

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07043

研究課題名(和文)細胞運動性を制御するシグナル伝達の相互作用の解析

研究課題名(英文)Analysis of the signal transduction network regulating cell motility

研究代表者

加藤 裕教 (Kato, Hironori)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞運動は、がんの転移など様々な疾患と深く関連があり、このような疾患の治療において、細胞の運動性をコントロールする仕組みを解明し、新たな治療法のターゲットを確立することが重要であると考えられる。本研究では、細胞の運動性に関わるEphA2受容体のリガンド非依存的シグナルと他の成長因子シグナルとの相互作用に着目し、1) EphA2が肝細胞増殖因子(HGF)によって上皮間葉転換の際に活性化を受けること、2) SGEFがチロシンリン酸化によってその活性が制御されていること、3) 神経膠芽腫においてEphA2が上皮成長因子(EGF)の下流で働くRSKによってリン酸化を受け活性化されること、を新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell migration contributes to a variety of diseases including tumor metastasis. It is important to elucidate molecular mechanisms underlying the regulation of cell migration to provide new therapeutic targets. In this study, we focused on the interaction between ligand-independent EphA2 receptor signaling and growth factor signaling, both of which play key roles in regulation of cell migration. We found that 1) hepatocyte growth factor (HGF) induces activation of EphA2 during epithelial-mesenchymal transition in epithelial cells, 2) SGEF activity is regulated by its tyrosine phosphorylation, 3) EphA2 is phosphorylated and activated by RSK in response to epidermal growth factor stimulation in glioblastoma cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞 がん シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の運動性を制御するシステムの異常は、がん細胞の転移やアレルギー性疾患などにおけるリンパ球の遊走など、様々な疾患の発症と深く関連がある。このような疾患の治療において、細胞の運動性を制御するシステムのどのような異常が疾患の発症につながるかを分子レベルで解明し、その仕組みに関わる分子を新たなターゲットとした診断法や治療法を確立することが重要であると考えられる。特に、様々な環境下における細胞の運動性を制御する新たな細胞内シグナル伝達経路を同定するとともに、個々のシグナル伝達経路がどのように関連し影響し合いながら細胞の運動性を決定しているかについて分子レベルで理解することは、細胞の運動性の異常が原因となっている様々な疾患を標的とした新たな分子ターゲットを探索する上でも非常に重要であり、さらにはその疾患に対する新たな診断法や治療法の開発につながる可能性が考えられる。

これまでも、細胞の運動性の制御に関わる細胞内シグナル伝達経路については数多くの研究がなされてきており、そのシグナルの中心的な役割を担っているのが Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である。Rho ファミリー G タンパク質は、主にアクチン細胞骨格を制御することにより、様々な刺激にตอบสนองして細胞の形態変化や運動を引き起こす分子スイッチの役割を果たすタンパク質ファミリーで、現在までに哺乳動物では 20 種類存在することが確認されている。一方、Rho ファミリーを活性化する因子 (GEF) と抑制する因子 (GAP) は、ヒトではそれぞれ約 80 種類と非常に数多く存在し、これら活性制御因子が細胞外からの様々な刺激や外部環境に応じて厳密に使い分けられていると考えられている。また、Rho ファミリー G タンパク質活性制御因子の中には様々な疾患との関わりが報告されているものが数多く存在し、これらに焦点を当てて研究することは、細胞の運動性に関連した疾患の発症機構を知る上で極めて重要である。ところが、その機能や活性調節機構について分子レベルで明らかになったものは一部にとどまる。申請者を含めた最近の研究成果から、エフリンやセマフォリンなどのガイダンス因子による Rho ファミリー G タンパク質の活性制御と様々な疾患との関連が特に注目されている。

## 2. 研究の目的

これまでの我々のエフリンやセマフォリン受容体とそのシグナル伝達を中心とした研究成果から、細胞は様々な刺激に応じて Rho ファミリー G タンパク質活性制御因子を使い分けることで非常に多様なシグナル伝達経路を活性化し、細胞の運動性を制御していることがうかがえる。特に、エフリン

