

氏 名 (生年月日)	あ の わ ら か と う ー ん Anowara Khatun (1987 年 11 月 15 日)
学 位 の 種 類	博 士 (薬 科 学)
学 位 記 番 号	博薬科 第 12 号
学位授与の日付	2018 年 9 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Study on vitamin D- and androgen receptor-mediated regulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channel $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ in human breast cancer cells (乳がん細胞におけるビタミン D 及びアンドロゲン受容体シグナルを介したカルシウム活性化カリウムチャネル $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ 制御に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田 中 智 之 (副査) 教 授 加 藤 伸 一 (副査) 教 授 中 山 祐 治

論文内容の要旨

Introduction

Breast cancer remains a major health problem in women and causes second highest cancer death worldwide. Hormone therapy using anti-estrogen is a treatment for breast cancers that are estrogen (ER) and progesterone (PR) receptor-positive, and anti-HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) therapy is a treatment for breast cancers that are HER2-positive. The vitamin D (VDR) and androgen (AR) receptors are members of the nuclear family of steroid hormone transcriptional regulators like ER and PR. Approximately two-thirds of ER-PR-HER2-triple-negative breast cancers (TNBCs) express VDR and/or AR, and they are potential therapeutic targets for TNBC therapy. Recently, it has been found that large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ contributes breast cancer progression by regulating intracellular Ca^{2+} signaling. In the present study, I evaluated the effect of VDR agonists and anti-androgens on the expression and functional activity of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ K^{+} channel in human breast cancer MDA-MB-453 cells. This study will offer new mechanistic insights of VDR agonists- and anti-androgens-mediated treatment of the human breast cancer.

Chapter I. Down-regulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channel $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ in human breast cancer MDA-MB-453 cells treated with vitamin D receptor agonists

VDR agonists, calcitriol and calcipotriol, are therapeutic agents for the treatment of breast cancer. To evaluate the effects of calcitriol and calcipotriol on the expression and functional activity of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ K^{+} channel, the expression levels of both VDR and $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ were determined by real-time PCR and Western blotting assays. Among several breast cancer cell lines, the highest expression levels of VDR and $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ were found in MDA-MB-453 cells, of which viability was suppressed by the VDR agonists. Pharmacological inhibition of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ by the selective $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ blocker, paxilline, or siRNA-mediated inhibition of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ significantly suppressed the cell viability. Seventy two-hours of calcitriol or calcipotriol treatment reduced greater than 90% of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ transcription in MDA-MB-453 cells, and also reduced the $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ protein expression level. I then evaluated the functional activity of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ after 72 hr of calcitriol or calcipotriol treatment using voltage-sensitive fluorescent dye DiBAC₄(3) imaging. In consistent with the results of $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ expression analyses, treatment with the VDR agonists significantly suppressed paxilline-

induced depolarization responses compared to vehicle control. These results indicated that the VDR agonists caused functional aberration in $K_{Ca1.1}$ activity and suggested that such down-modulation of $K_{Ca1.1}$ might be involved in VDR agonist-mediated anti-proliferative effect. Furthermore, VDR agonist-mediated down-regulation of $K_{Ca1.1}$ proteins and inhibition of $K_{Ca1.1}$ activity were almost completely recovered by co- treatment with the specific proteasome inhibitor, MG132. These results suggested that VDR signaling pathway might modulate the stability of $K_{Ca1.1}$ protein in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Therefore, $K_{Ca1.1}$ is one of critical downstream molecules in VDR signaling and VDR agonists exert anti-proliferative effects in human breast cancer MDA-MB-453 cells, which may be regulated through transcriptional suppression and proteasomal degradation of $K_{Ca1.1}$.

Chapter II. Transcriptional repression and protein degradation of the Ca^{2+} -activated K^+ channel $K_{Ca1.1}$ by androgen receptor inhibition in human breast cancer cells

AR is widely expressed in metastatic breast cancer cells and considered as a therapeutic target for AR positive breast cancer. In this study, the high level expression of AR in MDA-MB-453 cells was confirmed by real-time PCR and Western blotting assay. Anti-androgens, enzalutamide (EZT) or bicalutamide (BCT) treatment significantly suppressed MDA-MB-453 cells viability. To clarify whether $K_{Ca1.1}$ would be involved in anti-proliferative effect of anti-androgens, I evaluated the functional activity of $K_{Ca1.1}$ after 48 hr of EZT or BCT treatment using the DiBAC₄(3) imaging. Paxilline-induced depolarization response was significantly suppressed by anti-androgens treatment. In consistent with this, whole-cell patch clamp recording showed that EZT and BCT treatment significantly suppressed paxilline-sensitive K^+ currents. EZT and BCT treatment potently suppressed the expression levels of $K_{Ca1.1}$ protein (more than 70%) in contrast to small decrease in its mRNA expression (20-30%). Indeed, MG132 treatment almost completely prevented EZT and BCT-mediated $K_{Ca1.1}$ protein degradation. Thus, the mechanism underlying anti-androgen-mediated reduction of $K_{Ca1.1}$ activity may be due to $K_{Ca1.1}$ protein degradation.

