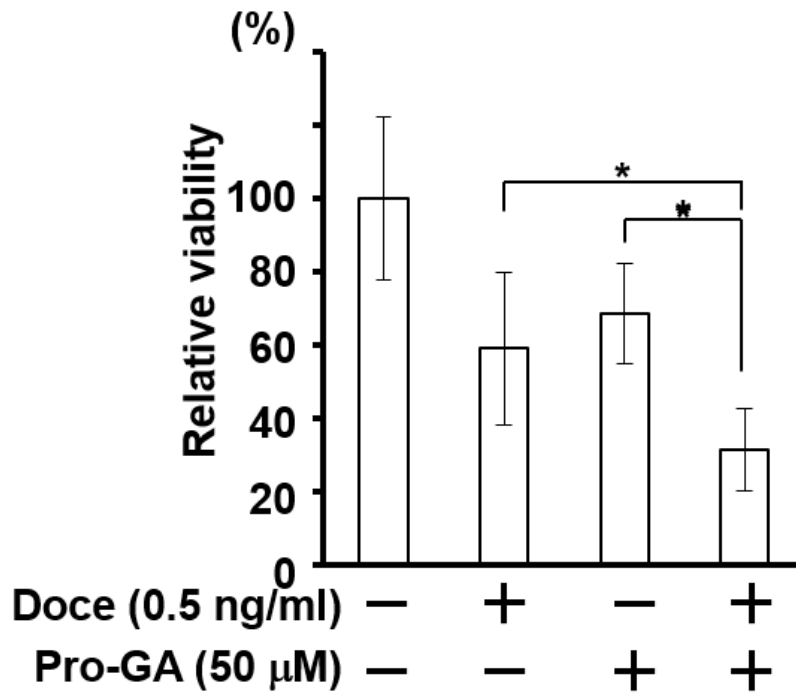
This figure was cited from Fig. 4 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.



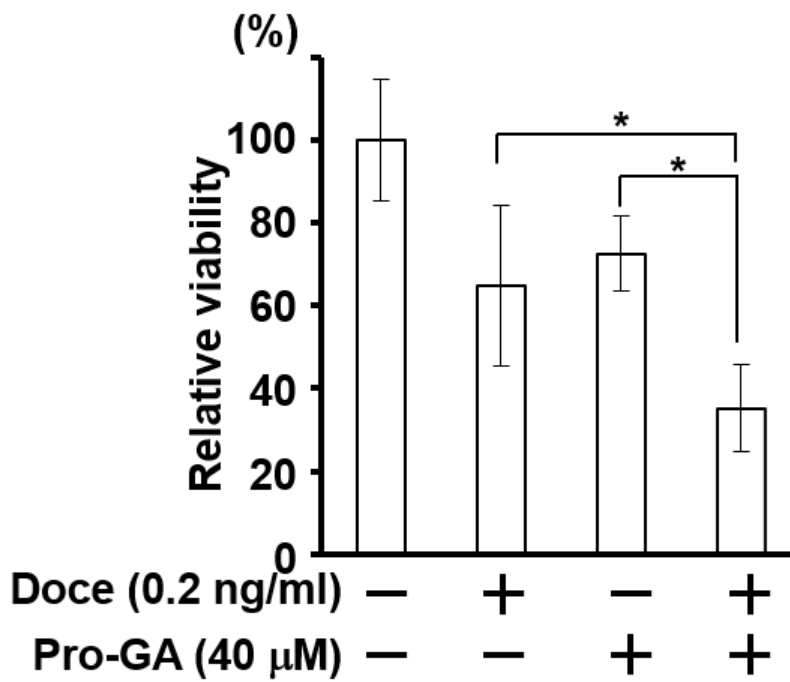
#### 1-3-8. 前立腺がん細胞における GGCT 阻害剤 pro-GA とドセタキセルの併用による増殖抑制効果の増強

前立腺がん細胞に対する既存の標準治療薬ドセタキセルに加え、GGCT 機能の阻害を併用することにより、前立腺がん細胞の増殖を抑制する効果を増強させることができるという仮説を検証することを目的とし、ヒト前立腺がん培養株である、PC3 細胞と LNCaP 細胞において、pro-GA 5-80  $\mu\text{M}$  とドセタキセル 0.025-0.5 ng/mL をそれぞれ単独および併用にて作用させて、細胞増殖抑制効果への影響を WST-8 アッセイによって解析した。その結果、PC3 細胞において、pro-GA 50  $\mu\text{M}$  とドセタキセル 0.5 ng/mL を併用することで相加効果が見られた (CI=0.916、Fig. 14A)。また、LNCaP 細胞において、pro-GA 40  $\mu\text{M}$  とドセタキセル 0.2 ng/mL を併用することで相乗効果が見られた (CI=0.774、Fig. 14B)。以上の結果より、前立腺がん細胞において GGCT を阻害することは、ドセタキセルによる抗腫瘍効果を増強すると考えられる。

A



B



**Figure 14. The GGCT inhibitor pro-GA enhances the anticancer effects of docetaxel.**

**A and B,** Cell viability of PC-3 cells **A** and LNCaP cells **B** treated with pro-GA and/or docetaxel (Doce). (\*p<0.05)

These figures were cited from Fig. 4 in Takagi H et al. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 4811-4816.

#### 1-4. 考察

本章では、GGCT 阻害によるヒト前立腺がん PC3 細胞に対する増殖抑制効果とその機序について解析を行った。さらに、PC3 細胞と別のヒト前立腺がん LNCaP 細胞においてドセタキセルと GGCT 阻害剤である pro-GA を併用することでそれぞれ単独よりも増殖抑制効果が増大することを示した。

前立腺がんは肺がん和乳がんに次いで世界で 3 番目に頻度が高く、日本でも罹患率は増加傾向にある(81)。前立腺がんに対して最も一般的で多くの患者が受ける治療としてアンドロゲン除去療法(ADT)がある(82)。ADT は初期には高い効果を示すが、数年後には治療抵抗性の状態(CRPC)へ推移していく。ドセタキセルは CRPC に対して最も頻繁に使用される化学療法の一つであり、標準的治療とみなされている(83)。しかしながら、進行した CRPC 患者の予後は依然として不良である。したがって新たな治療法が必要である。

そこで我々は、GGCT 阻害剤が前立腺がんの治療法の一つにつながるのではないかと考えた。GGCT は多くのがん組織で正常組織と比較して高発現していることが知られている(79,80)。以前の研究で、ヒト乳がん MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞において GGCT をノックダウンすると細胞増殖が抑制され、これには、p21 または p16 の発現上昇を介した細胞周期停止とそれに続く細胞老化の誘導が関与することが報告されている(21)。

本研究では、GGCT が正常前立腺組織と比較して前立腺がん組織で高発現しており、さらにヒト正常前立腺 PrEC 細胞と比較してヒト前立腺がん培養細胞株 PC3 細胞、DU-145 細胞および LNCaP 細胞においても高発現していることを明らかにした(Fig. 7)。

次に、PC3 細胞における GGCT ノックダウンによる増殖抑制メカニズムを検証した。4 種類の siGGCT を用いて GGCT のノックダウン効果を確認した(Fig. 8)。GGCT ノックダウンによる増殖抑制効果にアポトーシスが関与している可能性について検証した(Fig. 9)。その結果、GGCT をノックダウンしても DNA 断片化は検出されず、アポトーシスシグナルの伝達タンパク質の活性化は見られなかった。これらのことから、GGCT ノックダウンはアポトーシスを誘導しないことが明らかとなった。したがって、GGCT ノックダウンはアポトーシスを誘導するドセタキセルとは別の経路からの細胞増殖抑制効果を見込めるのではないかという仮説を立てた。

さらに、PC3 細胞に対する GGCT 阻害剤 pro-GA の効果を検証した。細胞増殖は pro-GA 濃度依存的に抑制された(Fig. 10)。また、pro-GA 濃度依存的に細胞老化も誘導された(Fig. 11)。これは、以前の研究での GGCT ノックダウンによる乳がん細胞への効果と合致している。

最後に、GGCT 阻害とドセタキセルを組み合わせることによる細胞増殖抑制効果を検証した。PC3 細胞においてドセタキセル 2.5 ng/mL を GGCT ノックダウンと併用すると、それぞれ単独よりも細胞の増殖が有意に抑制された(Fig. 12)。細胞周期を解析すると、ドセタキセル 2.5 ng/mL によって SubG1 期の割合の上昇が見られたが、GGCT ノックダウンを併用しても SubG1 期の割合には影響を与えなかった(Fig. 13)。このことから、ドセタキセルはアポトーシスを誘導する一方で、GGCT ノックダウンはアポトーシス誘導には関与しないと考えられた。PC3 細胞と LNCaP 細胞において、ドセタキセルと pro-GA を様々な濃度で組み合わせ、

細胞増殖に与える影響の検証を行った(Fig. 14)。PC3 細胞ではドセタキセル 0.5 ng/mL と pro-GA 50  $\mu$ M で相加効果が、LNCaP 細胞ではドセタキセル 0.2 ng/mL と pro-GA 40  $\mu$ M で相乗効果が見られた。したがって、ドセタキセルに pro-GA を併用することで、前立腺がんの治療効果を向上できる可能性が考えられた。

GGCT 阻害がドセタキセルによる抗腫瘍効果を促進するという本研究結果から、前立腺がん細胞のドセタキセルによる治療下で、GGCT が細胞増殖の促進に関与しているのではないかと予測できる。実際に、GGCT の過剰発現は血清飢餓などのストレス誘発環境で細胞増殖を促進することが知られている(22)。さらに、がん細胞での GGCT ノックダウンは AMPK-ULK1 シグナル伝達経路を促進しオートファジーを引き起こす。これは、GGCT ノックダウンが代謝ストレスを誘導することを示唆している。興味深いことに、神経膠芽腫においても GGCT は高発現しており、GGCT をノックダウンすると Notch-Akt 経路が抑制される(10)。高悪性度卵巣漿液性腺がんでも GGCT が高発現しており、GGCT ノックダウンによって PI3K-Akt-mTOR 経路が抑制される(7)。我々の研究グループの以前の研究で、PC3 細胞において GGCT ノックダウンが Akt 活性を減少することを明らかにした(22)。Akt 経路はドセタキセルの耐性に重要な役割を果たすという報告があることから、GGCT の阻害が Akt 経路を抑制することで、ドセタキセルによる効果を増大するのではないかと考えられる(84)。

以上の研究成果から、GGCT 阻害剤である pro-GA をアポトーシス誘導の既存の抗がん剤ドセタキセルと併用することにより、前立腺がん細胞に対する増殖抑制効果を増強しうることが示され、また、これらの治療による副作用の軽減にもつながる可能性があると考えられるため、pro-GA を用いた GGCT 阻害戦略は、CRPC の治療成績改善に寄与する可能性が示唆された。第 2 章では、GGCT-PHB2 相互作用に着目し、PHB 阻害剤のがん細胞に対する増殖抑制効果の検証を行った。

## 第2章

### fluorizoline による細胞増殖抑制とそのメカニズム

#### 2-1. 緒言

乳がんは世界で新たに診断されるがんのうち女性で最も多く、その罹患率は依然として上昇傾向にあるため、乳がんの新たな治療法を探索する必要がある(81)。我が国においても、乳がんは女性の部位別がん罹患率第1位、部位別がん死亡率でも第5位を占めており、大きな臨床上の問題となっている。早期に発見された乳がんの予後は比較的良好であるものの、進行乳がんの治療には、外科的手術療法、ホルモン治療薬、殺細胞性抗がん剤、分子標的治療薬、放射線療法などが集学的に用いられるが、ひとたび再発や遠隔転移などの進行性のステージに陥った乳がん症例では、その治療に難渋し、完全に治癒させることが困難となる。

これまでの研究により近年、乳がん細胞において高発現する GGCT タンパク質と相互作用する新規のタンパク質として、PHB2 タンパク質が発見された(23)。PHB2 は、細胞増殖シグナル伝達系、免疫反応、ミトコンドリアの動態、およびエストロゲン受容体を介した転写の調節等に影響を及ぼすといった多面的な機能を発揮する、足場タンパク質として報告されている(34,35)。乳がん細胞においては、これまでの研究により、PHB2 タンパク質は核内へ移行することで、最も重要ながん抑制遺伝子産物の一つである p53 タンパク質の下流標的因子であるサイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p21 の発現を抑制的に制御することに関与することが示されている(85)。前述の通り、PHB タンパク質は細胞増殖にも関与しているため、新規抗がん剤開発のための標的分子となり得ると考えられてきた。そのため、現在までに、複数の PHB に作用する化合物が合成されてきた(86)。その一つとして PHB に直接結合してその機能を阻害することが報告されている fluorizoline がある(45)。この fluorizoline については、急性白血病細胞や慢性白血病細胞、子宮頸がん細胞に対する細胞死誘導効果が報告されている。しかし、fluorizoline の抗増殖効果の根底にあるメカニズムはすべて解明されているわけではない。そこで、本章では、この PHB 阻害剤 fluorizoline に着目し、その PHB2 への結合能および阻害能が、GGCT タンパク質と PHB2 タンパク質との間の相互作用に対していかなる影響を及ぼすのか、また、乳がん細胞の増殖の抑制に繋がるのかについて解明することを目的とした。

本章では、ヒト乳がん MCF7 細胞を用いて fluorizoline による細胞増殖抑制効果を検証した。さらに、乳がん細胞のみならず、普遍的ながん細胞の増殖を抑制する効果を示すことを目的として、ヒト膠芽腫 A172 細胞およびヒト前立腺がん PC3 細胞に対する fluorizoline による細胞増殖抑制効果について検証した。その増殖抑制効果のメカニズムの一端を明らかにするために、細胞増殖を抑制する p21 タンパク質の発現量に与える影響を解析した。また、この fluorizoline による p21 の誘導効果が mRNA レベルでも生じるのかについても解析した。

次に、p21 誘導を伴う細胞増殖抑制効果のメカニズムを詳細に解析するために、細胞周期に

対して fluorizoline 処理が与える影響を解析した。また、これらの効果に対して、p21 タンパク質の発現誘導が、実質的に寄与するのかについて明らかにすることを目的として、p21 の発現を RNA 干渉法により同時にノックダウンすることにより、fluorizoline の増殖抑制効果が解除されるのかについて検証した。

次に、fluorizoline によるがん細胞の増殖抑制効果に、PHB2 を阻害することが実質的に関与していることを明らかにするために、PHB2 を人為的に強制発現させてその分子機能を亢進させた MCF7 細胞を作製し、fluorizoline による細胞増殖抑制効果や p21 発現誘導効果が回復されるのかについて検証した。さらに、この PHB2 を人為的に強制発現した MCF7 細胞を用いて、fluorizoline による細胞周期停止が PHB2 強制発現による機能亢進によって阻害されるのかについても解析を行った。

最後に、fluorizoline の処理による PHB2 の阻害が、PHB2 と GGCT タンパク質の結合を阻害する影響があるのかについて解析した。さらに、fluorizoline 処理により、PHB2 の細胞内での局在、特に、核内に局在する PHB2 量に与える影響を解析した。上記の実験を遂行することにより、fluorizoline による新しいがん細胞の増殖抑制効果のメカニズムの一端を明らかにすることに留まらず、fluorizoline による薬理学的 PHB2 阻害を通して、GGCT タンパク質と PHB2 タンパク質との間の相互作用を標的することにより、GGCT を介した PHB2 核内局在制御作用を阻害するという新しいがん治療戦略を確立することを、本章の目的とした。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 細胞と培養条件

ヒト乳がん MCF7 細胞、ヒト膠芽腫 A172 細胞、ヒト前立腺がん PC3 細胞は、RIKEN BRC から購入し、10% ウシ胎児血清および 1% penicillin/streptomycin を加えた DMEM で培養した。37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。fluorizoline は、Pérez-Perarnau et al., 2014 に記載されている手順に従って合成されたものを使用した。fluorizoline を DMSO で溶解し、ストック溶液を 10 mM の濃度で調製した。