などの本来個体の発生における細胞の移動や位置決定に重要な役割を担っているガイダンス因子やその受容体が、様々な組織のがんにおいてその発現が欠失している場合や、逆にそれらが過剰発現されているとの報告が相次いでおり、その結果がん細胞の運動性の促進、さらには浸潤能の獲得に関わっている事が明らかにされてきている。そこで本研究では、これまで申請者が行ってきたエフリン受容体による Rho ファミリー G タンパク質活性制御因子の制御と細胞運動に関する研究をさらに発展させ、特にがん化の促進との関連が深い成長因子によるシグナルとの相互作用について、上皮細胞が管腔構造を形成する三次元培養系を用いてより組織発生に近い実験系で検討する。その成果をもとに、G タンパク質シグナルの破綻による細胞の運動性の促進や浸潤能の獲得につながる分子メカニズムの一端を明らかにする。一方、Rho ファミリー G タンパク質活性制御因子の中には様々な疾患との関連が指摘されているものも数多く存在するため、それらの分子の機能や活性調節機構を分子レベルで明らかにし、細胞の運動性を制御する新たなシグナル伝達経路を同定するとともに、各制御因子に関連した疾患の発症機構の解明をめざす。さらには、各シグナル伝達経路間における相互作用の詳細な検討を行うことで、細胞の運動性を決定する新たな制御機構とそれに関わる疾患との関連を解析する。

## 3. 研究の方法

### 1) 三次元培養系を用いた HGF シグナルと EphA2 シグナルの相互作用の解析

細胞外マトリックスを用いた三次元培養系が確立している MDCK 細胞を用いて、上皮管腔構造形成過程における EphA2 受容体シグナルの役割を調べた。MDCK 細胞の三次元培養は、マトリゲルを用いて行った。また、EphA2、Ephexin4、及び RhoG に対する抗体を用いて、MDCK 細胞を含めた様々な上皮細胞あるいは上皮組織において、各分子が発現していることを確認し、上皮管腔構造が形成される過程における各シグナル分子の局在を調べた。次に、各分子の機能欠失変異体、あるいは効率よく発現を低下させるショートヘアピン RNA を発現させる安定細胞株を樹立し、EphA2 受容体シグナルを亢進あるいは抑制した場合の三次元培養下での細胞の上皮管腔構造形成への影響を観察した。さらには、HGF 存在下で見られる管腔構造の分枝化への EphA2 シグナルの影響を調べた。

### 2) チロシンリン酸化による RhoG 活性化因子 SGEF の機能解析

SGEF のチロシンリン酸化は、Flag タグを付加した SGEF を HEK293T 細胞に発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降したサンプルを

抗リン酸化チロシン抗体で検出した。RhoGの活性測定については、活性型 RhoG と特異的に結合することが知られている ELMO の N 末端領域を GST と融合させた蛋白質を精製し、この蛋白質を用いて細胞溶液内における GST-ELMO と結合する活性型 RhoG の量をイムノプロット法で解析した。細胞の運動性は、孔径 8  $\mu\text{m}$  のトランスウェルフィルターの上層に細胞を加え、インキュベート後に下層側へ移動した細胞のみ検出した。

一方、SGEF と Scribble の結合は、yeast two hybrid system を用いたスクリーニングにより見出した。

### 3) 神経膠芽腫における EGF シグナルと EphA2 シグナルの相互作用の解析

EphA2 のリン酸化は抗リン酸化抗体を用いて検出した。

### 4) 栄養飢餓ストレスにおける EphA2 シグナルの影響の解析

EphA2 のリン酸化は 3) と同様に抗リン酸化抗体を用いて検出した。xCT のノックアウト細胞は、CRISPR-CAS9 の系によって作製した。栄養飢餓ストレスの影響については、培地中に出た LDH の酵素活性を測定することで細胞の生存率を算出した。

## 4. 研究成果

### 1) 三次元培養系を用いた HGF シグナルと EphA2 シグナルの相互作用の解析

申請者は現在までに、EphA2 受容体と結合する RhoG 活性化因子 Ephexin4 を同定し、浸潤性の高い乳がん細胞における運動性・浸潤性に深く関与していることを明らかにしてきた (Hiramoto-Yamaki et al. *J. Cell Biol.* 2010; Harada et al., *Exp. Cell Res.* 2011; Kawai et al., *FEBS Open Bio* 2013)。このようながんの悪性化に働くシグナル伝達経路が、正常な上皮細胞におけるシグナルと比較して、どのような違いによってがんの悪性化につながっていくかについて理解することは、がんの新たなターゲットを探索する上でも非常に重要であると考えられる。そこで、細胞外マトリックスを用いた三次元培養系が確立している MDCK 細胞を用いて、上皮管腔構造形成過程における EphA2 受容体シグナルの役割について、特にがん化の促進との関連が深い肝細胞増殖因子 (HGF) によるシグナルとエフリンシグナルとの相互作用について検討した。その結果、MDCK 細胞を HGF 刺激することによって、速やかに EphA2 の細胞内領域に存在する 897 番目のセリン残基がリン酸化されることを見出した。次に、HGF による EphA2 のセリン 897 のリン酸化の意義を解析するため、RNAi によって EphA2 の発現を抑制した MDCK 細胞を作成し、そこにヒトの野生型あるいは 897 番目のセリンをア