Among 8 regulatory $K_{Ca1.1}$ β and γ subunits, only one γ subunit, LRRC26 was highly expressed in MDA-MB-453 cells as well as primary and metastatic breast cancer tissues. However, anti-androgen did not induce significant changes in its expression, resulting in no significant effects on activation kinetics of paxilline-sensitive $K_{Ca1.1}$ currents. Anti-androgen treatment significantly up-regulated at the transcriptional levels ubiquitin E3 ligases, FBW7 and MDM2, and siRNA-mediated inhibition of FBW7 and MDM2 significantly prevented $K_{Ca1.1}$ protein degradation in MDA-MB-453 cells, respectively. These findings suggested that FBW7 and MDM2 might be involved in anti-proliferative effect of anti-androgens in AR positive breast cancer through degradation of $K_{Ca1.1}$.

Conclusions

VDR agonists and anti-androgens might be promising treatments for patients with TNBCs. In this study, the genomic action of VDR agonists and anti-androgens implicated the inhibition of $K_{Ca1.1}$ expression and activity in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Pharmacological inhibition and siRNA studies suggest the functional roles of the ubiquitin-proteasomal pathway in the degradation of $K_{Ca1.1}$. Down-regulation of $K_{Ca1.1}$ may be involved in anti-proliferative effects of VDR agonists and anti-androgens.

審査の結果の要旨

【緒言】

乳がんの治療では、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を発現するがんでは抗エストロゲン薬が、ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2)を発現するがんでは抗HER2抗体が、それぞれ有力な治療法として用いられている。一方、これらの標的分子をいずれも発現していない乳がん(triple negative breast

cancer, TNBC)に対しては、確立した治療法はなく、ビタミンD受容体(VDR)アゴニスト、抗アンドロゲン薬による治療が近年注目されている。本学位論文の研究では、既に報告されている VDR アゴニストおよび抗アンドロゲン薬の乳がん細胞の増殖抑制作用の分子メカニズムを解明することを主要な目的としている。

【審査結果】

本研究において、申請者はTNBCのモデルとして用いられることがあるヒト乳がん細胞株MDA-MB-453を用いて、VDRアゴニスト、抗アンドロゲン薬が、いずれも大コンダクタンスCa²⁺依存性K⁺チャネルであるK_{Ca}1.1の発現レベルを抑制させることを初めて明らかにした。さらに、両者によるK_{Ca}1.1の発現レベルの抑制は、転写レベル、およびタンパク質の分解のレベルの両方で制御されていることを明らかにした。K_{Ca}1.1の発現レベルと細胞増殖の関係については既にいくつかの報告があるが、申請者はRNA干渉、あるいはチャネル阻害剤を用いることにより、K_{Ca}1.1の機能の抑制がMDA-MB-453の細胞増殖を抑制することを確認した。これら一連の成果は、VDRアゴニスト、抗アンドロゲン薬の乳がんに対する治療効果の一端としてK_{Ca}1.1の発現レベルの抑制という機序が存在することを強く示唆するものである。本研究は培養細胞を対象としたものであり、個体レベルにおける薬物の作用機序を保証するものではないが、実験手法としては分子生物学、細胞生物学、薬理学の手法を駆使したものであり、ライフサイエンスの研究者としての一定水準を満たす内容である。

研究発表では、乳がん治療の現状、研究に関連する種々の分子の解説などについて詳しい背景の解説を通じて、研究の理解を助けるような工夫が認められた。実験データの説明については大きな過不足はなく適切であった。発表後の質疑応答では、後述するように、研究デザインに関する質問、あるいは実験結果を得るために用いた測定機器の原理に関する質問、一見して矛盾する結果の解釈についての質問について十分な回答に至らなかったことから、本論文の審査の過程ではこれらの点についても改善が求められた。

本論文審査では、K_{Ca}1.1の発現抑制の経時変化の詳細についての質問があり、予備検討の結果を参照して変化の大きな時間が採用されていること、またなぜそうした経時変化となるかについては解釈が難しいという回答が行われた。K_{Ca}1.1の発現量低下を証明した実験結果における表面的な矛盾点については、タンパク質分解の経路の重要性、およびK_{Ca}1.1の細胞内局在が未だ明らかでない点についての考察を加えた。また、実験結果の表現方法についても助言があり、個々の指摘に応じて修正が行われた。

【結論】

本研究の新規性は、VDRアゴニスト、および抗アンドロゲン薬による乳がん細胞の増殖抑制において、Ca²⁺依存性K⁺チャネルのひとつであるK_{Ca}1.1の発現レベル低下が関与することを示唆したことにある。両薬物によるK_{Ca}1.1の発現量低下については、遺伝子発現、タンパク質レベル、チャネルとしての活性という多面的な指標により検証が行われ、またK_{Ca}1.1の機能阻害は乳がん細胞株の増殖を抑制した。以上の成果は、細胞レベルにおける知見にとどまるが、一方でK⁺チャネルという標的分子を軸とした難治性の乳がんの新たな治療法の開発に貢献するものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士(薬科学)の学位論文としての価値を有するものと判断する。