### 2-2-2. トリパンプルー排出実験

6 well plate に MCF7 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO または fluorizoline 100, 500, 1000 nM をそれぞれ添加した。そこから、24、48、72 時間後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10  $\mu$ L と同量の 0.4% トリパンプルーを混合した懸濁液を作成した。これを 10  $\mu$ L 用いて Countess II automated cell counter により計数した。トリパンプルーを排出し透明な細胞として検出された細胞を生細胞、トリパンプルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントし、3 回の計測結果から平均値を算出し、細胞数を決定した。同様に、6 well plate に A172 細胞と PC3 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO または fluorizoline 1, 2.5, 5  $\mu$ M をそれぞれ添加した。24、48、72 時間後に、生細胞数のカウントを行った。

### 2-2-3. 細胞増殖能の評価

#### WST-8 アッセイ

96 well plate に control MCF7 細胞または PHB2-OE MCF7 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、fluorizoline 0.1  $\mu$ M または 1  $\mu$ M を添加した。48 時間後の生存率を cell count reagent SF kit (Nacalai Tesque) を 10  $\mu$ M 添加後、4 時間後の 450 nm における吸光度を測定することにより評価した。相対生存値は 0 日目における吸光度を 1 として算出した。

#### CellTiter-Glo アッセイ

6 cm dish に control MCF7 細胞または PHB2-OE MCF7 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、fluorizoline 1  $\mu$ M を添加した。24 時間後にトリプシン処理した後、生細胞数をカウント後  $1 \times 10^6$  cells / 50  $\mu$ L in PBS で懸濁した細胞を 96 well white plate に移した。CellTiter-Glo 試薬 (Promega, Madison, WI, USA) を 50  $\mu$ L ずつ添加し、10 分遮光しながら室温で放置した後、発光をプレートリーダーで検出した。

### 2-2-4. 抗体

一次抗体には、マウス由来 IgG 抗体として p21 (1:200; 556430, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、GAPDH (1:1000; 016-25523, Wako)、the V5 epitope tag (V5) (1:1000; R960-25, Thermo Fisher Scientific)、PHB2 (1:200; Sc-133094, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、ヒツジ由来 IgG 抗体として GGCT (1:500; AF5086, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、ウサ

ギ由来 IgG 抗体として Lamin B1 (1:1000; 12987-I-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA)を用いた。二次抗体として、Horse anti-mouse IgG-HRP conjugates を Vector Laboratories (1:2000; PI-2000, Burlingame, CA, USA)、Rabbit anti-sheep IgG-HRP conjugates を Thermo Fisher Scientific (1:5000; 81-8620)、The HRP-linked goat anti-rabbit IgG (1:2000; 7074)を Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)からそれぞれ購入した。mouse IgG1 isotype controls (5415)は Cell Signaling Technology、a mouse GGCT mouse monoclonal antibody (TSS-M01)は Cosmo Bio(Tokyo, Japan)から購入した。

#### 2-2-5. ウェスタンブロッティング法

培養細胞を PBS で洗浄したのち、37°C約 1 分間のトリプシン処理にて細胞を接着面から遊離させ遠心処理にて細胞を回収した。回収した細胞を RIPA Buffer(50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholate-Na、0.1% SDS)にプロテアーゼ阻害剤を加えたもので溶解し、氷冷させながら超音波処理にて破碎した。溶解液を 4°C、20,000×g で 15 分間遠心分離し、上清に含まれる可溶性のタンパク質抽出液を回収した。タンパク質抽出液は BCA タンパク質測定法を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 20 µg に sample buffer(125 mM Tris-HCL、4% SDS、20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、0.04% ブロモフェノールブルー)を加え、95°Cで 5 分間熱変性を行い、10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。セミドライ式(170 mA/gel、75 分)にて PVDF メンブレンに転写した後、3% スキムミルクおよび 0.05% Tween-20 を含有する トリス緩衝溶液(TBST)または PVDF blocking reagent for Can Get Signal(TOYOBO, Osaka, Japan)で室温下 1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を 4°Cで一晩緩やかに振とうさせながら反応させた。PBST にて 5 分間 2 回洗浄したのち、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。抗体希釈液には 3%のウシ血清アルブミン(BSA)を含有する TBST、Can Get Signal immunoreaction enhancer solution(TOYOBO)もしくは signal enhancer HIKARI solution(Nacalai Tesque)を使用した。タンパク質の発現シグナルは、メンブレンを PBST で 5 分間 3 回洗浄したのちに PBS で 2 回洗浄し、Clarity Western ECL Substrate または Chemi-Lumi One Super(Nacalai Tesque)を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus の CCD カメラで検出した。

#### 2-2-6. siRNA 導入トランスフェクション条件

使用した siRNA は RNAi (Tokyo, Japan)または Gene Design (Osaka, Japan) より購入した。配列を以下の表に示す。

Target gene	Sense(5'→3')	Anti-sense(5'→3')
Non targeting	GUACCGCACGUCAUUCGUAUC	UACGAAUGACGUGCGGUACGU
p21	CUUCGACUUUGUCACCGAG	CUCGGUGACAAAGUCGAAG

p21 の siRNA 導入は Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen, Waltham, MA) を用いてプロトコールに従って行った。まず、6 well plate に MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well



で播種した。24 時間後、30 pmol/well の Non-target control siRNA、p21 siRNA と 5  $\mu$ L の Lipofectamine RNAi MAX 試薬をトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、15 分間室温にて静置させ、penicillin/streptomycin を含まない培地に交換した培養細胞に添加し、終濃度 10 nM の siRNA の存在下でトランスフェクションを行った。24 時間後に MCF7 細胞では DMSO または fluorizoline 1  $\mu$ M、A172 細胞と PC3 細胞では DMSO または fluorizoline 5  $\mu$ M をそれぞれ添加し、48 時間後にウェスタンブロッティングと生細胞数のカウントを行った。

#### 2-2-7. PHB2 強制発現 MCF7 細胞の樹立

pENTR221-PHB2 ベクターは DNAFORM (clone no. 100011434, Yokohama, Japan) から購入した。pENTR221-PHB2 ベクターは Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて以下のように pEF-DEST51 ベクターへ組み換えた。pENTR221-PHB2 ベクターと pEF-DEST51 ベクターそれぞれ 150 ng ずつに TE buffer (pH 8.0)を加えて 8  $\mu$ L とし、そこに LR Clonase II Enzyme Mix を 2  $\mu$ L 加えて、25°Cで 1 時間インキュベートした。Proteinase K 溶液を 1  $\mu$ L 加えて混合した後、37°Cで 10 分間インキュベートした。ここで得られたベクターを E. coli DH5 $\alpha$  コンピテントセル (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) を用いて、以下のようにトランスフォーメーションを行った。得られたベクターを 100  $\mu$ L のコンピテントセルに加え、氷中に 30 分間静置し、42°Cで 45 秒間インキュベートした。氷中で 2 分間静置し、37°Cに保温しておいた SOC Medium 900  $\mu$ L を加えて、200 rpm、37°Cで 1 時間振とうした。これを、100  $\mu$ g/mL のアンピシリン (Wako)を添加した寒天培地に播種し、37°Cで一晩インキュベートした。得られたコロニーを 100  $\mu$ g/mL アンピシリン含有 LB 培地 2 mL で 200 rpm、37°Cで 8 時間振とうした。200 mL のアンピシリン含有 LB 培地に移して 200 rpm、37°Cで一晩振とうした。6,000 $\times$ g、4°Cで 15 分間遠心分離を行うことにより大腸菌ペレットを得た。EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、以下のようにプラスミド DNA の精製を行った。ペレットに Buffer P1 を 10 mL 加えて懸濁し、さらに Buffer P2 を 10 mL 加えて転倒混和した後、室温で 5 分間インキュベートした。冷却した Buffer P3 を 10 mL 加えて転倒混和し、ライセートを QIAfilter Cartridge に注ぎ、室温で 10 分間インキュベートした。プランジャーを QIAfilter Max Cartridge に入れ、ろ過したライセートに Buffer ER を 2.5 mL 加えて転倒混和し、氷上で 30 分間インキュベートした。あらかじめ Buffer QBT で平衡化した QIAGEN-tip500 に得られたライセートを加え、自然落下によりろ過した。Buffer QC で 2 回洗浄し、15 mL の Buffer QN でプラスミド DNA を溶出した。この溶出液の 0.7 倍量のイソプロパノール(Wako)を添加し、15,000 $\times$ g、4°Cで 30 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットに 70% エタノール(Wako)を添加し、15,000 $\times$ g、4°Cで 10 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを空气中で乾燥させ、50  $\mu$ L の TE buffer で溶解することにより目的のプラスミド DNA(V5-tagged PHB2 ベクター)を得た。最後に、2 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の MCF7 細胞に 2  $\mu$ g の V5-tagged PHB2 ベクターまたは pEF-DEST51 empty ベクターを、Amaxa cell line Nucleofector Kit V and a Nucleofector 2b device(Lonza, Visp, Switzerland)の P-020 プログラムを用いてエレクトロポレーション法によって遺伝子導入した。得られた MCF7 細胞は、10  $\mu$ g/mL の blasticidin(Wako)を含有した DMEM

で3週間以上培養することによりセレクションを行い、V5-tagged PHB2 の安定強制発現細胞株を樹立した。

## 2-2-8. 定量的リアルタイム PCR(qRT-PCR)法

6 well plate に MCF7 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後に DMSO または fluorizoline  $1 \mu\text{M}$  を添加し、1、3、9、12、24 時間後に細胞を回収した。細胞懸濁液をそれぞれ  $500 \mu\text{L}$  の TRIzol (Thermo Fisher Scientific) に溶解し、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて以下のように全 RNA 抽出物を精製した。溶解物に  $100 \mu\text{L}$  のクロロホルム (Wako) を加え、激しく振とうした。室温で2分間静置後、 $12,000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ で15分間遠心分離した。上清を回収し、同量の100% エタノール (Wako) を加えて激しく振とうした。これを RNeasy スピンカラムに移しかえ、 $12,000 \times g$ 、室温で15秒間遠心分離した。下層を廃棄し、Buffer RW1 を  $700 \mu\text{L}$  添加した。 $12,000 \times g$ 、室温で15秒間遠心分離した。下層を廃棄し、Buffer RPE を  $500 \mu\text{L}$  添加した。 $12,000 \times g$ 、室温で15秒間遠心分離した。下層を廃棄し、もう一度 Buffer RPE を  $500 \mu\text{L}$  添加した。 $12,000 \times g$ 、室温で2分間遠心分離した。下層カラムを新たなカラムと交換し、 $15,000 \times g$ 、室温で1分間遠心分離した。下層カラムを新たなチューブと交換し、上層カラムに RNase free の滅菌蒸留水  $20 \mu\text{L}$  を添加し、 $12,000 \times g$ 、室温で1分間遠心分離することにより、下層に細胞全 RNA 溶液を得た。得られた全 RNA  $500 \text{ ng}$  から、ReverTra Ace qPCR RT master mix (TOYOBO) を用いて以下のように逆転写反応を行い、cDNA を合成した。 $500 \text{ ng}$  の RNA に滅菌蒸留水を加えて  $6 \mu\text{L}$  とし、 $65^\circ\text{C}$ で5分間加熱した。gDNA Remover を加えた 4×DN Master Mix を  $2 \mu\text{L}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$ で5分間加熱した。5×RT Master Mix II を  $2 \mu\text{L}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$ で15分、 $50^\circ\text{C}$ で5分、 $98^\circ\text{C}$ で5分間インキュベートした。得られた cDNA に THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO) を加え、Light Cycler 96 system (Roche Diagnostics) を用いて、cycle1 :  $95^\circ\text{C}$ で60秒、cycle2 (×40) :  $95^\circ\text{C}$ で15秒、 $60^\circ\text{C}$ で60秒の条件で RT-qPCR を行った。遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子 hARF1 の mRNA 発現量を内部標準として  $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$  法を用いて算出した。Eurofins Genomics より購入した各 Primer の配列は以下に示す。

Target		Sequence (5'→3')
p21	Forward	GCAGACCAGCATGACAGATTT
	Reverse	GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA
hARF1	Forward	GACCACGATCCTCTACAAGC
	Reverse	TCCCACACAGTGAAGCTGATG

## 2-2-9. BrdU 細胞増殖アッセイ

APC BrdU flow kit (BD Biosciences) を用い、以下のようなプロトコールに従い、細胞周期における DNA 合成期に入った S 期の細胞割合について解析を行った。上記の条件にて樹立した PHB2 強制発現 MCF7 細胞(PHB2-OE MCF7)を使用した。Control MCF7 と PHB2-OE MCF7 をそれぞれ 6 cm dish2 枚に  $1.5 \times 10^5$  cells/dish で播種した。24 時間後に DMSO または fluorizoline  $1 \mu\text{M}$  を添加し、さらに24時間後に希釈した BrdU(1 mM)を  $25 \mu\text{L}$  ずつ添加して90分間イン

キュベートした。トリプシン処理にて細胞を回収し、 $2,000\times g$  で 5 分間遠心分離して、上清を除去した。1×BD Perm/Wash Buffer を 1 mL ずつ加え、 $2,000\times g$  で 2 分間遠心分離して、上清を除去した。BD Cytofix/Cytoperm Buffer を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、15 分間氷上に静置した。1×BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。BD Cytoperm Plus Buffer を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、10 分間氷上に静置した。1×BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。BD Cytofix/Cytoperm Buffer を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、5 分間氷上に静置した。1×BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。希釈した DNase( $300\text{ }\mu\text{g/mL}$ )を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加えて、15 分間温浴でインキュベートした。次に、1×BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。1×BD Perm/Wash Buffer で 1/100 に希釈した APC-BrdU を 50  $\mu\text{L}$  ずつ加えて、暗所で 20 分間静置した。1×BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。7-ADD 20  $\mu\text{L}$  と Staining Buffer 1 mL を加えて懸濁した。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、フローサイトメーターFACS BD LSRFortessa X-20 cell Analyzer (BD Bioscience) を用いて解析した。それぞれのサンプルは、10,000 個以上の細胞を用いて解析を行った。

#### 2-2-10. 細胞周期解析

MCF7 細胞または A172 細胞を 6 cm dish にそれぞれ  $1.5\times 10^5$  cells/dish で播種した。24 時間後、MCF7 細胞には DMSO または fluorizoline 1  $\mu\text{M}$ 、A172 細胞には DMSO または fluorizoline 1  $\mu\text{M}$  もしくは 5  $\mu\text{M}$  を添加した。24 時間後トリプシン処理によって接着細胞を細胞懸濁液とした。20,000 $\times g$  で 5 分間遠心することで回収した細胞を、添付文書のプロトコールに従って Cell Cycle Assay Solution Blue (Dojindo, Kumamoto, Japan)で DNA を染色し、BD LSRFortessa X-20 (BD Bioscience) を用いて DNA 含有量を解析し、DNA 含有量と細胞カウント数でヒストグラムを作成した。それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 2-2-11. アポトーシスアッセイ

MCF7 細胞または A172 細胞を 6 well plate にそれぞれ  $1\times 10^5$  cells/dish で播種した。24 時間後、MCF7 細胞には DMSO または fluorizoline 1  $\mu\text{M}$ 、A172 細胞には DMSO または fluorizoline 5  $\mu\text{M}$  を添加した。24 時間後トリプシン処理した接着細胞を遠心処理にて回収した。回収した細胞を、20,000 $\times g$  で 5 分間遠心し、添付文書のプロトコールに従って MEBCYTO Apoptosis Kit (MBL, Nagoya, Japan)を用いて Annexin V および propidium iodide (PI)で細胞を染色し、その蛍光強度でプロットした図を用いて、それぞれの陽性細胞を陰性コントロールを用いて定義し、4 分割に分析した。Annexin V-positive かつ propidium iodide (PI)-negative cells を初期アポトーシス細胞として検出した。検出には、BD LSRFortessa X-20 cell Analyzer (BD Biosciences)を用い、それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 2-2-12. 共免疫沈降法

MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞をそれぞれ 6 枚の 10 cm dish に  $5\times 10^5$  cells/dish で播種し、24 時間後に 3 枚ずつ MCF7 細胞では DMSO もしくは fluorizoline 1  $\mu\text{M}$ 、A172 細胞と PC3 細胞では DMSO もしくは fluorizoline 5  $\mu\text{M}$  を添加した。MCF7 細胞では 1 時間、A172 細胞と PC3 細胞では 6 時間培養した。トリプシン処理で細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤を添加

した 1 mL の RIPA Buffer(50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholate-Na、0.1% SDS)を加えて注射針で懸濁し、氷上で 30 分間静置した。溶解液を 4°C、15,000×g で 15 分間遠心分離し、上清に含まれるタンパク質抽出液を回収し、Input として 50 µL を別に保存した。10 µg の抗 GGCT 抗体(6-1E)またはマウスアイソタイプコントロール抗体(5415S)を 1.5 mg の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) と室温で 10 分間回転させながら反応させた。得られたタンパク質抽出液をそれぞれの抗体-ビーズ複合体に添加し、4°Cで一晩、回転させながらインキュベートした。得られた抗原-抗体-ビーズ複合体を PBS で 3 回洗浄したのち、50 µL の sample buffer(125 mM Tris-HCL、4% SDS、20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、0.04% ブロモフェノールブルー)を加えて 95°Cで 5 分間インキュベートした。得られたサンプルを前述のウエスタンブロッティング法で解析した。

#### 2-2-13. 細胞質/核タンパク質分画

MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞をそれぞれ 4 枚の 10 cm dish に  $5 \times 10^5$  cells/dish で播種し、24 時間後に 2 枚ずつ MCF7 細胞では DMSO もしくは fluorizoline 1 µM、A172 細胞と PC3 細胞では DMSO もしくは fluorizoline 5 µM を添加した。MCF7 細胞では 1 時間、A172 細胞と PC3 細胞では 6 時間培養し、トリプシン処理で細胞を回収した。LysoPure Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit (Wako) を用い、以下のようなプロトコールに従い、細胞質と核のタンパク質を分画した。PBS で洗浄した後の細胞ペレットに 100 µL の Nuclear Fractionation Buffer を加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスし、氷上で 10 分間静置した。最大速度で 10 秒間ボルテックスし、2,500×g、4°Cで 10 分間遠心分離した。上清を新しい 1.5 mL チューブへ移し、15,000×g、4°Cで 10 分間遠心分離することにより、上清に細胞質画分を得た。500 µL の Nuclear Fractionation Buffer を前述のステップで得られたペレットに加え、2,500×g、4°Cで 10 分間遠心分離し、上清を取り除いた。これを 2 回繰り返した。Nuclear Extraction Buffer を 50 µL 加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスし、氷上で 30 分間静置した。15,000×g、4°Cで 10 分間遠心分離することにより、上清に可溶性核画分を得た。500 µL の Nuclear Extraction Buffer を前述のステップで得られたペレットに加え、15,000×g、4°Cで 10 分間遠心分離し、上清を取り除いた。SDS Lysis Buffer を 50 µL 加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスし、超音波処理によってペレットを破砕した。15,000×g、4°Cで 10 分間遠心分離することにより、上清に難溶性核画分を得た。得られたサンプルを前述のウエスタンブロッティング法で解析し、細胞質画分、可溶性核画分、難溶性核画分に存在する PHB2 タンパク質および内因性コントロールタンパク質の定量解析を行った。

#### 2-2-14. 蛍光免疫染色法

MCF7 細胞を 10 cm dish に  $5 \times 10^5$  cells/dish で播種し、24 時間後に DMSO または fluorizoline 1 µM を添加した。24 時間培養した後、10%(v/v)のホルムアルデヒド in PBS を用いて、室温で 30 分間固定した。次に、0.5% triton-X 100-PBS を用いて、4°Cで 15 分間細胞膜透過処理を行った。0.1% triton-X 100、1% BSA in PBS を用いて、室温で 45 分間ブロッキングした後、一次抗体として Can Get Signal immunostain solution A (TOYOBO)中で抗 PHB2 抗体(1:50)を用い

て室温で1時間インキュベートした。二次抗体は Can Get Signal Immunostain Solution A 中で polyclonal rabbit anti-mouse Immunoglobulins FITC (Dako, Carpinteria, CA, USA) (1:800)を使用して室温で1時間インキュベートした。最後に、核を 600 nM の 4,6-Diamidino-2-phenylindole(DAPI) (Lonza Basel, Switzerland) in PBS を用いて、室温で5分間対比染色し、核内 DNA を標識した。蛍光免疫染色画像は、Eclipse Ti 共焦点顕微鏡(Nikon, Tokyo, Japan)によって撮影した。核内 PHB2 タンパク質の蛍光の定量分析には、ImageJ 1.53k software(NIH, Bethesda, MD, USA)を用いた。

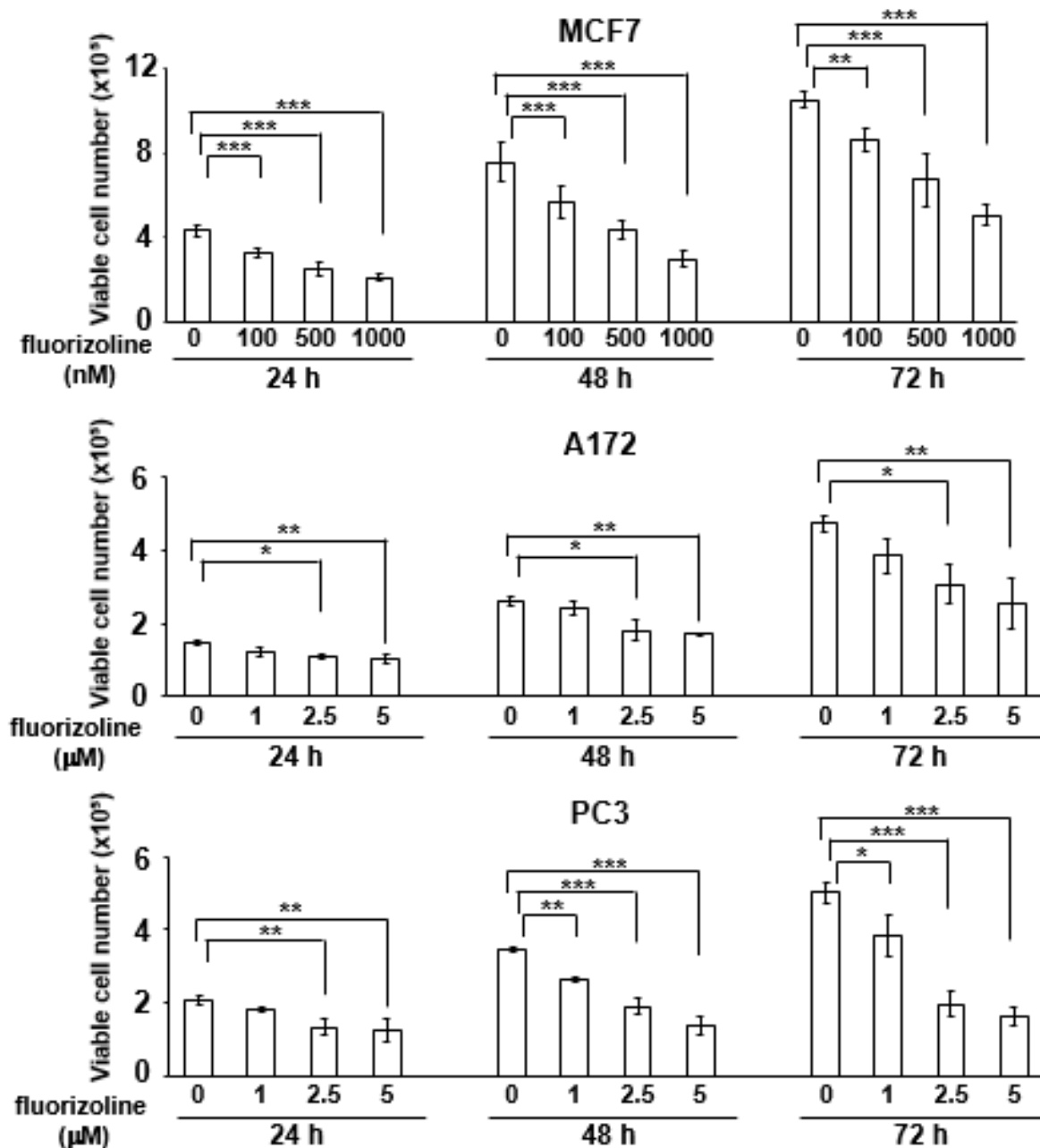
#### 2-2-15. 統計学的処理

全てのデータはそれぞれ独立した3回以上の実験を行うことにより解析した。データは平均値±標準偏差(S.D.)にて表示した。 $p$  値は、Student's t-test の両側検定、ボンフェローニ多重比較検定による一元配置分散分析、エクセル統計(Social Survey Research Information Co., Ltd. Tokyo, Japan)を用いた二元配置分散分析を行うことにより算出した。得られた  $p$  値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。 $p<0.05$  を\*、 $p<0.01$  を\*\*、 $p<0.001$  を\*\*\*と表記した。

## 2-3. 実験成績

### 2-3-1. fluorizoline によるがん細胞の増殖抑制

これまでの過去の研究により、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞において、GGCT タンパク質は PHB2 タンパク質と相互作用することが報告されている(23)。また、MCF7 細胞において GGCT をノックダウンすると、PHB2 の核内への移行が阻害され、p21 のプロモーターとの結合が抑制されることで p21 の発現が上昇し、細胞増殖が抑制されることが知られている。さらに、PHB2 を単独でノックダウンしても、p21 のプロモーターに結合する PHB2 が減少することで、p21 の発現が顕著に上昇し、細胞増殖が抑制されることが報告されている。そこで本研究では、MCF7 細胞において PHB2 に直接結合して阻害効果を示す fluorizoline に着目し、その細胞増殖に与える影響を、トリパンブルー染色法による細胞数計測を行うことにより検証した(Fig. 15)。がん細胞に対する作用の普遍性を確認するために、ヒト膠芽腫細胞株 A172 細胞とヒト前立腺がん細胞株 PC3 細胞においても、同様の実験を行った。MCF7 細胞において、fluorizoline 100 nM、500 nM、1000 nM を添加し、24 時間後、48 時間後、72 時間後にそれぞれ細胞数を計測したところ、どの時間においても fluorizoline 濃度依存的な増殖抑制が見られた。A172 細胞、PC3 細胞においても fluorizoline 1  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M を添加し、24 時間後、48 時間後、72 時間後にそれぞれ細胞数を計測したところ、fluorizoline の濃度に依存した増殖抑制が見られた。これらの結果から、fluorizoline が種々のヒトがん細胞培養株に対して増殖抑制作用を示すと考えられた。



**Figure 15. Fluorizoline inhibits proliferation.**

MCF7, A172 and PC3 cells were treated with the indicated concentrations of fluorizoline for the indicated durations.

The number of trypan blue-negative viable cells is shown. The DMSO-treated solvent control is shown as a fluorizoline concentration of 0 nM.

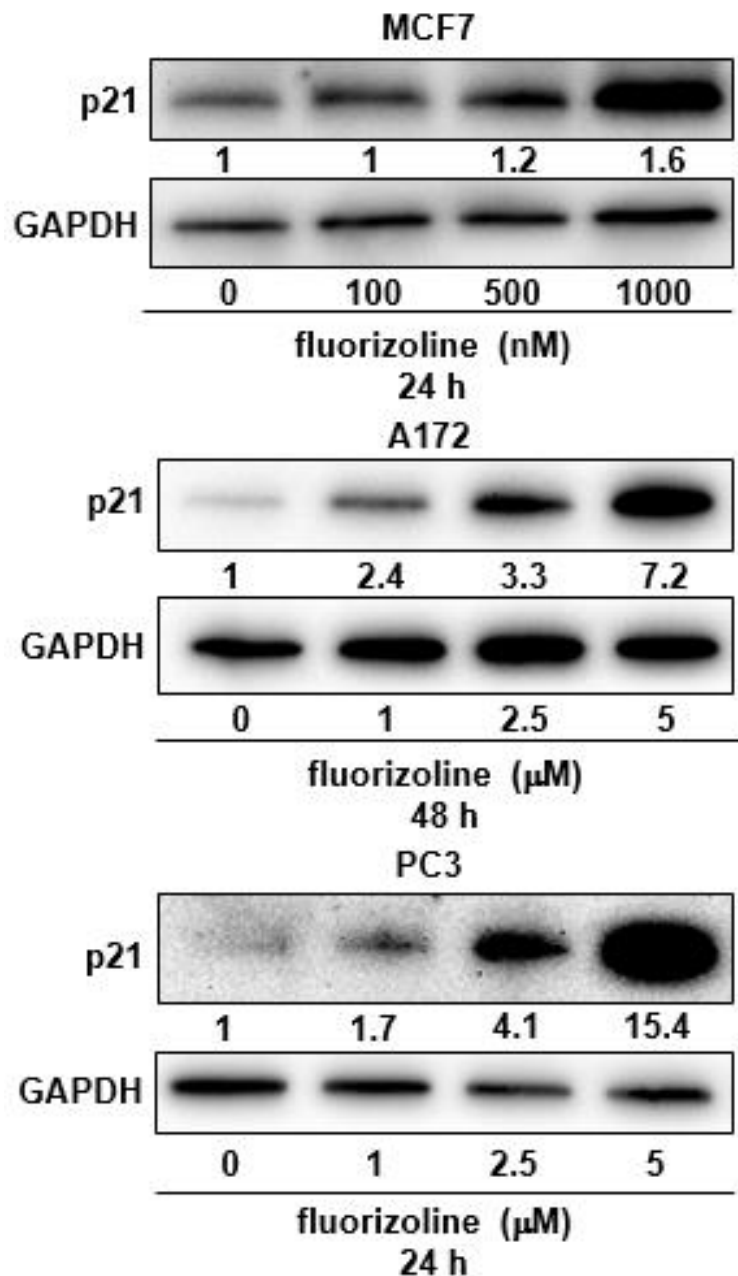
(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by one-way ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test)

This figure was cited from Fig. 1 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

### 2-3-2. fluorizoline によるがん細胞での p21 の発現上昇

これまでの過去の研究で、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞で、核内の PHB2 が p21 のプロモーターと結合することで p21 の発現を抑制すること、また p21 のプロモーターに結合する PHB2 が減少することで p21 の発現が上昇し細胞増殖が抑制されることが報告されている(23)。そこで本研究では、がん細胞において fluorizoline が p21 の発現に影響を与えるのかを検証した。MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞において、細胞数計測により増殖抑制が確認された濃度の fluorizoline をそれぞれ添加し、ウェスタンブロット法により p21 のタンパク質発現を解析した(Fig. 16)。MCF7 細胞では fluorizoline 100 nM、500 nM、1000 nM 添加後 24 時間で濃度依存的に p21 のタンパク質発現の上昇が見られた。A172 細胞、PC3 細胞でも fluorizoline 1  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M 添加後 48 時間と 24 時間でそれぞれ濃度依存的に p21 のタンパク質発現上昇が見られた。これらの結果から、fluorizoline は種々のヒトがん細胞培養株に対して p21 の発現誘導を介して細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。





**Figure 16. Fluorizoline induces p21 expression.**

MCF7, A172 and PC3 cells were treated with the indicated concentrations of fluorizoline for the indicated durations.