ラニンに置換した変異体 (S897A) を新たに導入した細胞を構築した。これらの細胞を用いて三次元培養を行ったところ、EphA2-S897A 変異体では上皮細胞の管腔構造から新たにチューブを形成する最初の段階、すなわち細胞が上皮間葉転換を引き越すところで異常が見られることが明らかになった。また、この機能には EphA2 と結合する低分子量 G タンパク質 RhoG の活性化因子である Ephexin4 が必要であることも新たに見いだされた。以上の結果から、上皮管腔構造から HGF の刺激によって新たに細胞が運動性を保持するときに、HGF から EphA2-Ephexin4 シグナルの活性化が重要な役割を担っていることが示唆された。

### 2) チロシンリン酸化による RhoG 活性化因子 SGEF の機能解析

最近、特に浸潤性の高い神経膠芽腫において、RhoG 活性化因子である SGEF が、遺伝子レベルで過剰に発現していることが報告されている。今回我々は、SGEF が成長因子などの下流で働くチロシンキナーゼ Src によってリン酸化を受けることを新たに発見した。SGEF がリン酸化を受ける部位は RhoG を活性化するために必要な領域内に存在していたため、SGEF のチロシンリン酸化が活性に与える影響を検討した。その結果、SGEF が Src によってチロシンリン酸化を受けると、SGEF と RhoG との結合が減弱し、SGEF の RhoG 活性化が抑制されることを見出した。さらに、SGEF による細胞の運動性を測定する系を確立し、SGEF が RhoG を活性化することで細胞の運動性の促進が見られ、そこへ Src の活性型を同時に発現させることで SGEF のチロシンリン酸化を促し、それによって SGEF の活性の低下、運動性の減少がこの実験系によって確認できた。以上の結果から、SGEF が Src によりチロシンリン酸化を受けると、SGEF と RhoG の結合が抑制され、これによって RhoG の活性が減少し、細胞運動が抑制されるということを示した。これらの知見に基づくと、Src による SGEF のリン酸化は RhoG の過剰な活性化を抑制し、異常な細胞運動の亢進の抑制に寄与していると考えられる。

一方、SGEF がこれまでがんに対して抑制的な機能が認められる Scribble と結合することを新たに見出した。

### 3) 神経膠芽腫における EGF シグナルと EphA2 シグナルの相互作用の解析

神経膠芽腫は、脳腫瘍の中でも最も悪性度が高く、また悪性脳腫瘍の中では最も頻度の高い腫瘍で、手術による摘出や放射線と化学療法による治療が行われているものの、効果的な治療法が確立されていないのが現状である。これまでの報告から、EphA2 の細胞内領域にある 897 番目のセリン残基

がリン酸化されると、神経膠芽腫を含めたがん細胞の運動性、浸潤性が促進されることが知られている。我々は神経膠芽腫細胞において、EphA2 の 897 番目のセリンが EGF 刺激に応じてリン酸化されることを見出した。EGF による EphA2 の 897 番目のセリンのリン酸化は、これまで報告があった Akt の阻害剤では抑制されず、MEK あるいは RSK の阻害剤によって抑制された。以上の結果から、EGF シグナルによって MEK-ERK-RSK 経路が活性化されると、EphA2 の 897 番目のセリンがリン酸化を受け、細胞の運動性、浸潤性が促進される可能性が考えられた。

#### 4) 栄養飢餓ストレスにおける EphA2 シグナルの影響の解析

がん細胞が浸潤・転移していく過程では、細胞外マトリックスへの接着喪失に伴い、栄養飢餓などの数多くのストレスにさらされることが知られている。そこで、栄養飢餓ストレスモデルとしてグルコース濃度を低下させた培地を作製し、栄養飢餓ストレスが EphA2 シグナルへ与える影響について神経膠芽腫細胞を用いて検討した。その結果、グルコース濃度を低下させた細胞では EphA2 の 897 番目のセリンのリン酸化が亢進していることが明らかになった。今後、栄養飢餓ストレスによる EphA2 のリン酸化の意義について検討していく。