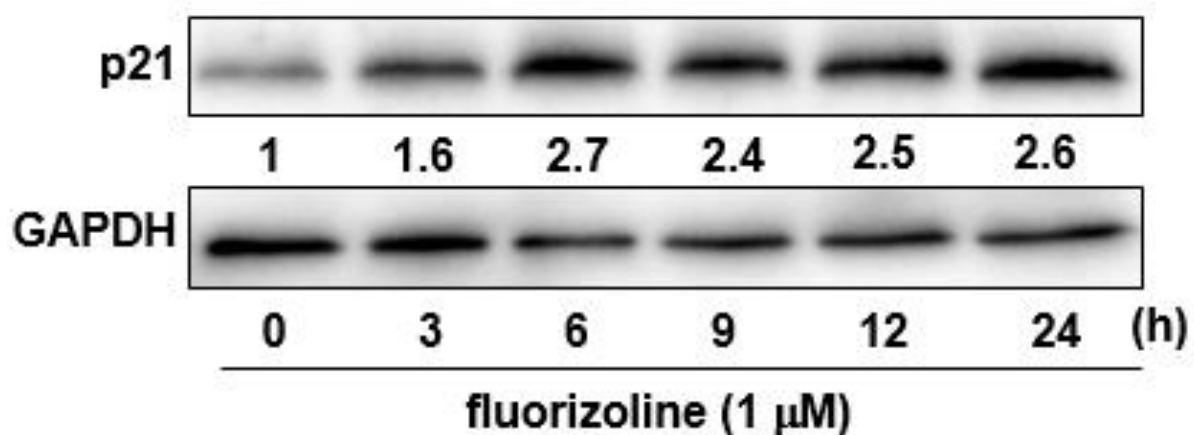
Concentration-dependent expression of p21 in MCF7, A172 and PC3 cells analyzed by Western blot analysis is shown. GAPDH is shown as a loading control.

This figure was cited from Fig. 1 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

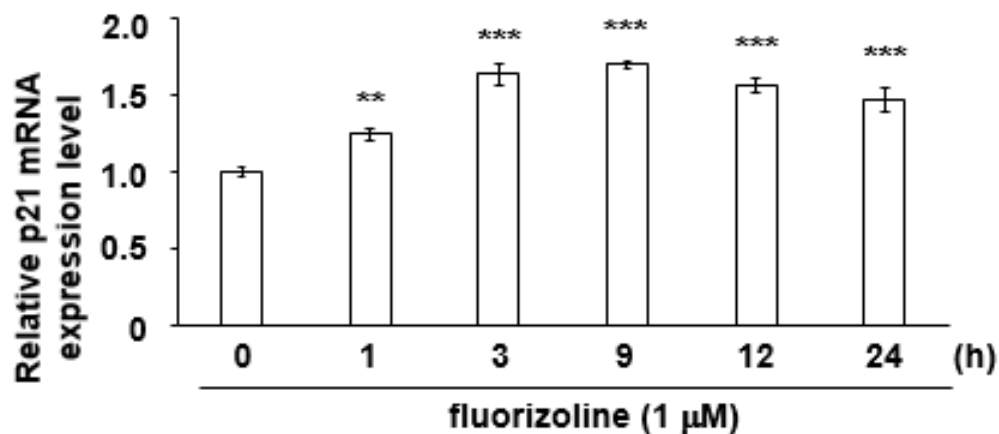
### 2-3-3. fluorizoline による乳がん細胞での短時間の p21 発現上昇

MCF7 細胞において、fluorizoline を 24 時間以内の短時間で作用させた際の p21 の発現に与える影響を解析した。MCF7 細胞に fluorizoline を 1  $\mu$ M 添加したのち 3、6、9、12、24 時間での p21 のタンパク発現上昇を、ウェスタンブロット法により検証した(Fig. 17A)。p21 のタンパク発現上昇は、fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 3 時間から起こっていることが明らかとなった。さらに、MCF7 細胞に fluorizoline を 1  $\mu$ M 添加したのち 1、3、9、12、24 時間での p21 の mRNA 発現上昇を、リアルタイム PCR 法により検証した(Fig. 17B)。fluorizoline は p21 の発現を mRNA レベルで誘導しており、fluorizoline 添加後 1 時間から p21 の mRNA の発現上昇が検出された。これらの結果から、fluorizoline が p21 の発現上昇に直接的に関与している可能性が示唆された。

A



B



**Figure 17. Fluorizoline induces p21 expression in a short time.**

A and B, The time-course of p21 protein A and mRNA B expression levels in MCF7 cells were analyzed by Western blot analysis and qRT-PCR, respectively.

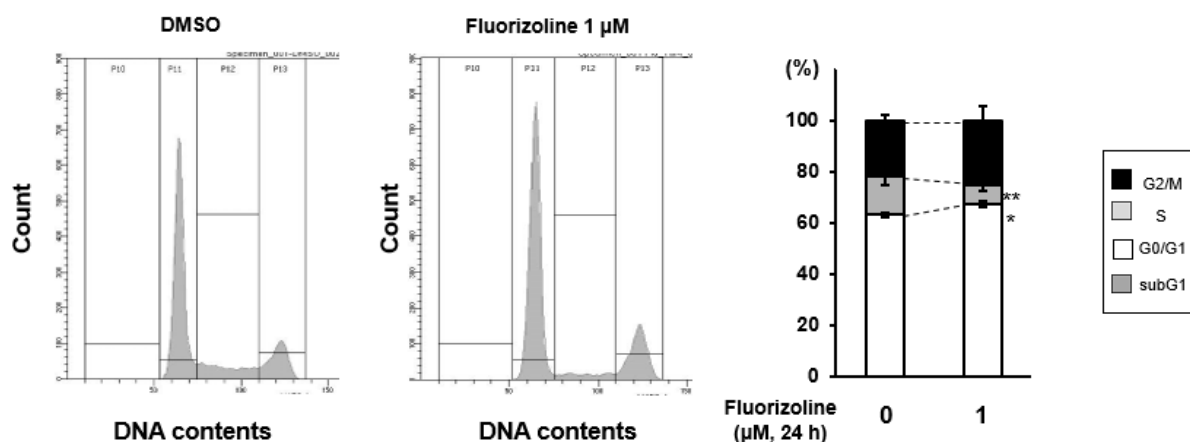
(\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by one-way ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test)

These figures were cited from Fig. 1 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

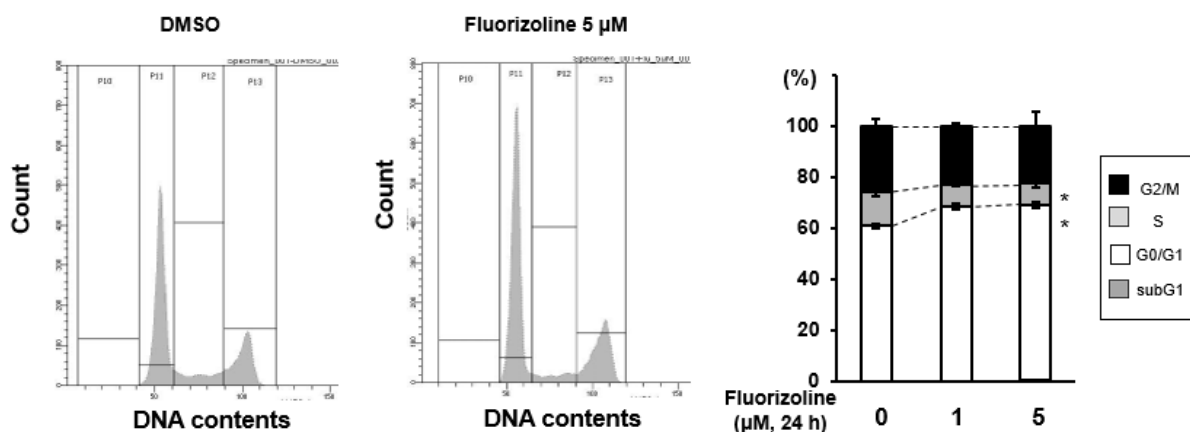
#### 2-3-4. がん細胞における fluorizoline による細胞周期停止

これまでの過去の研究で、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞で PHB2 をノックダウンすること  
で、p21 依存的に細胞の増殖が抑制することが報告されている(23)。p21 が細胞周期の制御に  
重要な因子であることから、MCF7 細胞と A172 細胞において fluorizoline の添加が細胞周期  
にも影響を与える可能性があると考え、本研究では細胞周期解析を行った(Fig. 18A,B)。MCF7  
細胞では fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 24 時間、A172 細胞では fluorizoline 5  $\mu$ M 添加後 24 時間で、  
G0/G1 期の割合の増加と S 期の割合の減少が見られた。しかし、SubG1 期の増加は認められ  
なかった。したがって、がん細胞において fluorizoline はアポトーシスの誘導はしないが、細  
胞周期の停止は誘導することが示唆された。

A



B



**Figure 18. Fluorizoline induces cell cycle arrest.**

**A**, MCF7 cells were treated with the 1  $\mu$ M fluorizoline (or DMSO control) for 24 h, and the distribution of cell cycle phases were analyzed by flow cytometry. Representative histograms and quantified distributions are shown.

**B**, A172 cells were treated with the 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M fluorizoline (or DMSO control) for 24 h, and the distribution of cell cycle phases were analyzed by flow cytometry. Representative histograms and quantified distributions are shown.

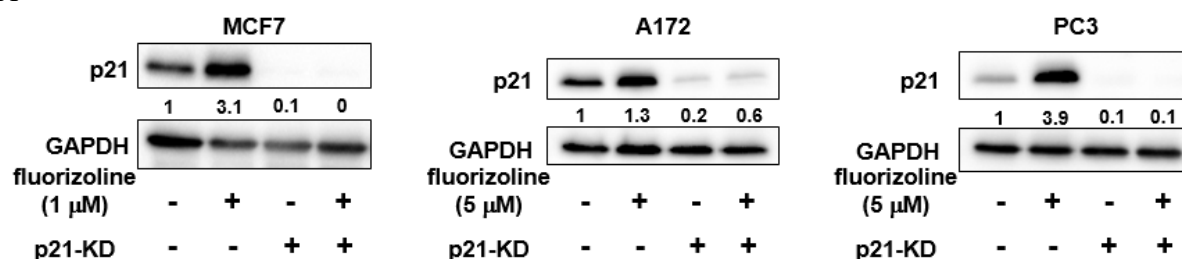
(\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 by two-tailed Student's t-test)

These figures were cited from Fig. 2 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

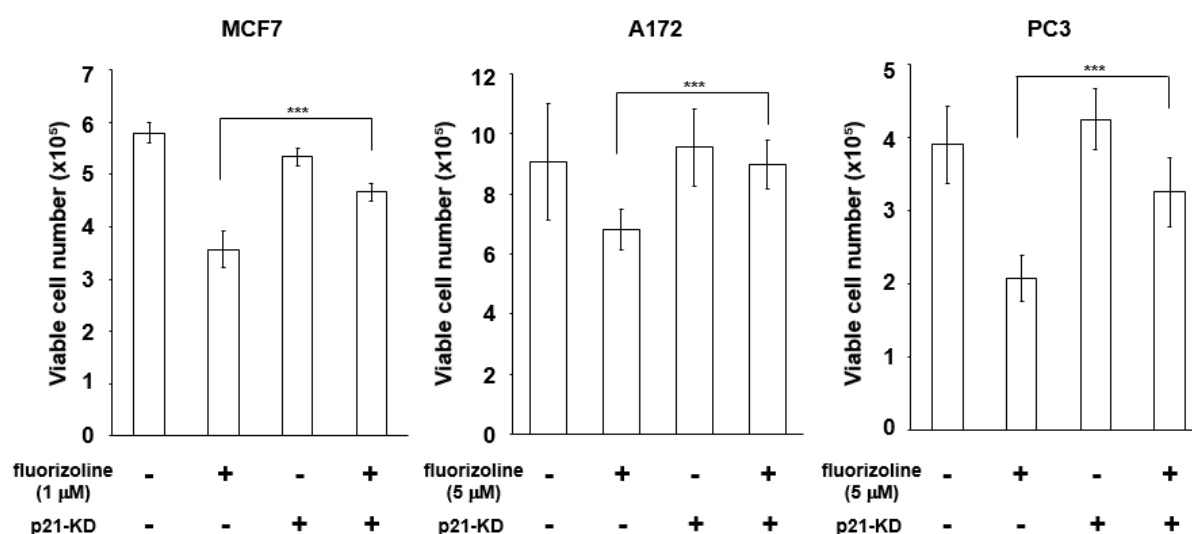
## 2-3-5. p21 ノックダウンによる fluorizoline 処理されたがん細胞の増殖回復

がん細胞において fluorizoline を添加することにより増殖が抑制されることを示したが、本研究ではこの増殖抑制が p21 の発現上昇を介して行われているのかを検証した。MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞における p21 の発現を RNA 干渉法によってノックダウンし、ウェスタンブロット法により p21 タンパク質の発現量を解析した(Fig. 19A)。fluorizoline 添加の有無に関わらず、p21 の発現が高い効率で抑制されていることを確認した。次に、p21 をノックダウンした MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞 に fluorizoline をそれぞれ 1  $\mu$ M、5  $\mu$ M、5  $\mu$ M 添加し 48 時間後にトリパンブルー染色法による細胞数計測を行った(Fig. 19B)。p21 をノックダウンした MCF7 細胞では、fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 48 時間において細胞増殖能の顕著な回復が見られた。A172 細胞、PC3 細胞でも同様の回復が見られた。これらの結果から、がん細胞における fluorizoline による増殖抑制は、p21 の誘導に依存していると考えられた。

A



B



**Figure 19. p21 knockdown restores cell proliferation suppressed by fluorizoline.**

MCF7, A172 and PC3 cells were transfected with siRNA targeting p21 or non-target control siRNA and treated with the 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M fluorizoline for 48 h.

**A**, The expression levels of p21 protein were analyzed by Western blot analysis. GAPDH is shown as a loading control.

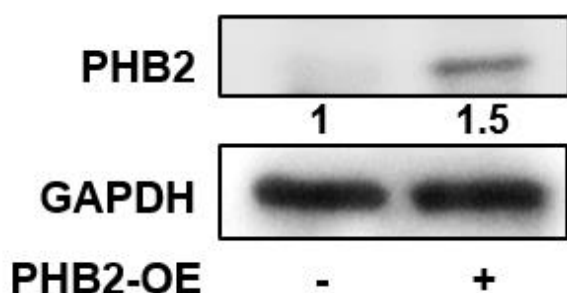
**B**, The number of trypan blue-negative viable cells is shown.

(\*\*\*p<0.001 by 2-way related-measures ANOVA)

These figures were cited from Fig. 3 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

#### 2-3-6. 乳がん細胞における PHB2 強制発現の確認

MCF7 細胞において fluorizoline による p21 の発現上昇、細胞周期停止、細胞増殖抑制に、PHB2 の阻害が実際に寄与しているかについて検証するために、PHB2 強制発現 MCF7 細胞 (PHB2-OE MCF7 細胞) を樹立した。ウエスタンブロット法により PHB2 タンパク質の発現量を解析した結果、MCF7 細胞において高い効率で PHB2 タンパク質の発現が増大していることが確認された (Fig. 20)。

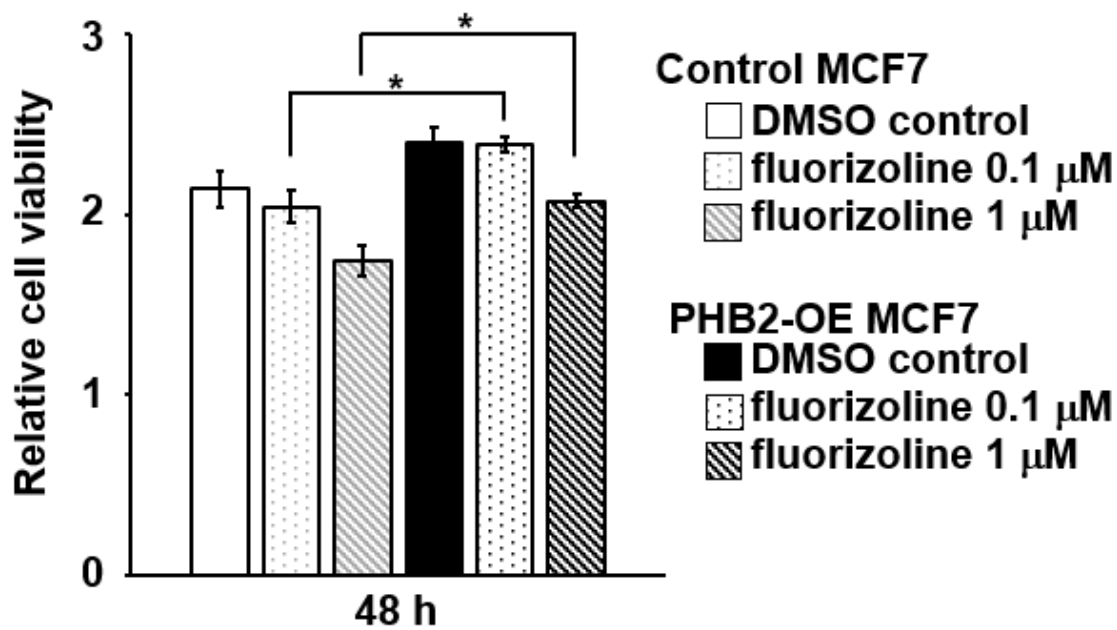


**Figure 20. Expression levels of the introduced PHB2 proteins are analyzed by Western blotting.** This figure was cited from Fig. 4 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

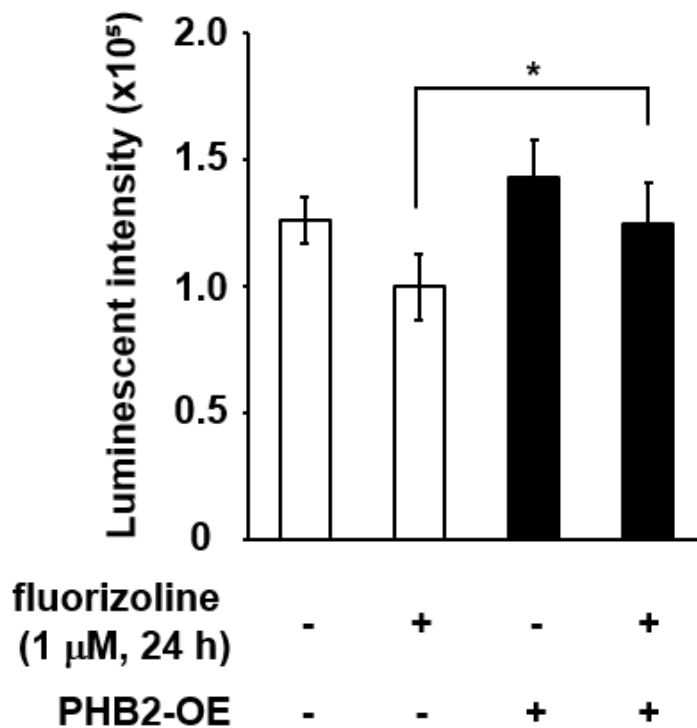
#### 2-3-7. PHB2 の強制発現による fluorizoline 処理された乳がん細胞の増殖回復

MCF 細胞において fluorizoline が細胞の増殖を抑制することを明らかにした。この増殖抑制メカニズムに fluorizoline の PHB2 への作用が関与しているのかを検証するために、PHB2-OE MCF7 細胞を用いた実験を行った。本研究では PHB2-OE MCF7 細胞によって fluorizoline による細胞増殖抑制が阻害されるのかを、WST-8 アッセイによって解析した(Fig. 21A)。control MCF7 細胞では fluorizoline 0.1  $\mu$ M と 1  $\mu$ M 添加後 48 時間で増殖抑制が見られたが、PHB2-OE MCF7 細胞ではこの増殖抑制が阻害されることが明らかとなった。PHB2-OE MCF7 細胞によって fluorizoline による細胞増殖抑制が阻害されるのかを、CellTiter-Glo アッセイによっても解析した(Fig. 21B)。control MCF7 細胞では fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 24 時間で増殖が抑制されたが、PHB2-OE MCF7 細胞では、部分的ではあるものの有意な増殖能の回復が観察された。これらの結果から、fluorizoline による MCF7 細胞の増殖抑制効果は、PHB2 の阻害に由来するものであることが示唆された。

A



B



**Figure 21. PHB2 plays a crucial role in regulating cell growth induced by fluorizoline treatment.**

**A**, The relative cell viability of control and PHB2-OE MCF7 cells treated with 0.1 or 1  $\mu\text{M}$  fluorizoline (or DMSO control) was analyzed by a WST-8 cell viability assay.

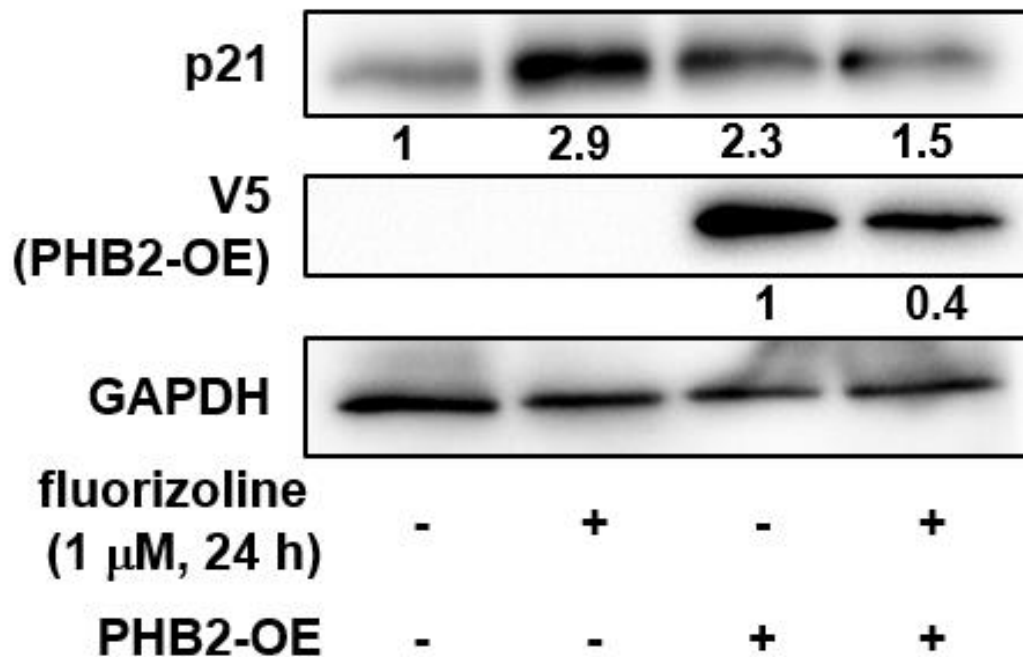
**B**, The relative cell viability of control and PHB2-OE MCF7 cells treated with 1  $\mu\text{M}$  fluorizoline for 24 h was analyzed by CellTiter-Glo 2.0 luminescent cell viability assay.

(\* $p < 0.05$  by 2-way related-measures ANOVA)

These figures were cited from Fig. 4 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

#### 2-3-8. PHB2 の強制発現による fluorizoline 処理された乳がん細胞の p21 の発現抑制

MCF 細胞において fluorizoline が p21 の発現を上昇させることから、PHB2-OE MCF7 細胞において fluorizoline による p21 の発現上昇が PHB2 強制発現によって阻害されるのかを、ウェスタンブロット法により解析した(Fig. 22)。control MCF7 細胞では fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 24 時間で p21 の発現が上昇したが、PHB2-OE MCF7 細胞では p21 の発現上昇の抑制が見られた。この結果から、fluorizoline は PHB2 の働きの調節を介して p21 の発現上昇と細胞増殖抑制を引き起こしていると考えられた。



**Figure 22. PHB2 plays a crucial role in regulating changes in p21 expression induced by fluorizoline treatment.**

Western blot analysis of p21, V5 tag (linked to the C-terminus of overexpressed PHB2), and GAPDH in MCF7 cells 24 h after treatment with 1  $\mu$ M fluorizoline. GAPDH is shown as a loading control.

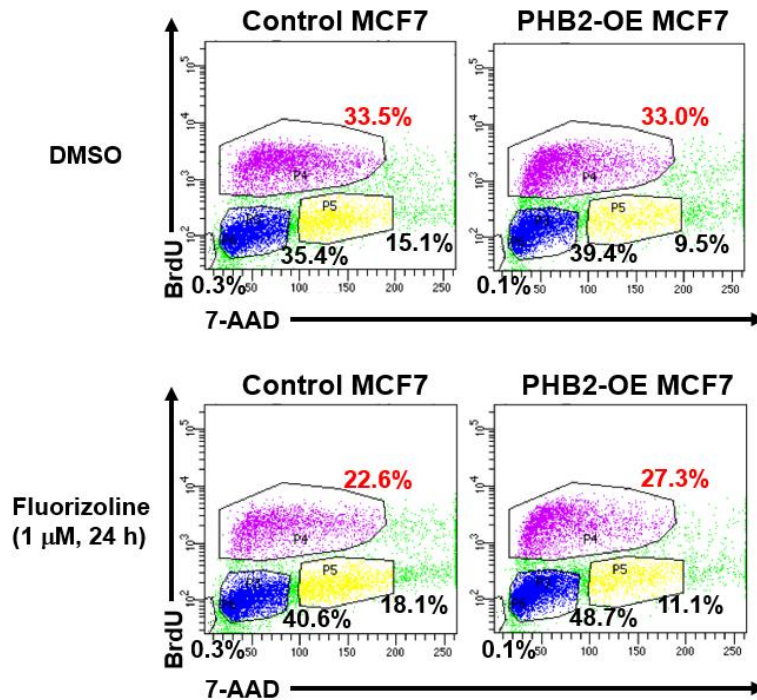
This figure was cited from Fig. 4 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.



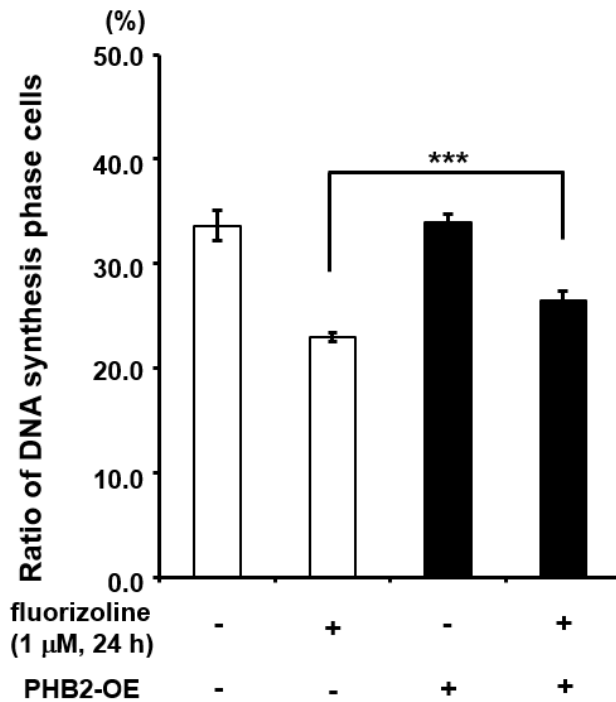
#### 2-3-9. PHB2 の強制発現による fluorizoline 処理された乳がん細胞の細胞周期回復

ヒト乳がん MCF7 細胞に対し fluorizoline を作用させると、p21 発現誘導に依存した細胞増殖抑制効果を発揮することを明らかにした。誘導される p21 は、細胞周期の調節因子であり、G0/G1 から S 期への進行を抑制する因子として機能することが知られている。そこで、MCF7 細胞に対して fluorizoline 処理が、G0/G1 期における細胞周期の停止を引き起こすのか、またさらに、fluorizoline による細胞周期の停止が PHB2-OE MCF7 細胞では阻害されるのかを BrdU 細胞増殖アッセイによって解析した(Fig. 23A,B)。その結果、control MCF7 細胞では fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 24 時間で S 期の細胞の割合の顕著な減少が見られたが、PHB2-OE MCF7 細胞ではこの減少が有意に抑えられた。すなわち、MCF 細胞において fluorizoline 添加により G0/G1 期の割合が増加し S 期の割合が減少することで、細胞周期の停止が誘導されることが明らかとなった。また、これらの結果は、p21 の発現誘導を抑制することが示された PHB2 の強制発現によって、抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、fluorizoline による細胞増殖抑制には PHB2 の働き調節を介した p21 の発現上昇による細胞周期の進行の阻害が関与していると考えられた。

A



B



**Figure 23. Fluorizoline-induced blockade of cell cycle progression is mediated by PHB2.**

**A**, The fraction of control or PHB2-overexpressing (PHB2-OE) MCF7 cells in S-phase was measured by BrdU incorporation. PHB2-OE MCF7 cells treated with 1 μM fluorizoline for 24 h were measured by flow cytometry.

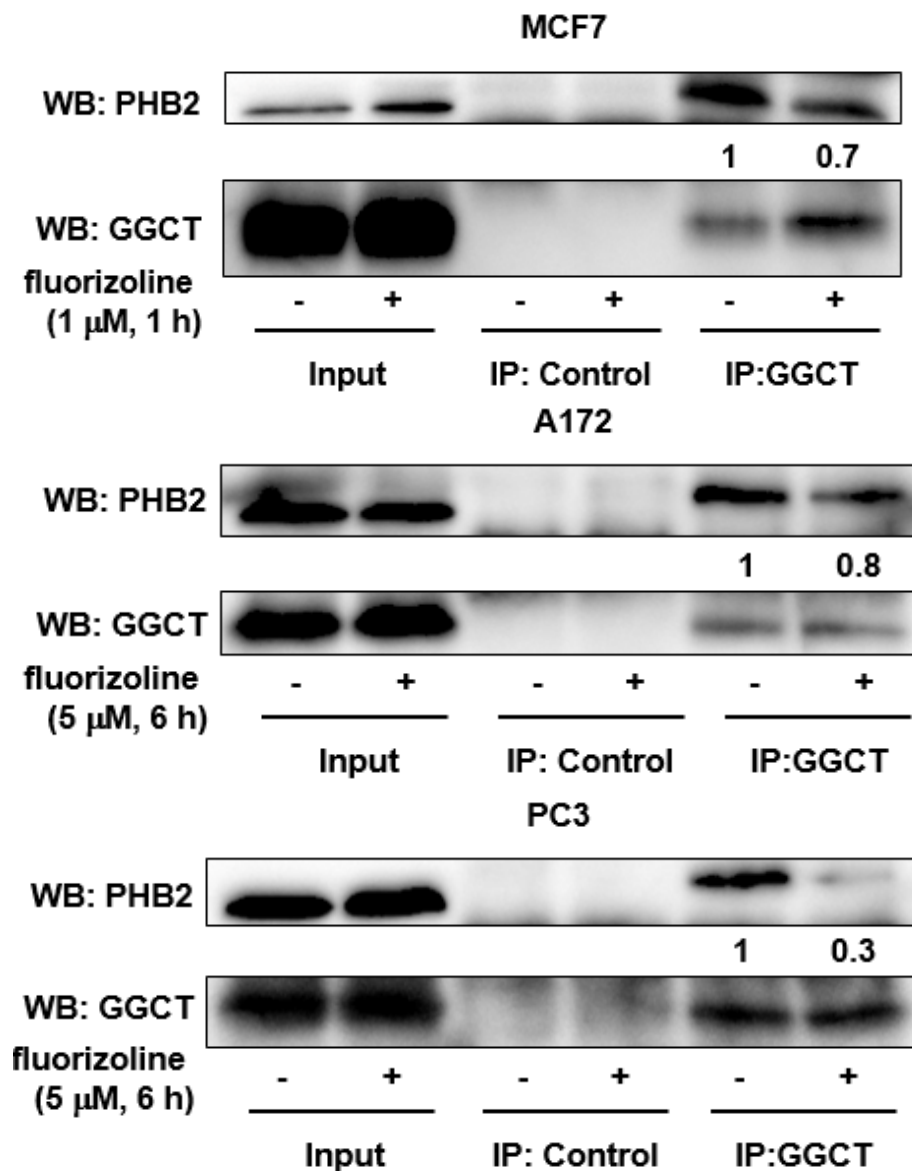
**B**, Quantitative analyses of the proportion of cells in S-phase.