一方、我々は本研究計画を進めている過程で、アミノ酸トランスポーターの 1 つ、xCT が、神経膠芽腫細胞における栄養飢餓ストレスに関わっていることを偶然見出した。現在、xCT と EphA2 などのがん細胞の運動性を制御するシグナル分子との相互作用について、解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Takeo Goji, Kazuhiro Takahara, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2017) Cystine uptake through the cystine/glutamine antiporter xCT triggers glioblastoma cell death under glucose deprivation. **J. Biol. Chem.** Vol. 292, 19721-19732, 査読有  
DOI:10.1074/jbc.M117.814392

2) Yuho Hamaoka, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2016) EphA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation. **Cell. Signal.** Vol. 28, 937-945, 査読有  
DOI:10.1016/j.cellsig.2016.04.009

3) Yusuke Okuyama, Kentaro Umeda, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2016) Tyrosine

phosphorylation of SGEF regulates RhoG activity and cell migration. **PLoS One** Vol. 11, e0159617, 査読有  
doi:10.1371/journal.pone.0159617

4) Kohei Harada, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2015) HGF-induced serine 897 phosphorylation of EphA2 regulates epithelial morphogenesis of MDCK cells in three-dimensional culture. **J. Cell. Sci.** Vol. 128, 1912-1921, 査読有  
DOI:10.1242/jcs.163790

5) Shingo Takeuchi, Hironori Katoh, Manabu Negishi. (2015) Eph/ephrin reverse signalling induces axonal retraction through RhoA/ROCK pathway. **J. Biochem.** 158, 245-252, 査読有  
doi: 10.1093/jb/mvv042

〔学会発表〕(計 10 件)

1) 加藤裕教、がん細胞のグルコース代謝によるアミノ酸トランスポーター-xCT の機能制御、第 40 回日本分子生物学会 第 90 回日本生化学会 合同年会、2017 年 12 月 9 日 神戸ポートアイランド

2) 濱岡裕穂、根岸 学、加藤裕教、EphA2 のチロシンキナーゼ活性による S897 リン酸化の制御、第 40 回日本分子生物学会 第 90 回日本生化学会 合同年会、2017 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド

3) 梅田健太郎、加藤裕教、根岸 学、脳由来神経栄養因子(BDNF)による R-Ras の活性化と軸索形態制御の分子機構、第 40 回日本分子生物学会 第 90 回日本生化学会 合同年会、2017 年 12 月 7 日 神戸ポートアイランド

4) 遠山萌、根岸 学、加藤裕教、神経膠芽腫における EphA3 受容体の機能解析、第 40 回日本分子生物学会 第 90 回日本生化学会 合同年会、2017 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド

5) 山本佳央理、根岸 学、加藤裕教、SGEF による細胞運動の制御と Scribble の抑制作用、第 40 回日本分子生物学会 第 90 回日本生化学会 合同年会、2017 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド

6) 郷司剛央、根岸 学、加藤裕教、グルコース欠乏によるグリオブラストーマの細胞死誘導機構の解明、第 89 回 日本生化学会 大会、2016 年 9 月 26 日 仙台国際センター

7) 濱岡裕穂、根岸 学、加藤裕教、EphA2 によるグリオブラストーマ細胞増殖制御に関わる分子の探索、第 89 回 日本生化学会

大会、2016年9月25日 仙台国際センター

8) 濱岡裕穂、根岸 学、加藤裕教、RSK による EphA2 のリン酸化とグリオブラストーマ細胞の増殖制御、第 63 回 日本生化学会近畿支部会、2016年5月21日 神戸薬科大学

9) 加藤裕教、根岸 学、エフリン受容体 EphA2 のリガンド非依存的シグナルとリガンドによる OFF 作用、第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会 合同大会、2015年12月3日 神戸ポートピアアイランド

10) 濱岡裕穂、根岸 学、加藤裕教、EphA2 のリガンド非依存的シグナルによるグリオブラストーマ細胞の増殖制御、第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会 合同大会、2015年12月3日 神戸ポートピアアイランド

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/negishi/j/toppu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤裕教 (KATOU, Hironori)  
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：50303847

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

根岸 学 (NEGISHI Manabu)  
京都大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号：60201696

### (4) 研究協力者

( )