(\*\*\*p < 0.001 by 2-way related-measures ANOVA)

These figures were cited from Fig. 5 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

#### 2-3-10. がん細胞における fluorizoline の PHB2 と GGCT との相互作用に与える影響

これまでの過去の研究で、酵母ツーハイブリット法と共免疫沈降法によって、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞において GGCT と相互作用するタンパク質として PHB2 が発見された(23)。そこで本研究では、MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞において PHB 阻害剤である fluorizoline が、PHB2 の GGCT との結合に変化を与えるのかを免疫沈降法によって検証した(Fig. 24)。その結果、MCF7 細胞に fluorizoline 1  $\mu$ M を添加後 1 時間で免疫沈降を行ったところ、GGCT に結合する PHB2 タンパク質量の減少が見られた。A172 細胞と PC3 細胞においても、fluorizoline 5  $\mu$ M を添加後 6 時間において GGCT に結合する PHB2 タンパク質量の減少が見られた。これらの結果は、fluorizoline による PHB2 の阻害は、PHB2 タンパク質と GGCT タンパク質との間の相互作用を阻害することが明らかとなった。



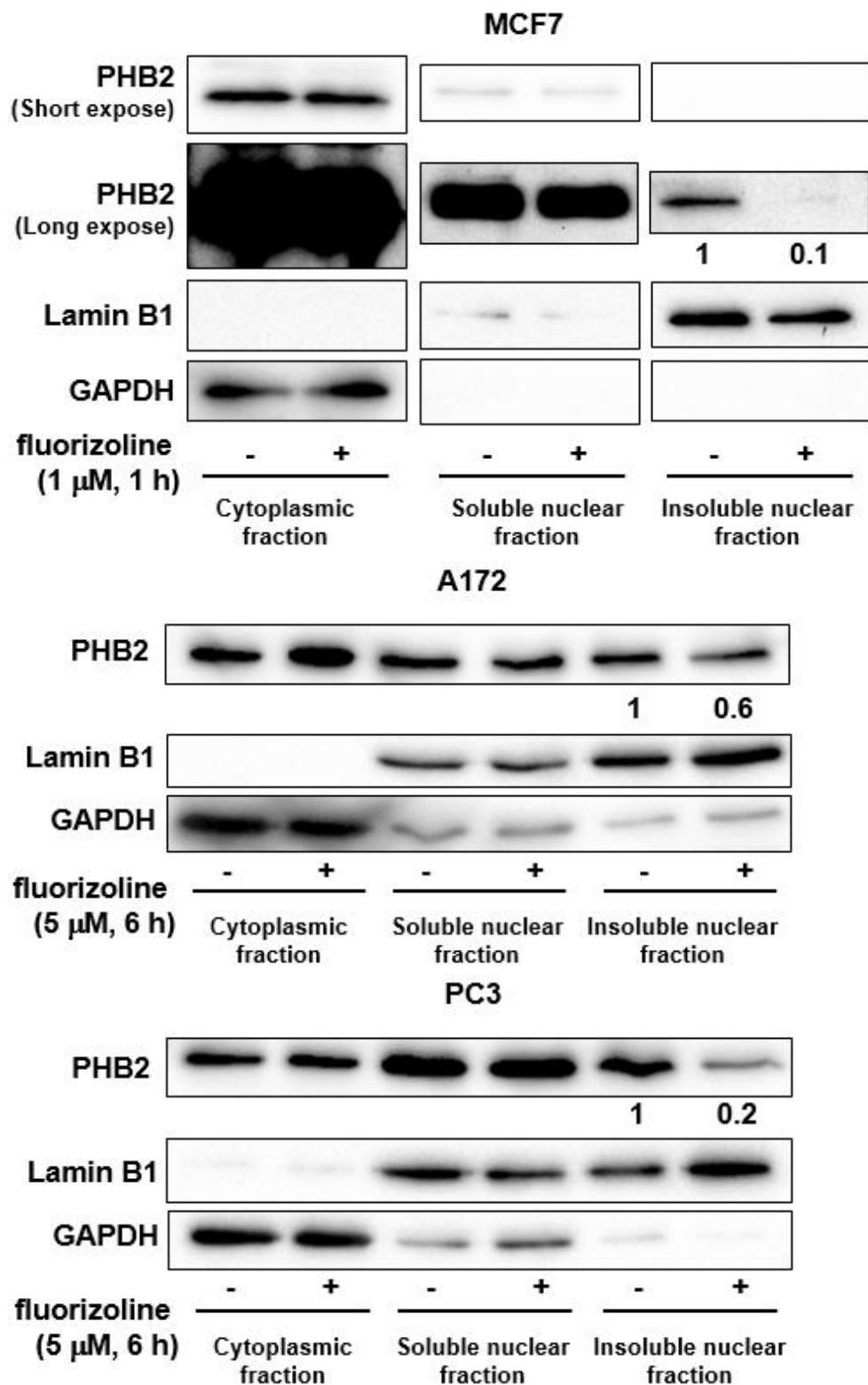
**Figure 24. Fluorizoline blocks the interaction between PHB2 and GGCT.**

MCF7, A172 and PC3 cells were treated with fluorizoline at the indicated concentrations for the indicated durations. Endogenous GGCT proteins were immunoprecipitated (IP) from cell extracts using mouse anti-GGCT monoclonal or isotype control antibodies. PHB2 and GGCT proteins in the precipitated samples (and lysate input) were analyzed by Western blotting (WB).

This figure was cited from Fig. 6 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

#### 2-3-11. がん細胞における fluorizoline の PHB2 細胞内局在に与える影響

これまでの過去の研究において、ヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞において、PHB2 は細胞質内で GGCT と相互作用することによって、PHB2 タンパク質の細胞質から核への移行を促進されているという報告がある(23)。そこで本研究では、PHB 阻害剤である fluorizoline が PHB2 の細胞内での局在に影響を与えるかについて検証した。MCF7 細胞、A172 細胞、PC3 細胞において fluorizoline 添加後、核抽出により細胞質、可溶性核画分、難溶性核画分のサンプルを調製し、ウエスタンブロット法にて解析を行った(Fig. 25)。MCF7 細胞に fluorizoline 1  $\mu$ M を添加後 1 時間で核抽出したところ、難溶性核画分における PHB2 タンパク質量の減少が見られた。A172 細胞と PC3 細胞においても、fluorizoline 5  $\mu$ M を添加後 6 時間で核抽出したところ、難溶性核画分における PHB2 タンパク質量の減少が見られた。これらの結果から、fluorizoline は PHB2 と結合することによって PHB2 が GGCT と相互作用するのを阻害し、GGCT との結合を阻害された PHB2 タンパク質は核内へ移行できなくなるため、難溶性核画分に存在する PHB2 タンパク質の量が減少すると考えられた。



**Figure 25. Fluorizoline decreases PHB2 protein levels in the nuclear fraction.**

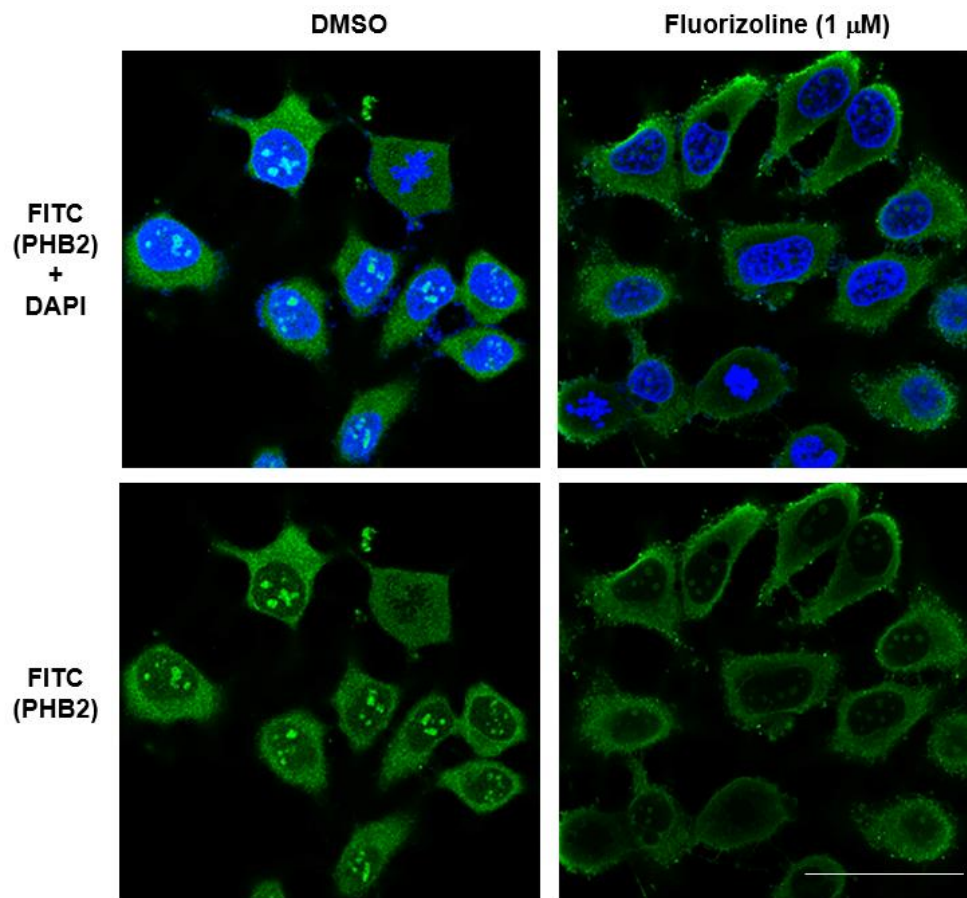
The proteins were fractionated into cytoplasmic, soluble nuclear, and insoluble nuclear components and were analyzed by WB. Lamin B1 and GAPDH are shown as loading controls.

This figure was cited from Fig. 6 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

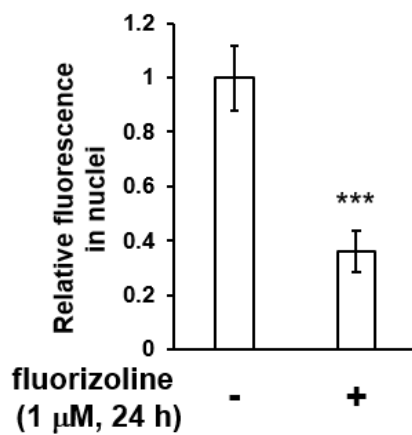
#### 2-3-12. 乳がん細胞における fluorizoline による核内 PHB2 の減少

MCF7 細胞において fluorizoline が PHB2 タンパク質の細胞内局在に与える影響を、ウェスタンブロット法だけではなく、蛍光免疫染色法によっても解析を行った (Fig. 26A,B)。fluorizoline 1  $\mu$ M 添加後 24 時間で蛍光免疫染色を行ったところ、核に局在する PHB2 タンパク質量の減少が観察された。この結果からも、fluorizoline は MCF7 細胞において PHB2 の核への移行を阻害すると考えられた。

A



B



**Figure 26. Fluorizoline reduces the nuclear localization of PHB2.**

**A**, MCF7 cells were treated with 1  $\mu$ M fluorizoline for 24 h. Immunofluorescent analysis was performed using anti-PHB2 (green) antibody and DAPI (blue). Scale bar: 50  $\mu$ m.

**B**, Quantified analysis of fluorescent signal of PHB2 in nuclei are shown.

(\*\*\* $p$ <0.001 by two-tailed Student's t-test)

These figures were cited from Fig. 7 in Takagi H et al. *Mol. Pharmacol.* **2022**, 101, 78-86.

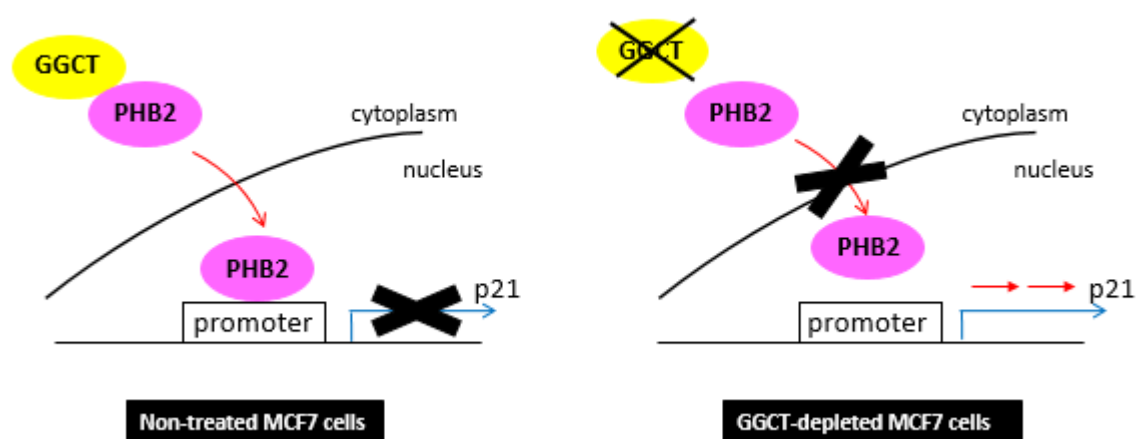


## 2-4. 考察

本章では、PHB 阻害剤 fluorizoline のヒト乳がん MCF7 細胞に対する増殖抑制効果のメカニズムに関する解析を行い、CDK inhibitor の一種である p21 の発現上昇を介した細胞周期停止効果を示すことを明らかにした。さらに、fluorizoline は、GGCT タンパク質と PHB2 タンパク質の相互作用を阻害し、PHB2 タンパク質の核内局在を阻害することを発見した。

乳がんは世界で新たに診断されるがんのうち女性で最も多く、日本でも女性で最も罹患数が多いがんであり、再発性あるいは転移性乳がんの予後はいまだ不良であり、乳がんに対する新たな治療法を確立する必要がある(81)。

$\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)は、乳がん組織を含む様々ながん組織で高発現している(79,80)。過去の研究において、MCF7 細胞において GGCT をノックダウンすると p21 の発現上昇による細胞周期停止と、それに続く細胞老化の誘導による増殖抑制が引き起こされることが報告されている(21)。我々の研究グループの以前の研究で、GGCT が相互作用する新規のタンパク質として PHB2 を見出し、GGCT と PHB2 の相互作用により、PHB2 タンパク質の核内への移行を促進することが明らかとなった(23)。GGCT との結合による PHB2 の核内移行メカニズムについては未だに解明されていないが、GGCT により PHB2 のリン酸化等の翻訳後修飾が起きることで核移行が制御されている可能性が考えられる。PHB2 は核内で p21 遺伝子のプロモーターと結合し、p21 の発現を抑制する転写抑制性制御因子として機能することも示されている。すなわち、GGCT をノックダウンすると、PHB2 の核内への移行が阻害されることで p21 の発現が上昇する(Fig. 27)。



**Figure 27. Depletion of GGCT upregulates p21 expression by inhibiting PHB2 binding to p21 promoter.**

PHB はミトコンドリア、核、細胞膜などに広く分布し様々な機能を担っている。PHB は細胞増殖を制御する機能を有する(34,35,37,38,39,40)。以上の事実から、PHB が抗がん剤の新規分子標的の候補になるのではないかと仮説に基づき、PHB を標的とするいくつかの低分子が合成されている(86)。その一つとして fluorizoline が挙げられる。fluorizoline はトリフルオロチアゾリン類似体であり、PHB と結合してがん細胞に対して抗増殖効果を示すという報告

がある(45)。しかし、fluorizoline の抗増殖効果のメカニズムには、不明な点が多く残されている。そこで本研究では、がん細胞における fluorizoline の PHB2 と GGCT の結合や p21 の発現に与える影響を検証した。

まず、MCF7 細胞に対し fluorizoline を添加すると、濃度依存的な生細胞数の減少と p21 タンパク質の発現が上昇することを見出した(Fig. 15, 16)。同様の実験で、他のヒトのがん種の培養細胞モデルである、ヒト膠芽腫 A172 細胞とヒト前立腺がん PC3 細胞においても、fluorizoline による生細胞数の減少と p21 タンパク質の発現上昇を認めた。mRNA レベルでの解析においては、MCF7 細胞に対し fluorizoline 処理は、1 時間という短時間から p21 の mRNA 発現上昇を有意に誘導し、3 時間でピークに近い誘導効果を示すことから、fluorizoline が p21 発現に直接的に影響する可能性が示唆された(Fig. 17)。また、fluorizoline 処理による p21 誘導効果と合致して、MCF7 細胞において fluorizoline による処理は、有意な細胞周期の停止を誘導した(Fig. 18)。さらに、fluorizoline によって誘導される p21 を RNA 干渉法によって阻害すると、fluorizoline による細胞増殖抑制効果が阻害された(Fig. 19)。この結果は、fluorizoline 処理による細胞増殖抑制効果は、p21 発現の誘導効果を介していることを示している。

次に、fluorizoline による増殖抑制効果が、PHB2 の機能の阻害を介して引き起こされているのかについて解析するために、PHB2 を強制発現し、PHB2 の機能を高めた MCF7 細胞を作製し、fluorizoline による増殖抑制効果について比較解析を行った(Fig. 20)。その結果、PHB2 強制発現により、fluorizoline 1  $\mu$ M 処理された細胞増殖能に、部分的ながら有意な回復が見られた(Fig. 21)。さらに、fluorizoline による p21 の発現上昇効果が阻害された(Fig. 22)。細胞周期の解析も行ったところ、fluorizoline によって DNA 合成期である S 期の割合が減少したが、PHB2 強制発現により S 期の割合の回復が見られた(Fig. 23)。これらの結果は、PHB2 強制発現によって、PHB2 の機能を亢進させると、fluorizoline による効果が減弱することを示しており、fluorizoline による細胞増殖抑制効果は、PHB2 機能の阻害を介していることを示唆していると考えられる。しかし、fluorizoline による p21 の発現上昇は PHB2 を強制発現することで、ほぼ完全に阻害された一方で、細胞増殖と細胞周期の回復は部分的であった。これは、fluorizoline が PHB2 のその他の経路にも影響を与えている可能性や、PHB1 に対しても作用している可能性を示唆している(87)。

また、fluorizoline を MCF7 細胞、A172 細胞および PC3 細胞に作用させると、内因性 PHB2 タンパク質と GGCT タンパク質との相互作用が阻害されることを、免疫沈降法によって明らかにした(Fig. 24)。さらに、核内タンパク質の分画法とウエスタンブロット法を用いて、fluorizoline を MCF7 細胞、A172 細胞および PC3 細胞に作用させると、内在性 PHB2 タンパク質の核内局在が減少することを明らかにした(Fig. 25)。MCF7 細胞においては蛍光免疫染色法でも fluorizoline による PHB2 タンパク質の核内局在の減少が見られた(Fig. 26)。これらの結果は、PHB2 タンパク質が p21 遺伝子の転写を抑制的に制御する因子であることに合致しており、fluorizoline は、PHB2 をターゲットとすることで p21 の発現を上昇させ、細胞周期の停止を誘導して細胞増殖を抑制している可能性を示唆している。この fluorizoline による GGCT と PHB2 の相互作用の阻害に伴って、PHB2 タンパク質の局在を制御するメカニズムは依然として不明である。fluorizoline が PHB2 の GGCT との結合部に直接結合する可能性や PHB2 タン

パク質の翻訳後修飾に変化を与える可能性等が考えられる。さらに fluorizoline が GGCT 以外の PHB2 結合タンパク質との相互作用に影響を与えていることも考えられる。これらのメカニズムの解明は今後の検討課題である。

以上の結果から、fluorizoline による GGCT と PHB2 の相互作用の阻害は、p21 発現誘導を介してがん細胞の増殖を抑制するために、有用である可能性が示唆された。すなわち、本研究は fluorizoline の作用機序の解明と、GGCT タンパク質と PHB2 タンパク質の相互作用を標的とした、新規がん治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

## 総括

GGCT は多様ながん組織に高発現するタンパク質であり、GGCT の高発現が予後不良にもつながることから、有望な新規治療標的分子と考えられてきた。GGCT の発現抑制は、複数の種類のがん細胞で細胞増殖を抑制することが報告されている。そこで、GGCT の機能を低分子化合物を用いて阻害することによって見出されたがん細胞における増殖抑制効果のメカニズムを明らかにすることを、本研究全体を通した目的とした。

まず第 1 章では、前立腺がんに対する治療効果を高める戦略の開発を目指し、ヒト前立腺がん PC3 細胞を用いて、GGCT の酵素活性を阻害する pro-GA と、既存の抗がん剤ドセタキセルとの併用による作用増強効果について検証した。まず、ヒト前立腺がん PC3 細胞における GGCT のノックダウンは、アポトーシス以外の機序で細胞増殖を抑制していることを明らかにした。次に、GGCT 阻害剤である pro-GA を作用させると、PC3 細胞に、細胞老化現象と細胞増殖抑制を引き起こすことを示した。さらに、ヒト前立腺がん PC3 細胞および LNCaP 細胞に対し、アポトーシスを誘導する既存の抗悪性腫瘍薬であるドセタキセルと pro-GA を組み合わせると、それぞれ単独よりも増殖抑制効果が有意に増強することを明らかにした。以上の結果から、GGCT の阻害は前立腺がん細胞に対するドセタキセルの効果を増強するために有用である可能性が示唆された。

次に第 2 章ではさらに別の角度から GGCT 機能を阻害するために、以前の研究によりヒト乳がん MCF7 細胞において GGCT のノックダウンによって核内 PHB2 減少を介した p21 の発現上昇が引き起こされることが明らかとなっていたことから、PHB 阻害剤である fluorizoline に着目した。この fluorizoline による GGCT と PHB2 の相互作用の阻害は、p21 の発現上昇と細胞周期停止を介した増殖抑制効果を発揮することを明らかにした。また、MCF7 細胞のみならず、第 1 章と共通させてヒト前立腺がん PC3 細胞およびヒト膠芽腫 A172 細胞においても、fluorizoline によって p21 の誘導と増殖の抑制が引き起こされることが明らかにした。さらに、fluorizoline 処理によって PHB2 タンパク質と GGCT タンパク質との相互作用が阻害され、PHB2 タンパク質の核内局在の減少が誘導されることを明らかにした。以上の結果から、fluorizoline による GGCT と PHB2 の相互作用の阻害は、p21 発現誘導を介してがん細胞の増殖を抑制するために、有用である可能性が示唆された。

本研究の成果は、GGCT 阻害剤である pro-GA と PHB 阻害剤である fluorizoline の GGCT 機能の阻害に関連した作用機序の一端を明らかにし、GGCT および GGCT-PHB2 相互作用を治療標的とすることにより、がん細胞の制御されない無秩序な増殖を阻害するための、新しい治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導を賜りました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 中田 晋 准教授に深甚なる謝意を表します。実験技術から論文作成に至るまで、研究に必要なあらゆるスキル習得のために御指導、御鞭撻を頂戴いたしましたこと、深く感謝申し上げます。

また、本論文の査読を賜りました本学 臨床薬学分野 西口 工司 教授ならびに細胞生物学分野 藤室 雅弘 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に御尽力頂きました京都府立医科大学大学院 創薬医学分野 谷口 恵香 助教ならびに本学 臨床腫瘍学分野 大学院生 茂山 千愛美 学士、安藤 翔太 学士に感謝の意を表します。そして、円滑な研究室運営を賜りました本学 臨床腫瘍学分野 飯居 宏美 助教に厚く御礼申し上げます。実験に御協力頂きました安藤 孝太氏、松田 凌平氏、遠藤 百華氏をはじめとした臨床腫瘍学分野の学部学生の皆様に御礼申し上げます。

最後に、大学院生活を送るうえで様々な支援をして下さった皆様に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Wakabayashi Y, Okada Y, Kontani K, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Yoshiki T. Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clin. Chem.* **2004**, 50, 857-66.
- 2) Kageyama S, Iwaki H, Inoue H, Isono T, Yuasa T, Nogawa M, Maekawa T, Ueda M, Kajita Y, Ogawa O, Toguchida J, Yoshiki T. A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin. Appl.* **2007**, 1, 192-9.
- 3) Oakley AJ, Yamada T, Liu D, Coggan M, Clark AG, Board PG. The identification and structural characterization of C7orf24 as  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase. An essential enzyme in the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 22031-42.
- 4) Azumi K, Ikeda Y, Takeuchi T, Nomura T, Sabau SV, Hamada J, Okada F, Hosokawa M, Yokosawa H. Localization and characterization of  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase in cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **2009**, 2, 385-91.
- 5) Gromov P, Gromova I, Friis E, Timmermans-Wielenga V, Rank F, Simon R, Sauter G, Moreira JMA. Proteomic profiling of mammary carcinomas identifies C7orf24, a  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase, as a potential cancer biomarker. *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 3941-53.
- 6) Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG.  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Hum. Pathol.* **2014**, 45, 331-41.
- 7) Li Y, Wu T, Wang Y, Yang L, Hu C, Chen L, Wu S.  $\gamma$ -Glutamyl cyclotransferase contributes to tumor progression in high grade serous ovarian cancer by regulating epithelial-mesenchymal transition via activating PI3K/AKT/mTOR pathway. *Gynecol. Oncol.* **2018**, 149, 163-72.
- 8) Jiang Z, Zhang C, Gan L, Jia Y, Xiong Y, Chen Y, Wang Z, Wang L, Luo H, Li J, Zhu R, Ji X, Yu Q, Wang L. iTRAQ-Based Quantitative Proteomics Approach Identifies Novel Diagnostic Biomarkers That Were Essential for Glutamine Metabolism and Redox Homeostasis for Gastric Cancer. *Proteomics Clin. Appl.* **2019**, 13, e1800038.
- 9) Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, Ishibe T, Aoyama T, Kageyama S, Iwaki H, Nakamura T, Iida H, Yoshiki T, Toguchida J. Involvement of cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma. *Anticancer Res.* **2011**, 31, 1297-305.

- 10) Shen SH, Yu N, Liu XY, Tan GW, Wang ZX. Gamma-glutamylcyclotransferase promotes the growth of human glioma cells by activating Notch-Akt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 471, 616-20.
- 11) He Z, Wang S, Shao Y, Zhang J, Wu X, Chen Y, Hu J, Zhang F, Liu Ras Downstream Effector GGCT Alleviates Oncogenic Stress. *iScience.* **2019**, 19, 256-66.
- 12) Ohno Y, Hattori A, Yoshiki T, Kakeya H. Association of epigenetic alterations in the human C7orf24 gene with the aberrant gene expression in malignant cells. *J. Biochem.* **2013**, 154, 355-62.
- 13) Ohno Y, Hattori A, Ueda M, Kageyama S, Yoshiki T, Kakeya H. Multiple NF-Y-binding CCAAT boxes are essential for transcriptional regulation of the human C7orf24 gene, a novel tumor-associated gene. *FEBS J.* **2011**, 278, 4088-99.
- 14) Jia C, Gao J, Wang L, Li Z, Dong Z, Yao L, Yao X. miR-877 inhibits the proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cells by targeting gamma-glutamylcyclotransferase. *Endocr. J.* **2021**.
- 15) Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* **2004**, 134, 489-92.
- 16) Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013, 972913.
- 17) Taniguchi K, Kageyama S, Moyama C, Ando S, Ii H, Ashihara E, Horinaka M, Sakai T, Kubota S, Kawauchi A, Nakata S.  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase, a novel regulator of HIF-1 $\alpha$  expression, triggers aerobic glycolysis. *Cancer Gene Ther.* **2021**.
- 18) Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, Ishibe T, Aoyama T, Kageyama S, Iwaki H, Nakamura T, Iida H, Yoshiki T, Toguchida J. Involvement of cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma. *Anticancer Res.* **2011**, 31, 1297-305.
- 19) Lin Z, Xiong L, Zhou J, Wang J, Li Z, Hu H, Lin Q.  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase Knockdown Inhibits Growth of Lung Cancer Cells Through G0/G1 Phase Arrest. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2015**, 30, 211-6.
- 20) Habermann KJ, Grünewald L, Wijk S van, Fulda S. Targeting redox homeostasis in

rhabdomyosarcoma cells: GSH-depleting agents enhance auranofin-induced cell death. *Cell Death Dis.* **2017**, 8, e3067.

- 21) Matsumura K, Nakata S, Taniguchi K, Ii H, Ashihara E, Kageyama S, Kawauchi A, Yoshiki T. Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits breast cancer cell growth via cellular senescence induction mediated by CDK inhibitor upregulation. *BMC Cancer.* **2016**, 16, 748.
- 22) Taniguchi K, Matsumura K, Ii H, Kageyama S, Ashihara E, Chano T, Kawauchi A, Yoshiki T, Nakata S. Depletion of gamma-glutamylcyclotransferase in cancer cells induces autophagy followed by cellular senescence. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, 8, 650-61.
- 23) Taniguchi K, Matsumura K, Kageyama S, Ii H, Ashihara E, Chano T, Kawauchi A, Yoshiki T, Nakata S. Prohibitin-2 is a novel regulator of p21WAF1/CIP1 induced by depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-24.
- 24) Taniguchi K, Ii H, Kageyama S, Takagi H, Chano T, Kawauchi A, Nakata S. Depletion of gamma-glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth by activating the AMPK-FOXO3a-p21 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-43.
- 25) Xu S, Yang Y, Wang X, Liu X, Jin C, Ma M, Wu S, Li Y.  $\gamma$ -Glutamyl cyclotransferase contributes to endometrial carcinoma malignant progression and upregulation of PD-L1 expression during activation of epithelial-mesenchymal transition. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, 81, 106039.
- 26) Huang Q, Zhou Y, Li Y, Liao Z. GGCT promotes colorectal cancer migration and invasion via epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Lett.* **2020**, 20, 1063-70.
- 27) Dong J, Zhou Y, Liao Z, Huang Q, Feng S, Li Y. Role of  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase as a therapeutic target for colorectal cancer based on the lentivirus-mediated system. *Anticancer Drugs.* **2016**, 27, 1011-20.
- 28) Hama S, Arata M, Nakamura I, Kasetani T, Itakura S, Tsuchiya H, Yoshiki T, Kogure K. Prevention of tumor growth by needle-free jet injection of anti-C7orf24 siRNA. *Cancer Gene Ther.* **2012**, 19, 553-7.
- 29) Ran R, Liu Y, Gao H, Kuang Q, Zhang Q, Tang J, Fu H, Zhang Z, He Q. PEGylated hyaluronic acid-modified liposomal delivery system with anti- $\gamma$ -glutamylcyclotransferase siRNA for drug-resistant MCF-7 breast cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104, 476-84.



- 30) Li H, Yoshiki T, Hoshiya N, Uenishi J. Synthesis and GGCT Inhibitory Activity of N-Glutaryl-L-alanine Analogues. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 785-92.
- 31) Li H, Yoshiya T, Nakata S, Taniguchi K, Hidaka K, Tsuda S, Mochizuki M, Nishiuchi Y, Tsuda Y, Ito K, Kageyama S, Yoshiki T. A Novel Prodrug of a  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase Inhibitor Suppresses Cancer Cell Proliferation in vitro and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. *ChemMedChem.* **2018**, 13, 155-63.
- 32) Hanada E, Kageyama S, Murai R, Kubota S, Ii H, Nakata S, Kita H, Kawauchi A, Chano T. Pro-GA, a Novel Inhibitor of  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase, Suppresses Human Bladder Cancer Cell Growth. *Anticancer Res.* **2019**, 39, 1893-8.
- 33) McClung JK, Danner DB, Stewart DA, Smith JR, Schneider EL, Lumpkin CK, Dell'Orco RT, Nuell MJ. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 164, 1316-22.
- 34) Mishra S, Murphy LC, Nyomba BLG, Murphy LJ. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol. Med.* **2005**, 11, 192-7.
- 35) Yang J, Li B, He Q-Y. Significance of prohibitin domain family in tumorigenesis and its implication in cancer diagnosis and treatment. *Cell Death Dis.* **2018**, 9, 580.
- 36) Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med.* **2006**, 10, 353-63.
- 37) Koushyar S, Jiang WG, Dart DA. Unveiling the potential of prohibitin in cancer. *Cancer Lett.* **2015**, 369, 316-22.
- 38) Peng Y-T, Chen P, Ouyang R-Y, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis.* **2015**, 20, 1135-49.
- 39) Theiss AL, Sitaraman SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, 1813, 1137-43.
- 40) Chowdhury D, Kumar D, Sarma P, Tangutur AD, Bhadra MP. PHB in Cardiovascular and Other Diseases: Present Knowledge and Implications. *Curr. Drug Targets.* **2017**, 18, 1836-51.

- 41) Kim N-H, Yoshimaru T, Chen Y-A, Matsuo T, Komatsu M, Miyoshi Y, Tanaka E, Sasa M, Mizuguchi K, Katagiri T. BIG3 Inhibits the Estrogen-Dependent Nuclear Translocation of PHB2 via Multiple Karyopherin-Alpha Proteins in Breast Cancer Cells. *PLoS one*. **2015**, 10, e0127707.
- 42) Ande SR, Xu YXZ, Mishra S. Prohibitin: a potential therapeutic target in tyrosine kinase signaling. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, 2, 17059.
- 43) Feng F, Qiu B, Zang R, Song P, Gao S. Pseudogene PHBP1 promotes esophageal squamous cell carcinoma proliferation by increasing its cognate gene PHB expression. *Oncotarget*. **2017**, 8, 29091-100.
- 44) Mengwasser J, Piau A, Schlag P, Sleeman JP. Differential immunization identifies PHB1/PHB2 as blood-borne tumor antigens. *Oncogene*. **2004**, 23, 7430-5.
- 45) Pérez-Perarnau A, Preciado S, Palmeri CM, Moncunill-Massaguer C, Iglesias-Serret D, González-Gironès DM, Miguel M, Karasawa S, Sakamoto S, Cosialls AM, Rubio-Patiño C, Saura-Esteller J, Ramón R, Caja L, Fabregat I, Pons G, Handa H, Albericio F, Gil J, Lavilla R. A trifluorinated thiazoline scaffold leading to pro-apoptotic agents targeting prohibitins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 10150-4.
- 46) Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J. Cell Sci.* **2009**, 122, 3823-30.
- 47) Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, Wunderlich FT, Kleist-Retzow J-C von, Waisman A, Westermann B, Langer T. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev.* **2008**, 22, 476-88.
- 48) Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. **2009**, 1793, 27-32.
- 49) Jian C, Xu F, Hou T, Sun T, Li J, Cheng H, Wang X. Deficiency of PHB complex impairs respiratory supercomplex formation and activates mitochondrial flashes. *J. Cell Sci.* **2017**, 130, 2620-30.
- 50) Huang H, Zhang S, Li Y, Liu Z, Mi L, Cai Y, Wang X, Chen L, Ran H, Xiao D, Li F, Wu J, Li T, Han Q, Chen L, Pan X, Li H, Li T, He K, Li A, Zhang X, Zhou T, Xia Q, Man J. Suppression of mitochondrial ROS by prohibitin drives glioblastoma progression and therapeutic resistance. *Nat. Commun.* **2021**, 12, 3720.

- 51) Shi Y, Li Q, Sun F, Zhu C, Ma S, Qin D, Li Q, Li T. Lamprey PHB2 maintains mitochondrial stability by translocation to the mitochondria under oxidative stress. *Fish Shellfish Immunol.* **2020**, 104, 613-21.
- 52) Wang J, Zhu P, Li R, Ren J, Zhang Y, Zhou H. Bax inhibitor 1 preserves mitochondrial homeostasis in acute kidney injury through promoting mitochondrial retention of PHB2. *Theranostics.* **2020**, 10, 384-97.
- 53) Kuramori C, Azuma M, Kume K, Kaneko Y, Inoue A, Yamaguchi Y, Kabe Y, Hosoya T, Kizaki M, Suematsu M, Handa H. Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 379, 519-25.
- 54) Sievers C, Billig G, Gottschalk K, Rudel T. Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion. *PLoS One.* **2010**, 5, e12735.
- 55) Shen Y, Gao Y, Yuan H, Cao J, Jia B, Li M, Peng Y, Du X, Zhang J, Shi J. Prohibitin-2 negatively regulates AKT2 expression to promote prostate cancer cell migration. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, 41, 1147-55.
- 56) Cheng J, Gao F, Chen X, Wu J, Xing C, Lv Z, Xu W, Xie Q, Wu L, Ye S, Xie H, Zheng S, Zhou L. Prohibitin-2 promotes hepatocellular carcinoma malignancy progression in hypoxia based on a label-free quantitative proteomics strategy. *Mol. Carcinog.* **2014**, 53, 820-32.
- 57) Fu P, Yang Z, Bach LA. Prohibitin-2 binding modulates insulin-like growth factor-binding protein-6 (IGFBP-6)-induced rhabdomyosarcoma cell migration. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 29890-900.
- 58) Zhou Z, Ai H, Li K, Yao X, Zhu W, Liu L, Yu C, Song Z, Bao Y, Huang Y, Wu Y, Zheng L, Sun Y, Wang G, Ma K, Sun L, Li Y. Prohibitin 2 localizes in nucleolus to regulate ribosomal RNA transcription and facilitate cell proliferation in RD cells. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1479.
- 59) Takata H, Matsunaga S, Morimoto A, Ma N, Kurihara D, Ono-Maniwa R, Nakagawa M, Azuma T, Uchiyama S, Fukui K. PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr. Biol.* **2007**, 17, 1356-61.
- 60) Lee MH, Lin L, Equilibrina I, Uchiyama S, Matsunaga S, Fukui K. ASURA (PHB2) Is Required for Kinetochore Assembly and Subsequent Chromosome Congression. *Acta Histochem. Cytochem.* **2011**, 44, 247-58.

- 61) Kowno M, Watanabe-Susaki K, Ishimine H, Komazaki S, Enomoto K, Seki Y, Wang YY, Ishigaki Y, Ninomiya N, Noguchi TK, Kokubu Y, Ohnishi K, Nakajima Y, Kato K, Intoh A, Takada H, Yamakawa N, Wang PC, Asashima M, Kurisaki A. Prohibitin 2 regulates the proliferation and lineage-specific differentiation of mouse embryonic stem cells in mitochondria. *PloS One*. **2014**, 9, e81552.
- 62) Kim J-W, Akiyama M, Park J-H, Lin M-L, Shimo A, Ueki T, Daigo Y, Tsunoda T, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T. Activation of an estrogen/estrogen receptor signaling by BIG3 through its inhibitory effect on nuclear transport of PHB2/REA in breast cancer. *Cancer Sci*. **2009**, 100, 1468-78.
- 63) Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Chen Y-A, Murakami Y, Mizuguchi K, Mizohata E, Inoue T, Akiyama M, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Miyoshi Y, Sasa M, Nakamura Y, Katagiri T. Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nat. Commun*. **2013**, 4, 2443.
- 64) Yoshimaru T, Komatsu M, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, Katagiri T. Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the crosstalk between estrogen and growth factors in breast cancer. *Cancer Sci*. **2015**, 106, 550-8.
- 65) Yoshimaru T, Aihara K, Komatsu M, Matsushita Y, Okazaki Y, Toyokuni S, Honda J, Sasa M, Miyoshi Y, Otaka A, Katagiri T. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumour activity for breast cancer therapeutics. *Sci. Rep*. **2017**, 7, 1821.
- 66) Djehal A, Krayem M, Najem A, Hammoud H, Cresteil T, Nebigil CG, Wang D, Yu P, Bentouhami E, Ghanem GE, Désaubry L. Targeting prohibitin with small molecules to promote melanogenesis and apoptosis in melanoma cells. *Eur. J. Med. Chem*. **2018**, 155, 880-88.
- 67) Liu S, Wang W, Brown LE, Qiu C, Lajkiewicz N, Zhao T, Zhou J, Porco JA Jr, Wang TT. A Novel Class of Small Molecule Compounds that Inhibit Hepatitis C Virus Infection by Targeting the Prohibitin-CRaf Pathway. *EBioMedicine*. **2015**, 2, 1600-6.
- 68) Yurugi H, Marini F, Weber C, David K, Zhao Q, Binder H, Désaubry L, Rajalingam K. Targeting prohibitins with chemical ligands inhibits KRAS-mediated lung tumours. *Oncogene*. **2017**, 36, 4778-89.
- 69) Polier G, Neumann J, Thuaud F, Ribeiro N, Gelhaus C, Schmidt H, Giaisi M, Köhler R, Müller

WW, Proksch P, Leippe M, Janssen O, Désaubry L, Krammer PH, Li-Weber M. The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1093-104.

- 70) Moncunill-Massaguer C, Saura-Esteller J, Pérez-Perarnau A, Palmeri CM, Núñez-Vázquez S, Cosialls AM, González-Gironès DM, Pmares H, Korwitz A, Preciado S, Albericio F, Lavilla R, Pons G, Langer T, Iglesias-Serret D, Gil J. A novel prohibitin-binding compound induces the mitochondrial apoptotic pathway through NOXA and BIM upregulation. *Oncotarget.* **2015**, 6, 41750-65.
- 71) Wierz M, Pierson S, Chouha N, Désaubry L, François J-H, Berchem G, Paggetti J, Moussay E. The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo but fails to prevent leukemia development in a murine model. *Haematologica.* **2018**, 103, e154-57.
- 72) Pomares H, Palmeri CM, Iglesias-Serret D, Moncunill-Massaguer C, Saura-Esteller J, Núñez-Vázquez S, Gamundi E, Arnan M, Preciado S, Albericio F, Lavilla R, Pons G, González-Barca EM, Cosialls AM, Gil J. Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget.* **2016**, 7, 64987-5000.
- 73) Cosialls AM, Sánchez-Vera I, Pomares H, Perramon-Andújar J, Sanchez-Esteban S, Palmeri CM, Iglesias-Serret D, Saura-Esteller J, Núñez-Vázquez S, Lavilla R, González-Barca EM, Pons G, Gil J. The BCL-2 family members NOXA and BIM mediate fluorizoline-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, 180, 114198.
- 74) Cosialls AM, Pomares H, Iglesias-Serret D, Saura-Esteller J, Núñez-Vázquez S, González-Gironès DM, de la Banda E, Preciado S, Albericio F, Lavilla R, Pons G, González-Barca EM, Gil J. The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through the upregulation of NOXA and synergizes with ibrutinib, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside or venetoclax. *Haematologica.* **2017**, 102, 1587-93.
- 75) Núñez-Vázquez S, Sánchez-Vera I, Saura-Esteller J, Cosialls AM, Noisier AFN, Albericio F, Lavilla R, Pons G, Iglesias-Serret D, Gil J. NOXA upregulation by the prohibitin-binding compound fluorizoline is transcriptionally regulated by integrated stress response-induced ATF3 and ATF4. *FEBS J.* **2021**, 288, 1271-85.
- 76) Saura-Esteller J, Sánchez-Vera I, Núñez-Vázquez S, Jabalquinto-Carrasco J, Cosialls AM, Mendive-Tapia L, Kukhtar D, Martínez-Bueno MD, Lavilla R, Cerón J, Artal-Sanz M, Pons G,

- Iglesias-Serret D, Gil J. Fluorizoline-induced apoptosis requires prohibitins in nematodes and human cells. *Apoptosis*. **2021**, 26, 83-95.
- 77) Jin X, Xie J, Zabolocki M, Wang X, Jiang T, Wang D, Désaubry L, Bardy C, Proud CG. The prohibitin-binding compound fluorizoline affects multiple components of the translational machinery and inhibits protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **2020**, 295, 9855-67.
- 78) Saura-Esteller J, Sánchez-Vera I, Núñez-Vázquez S, Cosialls AM, Gama-Pérez P, Bhosale G, Mendive-Tapia L, Lavilla R, Pons G, Garcia-Roves PM, Duchen MR, Iglesias-Serret D, Gil J. Activation of the Integrated Stress Response and ER Stress Protect from Fluorizoline-Induced Apoptosis in HEK293T and U2OS Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 6117.
- 79) Kageyama S, Hanada E, Ii H, Tomita K, Yoshiki T, Kawauchi A. Gamma-Glutamylcyclotransferase: A Novel Target Molecule for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biomed Res. Int.* **2015**, 2015, 345219.
- 80) Kageyama S, Ii H, Taniguchi K, Kubota S, Yoshida T, Isono T, Chano T, Yoshiya T, Ito K, Yoshiki T, Kawauchi A, Nakata S. Mechanisms of Tumor Growth Inhibition by Depletion of  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase (GGCT): A Novel Molecular Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 2054.
- 81) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, 68, 394-424.
- 82) Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int. J. Clin. Pract.* **2011**, 65, 1180-92.
- 83) Giacinti S, Poti G, Roberto M, Macrini S, Bassanelli M, DI Pietro F, Aschelter AM, Ceribelli A, Ruggeri EM, Marchetti P. Molecular basis of drug resistance and insights for new treatment approaches in mCRPC. *Anticancer Res.* **2018**, 38, 6029-39.
- 84) Zhong B, Sallman DA, Gilvary DL, Pernazza D, Sahakian E, Fritz D, Cheng JQ, Trougakos I, Wei S, Djeu JY. Induction of clusterin by AKT--role in cytoprotection against docetaxel in prostate tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, 9, 1831-41.
- 85) el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. **1993**, 75, 817-25.

- 86) Wang D, Tabti R, Elderwish S, Abou-Hamdan H, Djehal A, Yu P, Yurugi H, Rajalingam K, Nebigil CG, Désaubry L. Prohibitin ligands: a growing armamentarium to tackle cancers, osteoporosis, inflammatory, cardiac and neurological diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, 77, 3525-46.
- 87) Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil CG, Désaubry L. Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chem. Biol.* **2013**, 20, 316-31.