

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16744

研究課題名(和文)細胞接着分子ネクチンによるがん細胞の増殖と運動の停止と再開のスイッチ機構

研究課題名(英文)Switching mechanism for arresting and restarting cancer cell proliferation and migration by the cell adhesion molecule nectin

研究代表者

慶田城 迅(Kedashiro, Shin)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：00754558

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):がんの発症と転移の過程におけるがん細胞の増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構を解明することを目的とし、細胞接着分子ネクチン-4、成長因子受容体ErbB2、細胞外基質受容体インテグリン64がこの機構に果たす機能の解析を行った。その結果、ネクチン-4が、ErbB2およびErbB2バリエーションのp95-ErbB2と結合し、PI3K-AKT経路やHippo経路の活性化、転写因子SOX2の発現促進、非接着状態におけるがん細胞の増殖を亢進した。これらの分子の発現や結合により、がん細胞の増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本では二人に一人はがんに罹患すると言われており、その発症や、がん細胞の転移や生存の仕組みの解明は喫緊の課題である。事実、様々な抗がん剤がその仕組みを標的とし、積極的に開発されている。細胞接着分子ネクチン-4と成長因子受容体ErbB2は、乳がんを含む多くのがんにおいて、その転移や生存を促進するタンパク質として知られている。本研究において、ネクチン-4や薬剤耐性型ErbB2によるがん細胞の増殖機構を解明した。本成果は、ネクチン-4を発現するがん細胞や薬剤耐性型ErbB2に対する新規抗がん剤の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文):Cancer cell proliferation and migration are essential for onset, progression, and metastasis of cancer, but cancer cells are considered not to proliferate during circulation in blood. The switching mechanism for arresting and restarting cancer cell proliferation remains elusive. The cell adhesion molecule nectin-4 is upregulated in many types of cancers. In this study, we found that nectin-4 interacted with ErbB2 to promote its activation, eventually accelerating breast cancer cell proliferation through the PI3K-AKT signaling pathway. We further found that nectin-4 cis-interacted with p95-ErbB2, a trastuzumab-resistant variant of ErbB2, and cooperatively enhanced a transcription factor SOX2 gene expression and cell proliferation in a suspension culture. Only the combination of nectin-4 and p95-ErbB2 cooperatively activated the Hippo signaling pathway to enhance SOX2 gene expression. Thus, nectin-4 regulates the switching mechanism for arresting and restarting cancer cell proliferation.

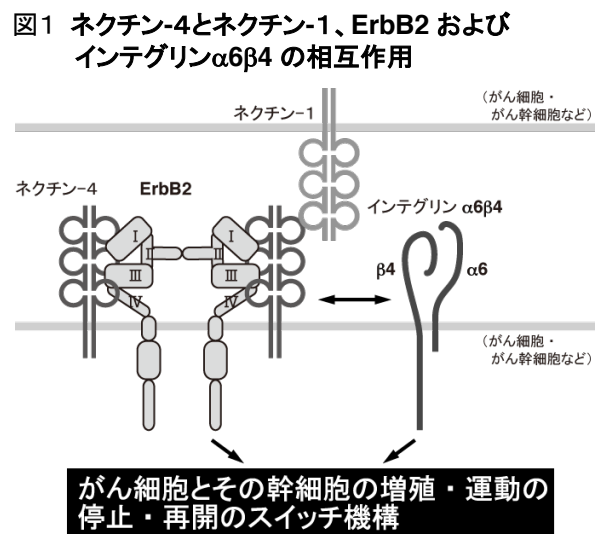
研究分野：生化学

キーワード：ネクチン-4 ErbB2 p95-ErbB2 インテグリン 6 4

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般にがん細胞は、原発巣では増殖し運動するが、血中循環中では増殖や運動を停止し、転移巣では増殖や運動を再開する。また、がん細胞とその幹細胞との間の形質転換過程でも増殖・運動の停止・再開が認められる。このがん細胞やその幹細胞の増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構は、がんの発症と転移、再発の機構を理解する上で重要な課題であり、この課題解決は新たな抗がん剤の開発への寄与など、学術的にも臨床的にも大きな貢献が期待できる。しかし、この増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構は不明な点が多い。正常細胞では、増殖因子受容体や細胞外基質受容体のインテグリンは協働して細胞の増殖と運動を制御するが、がん細胞では、この増殖因子受容体はその変異、あるいはその遺伝子の増幅による過剰発現で異常に活性化される。異常に活性化された受容体はその下流のシグナル伝達を強く活性化し、細胞を生存させると共に細胞の増殖や運動を著しく亢進させる。例えば、増殖因子受容体 ErbB2 は乳がんの原因遺伝子の一つであり、その発現上昇によってホモ二量体化が促進される。ホモ二量体化した ErbB2 はリン酸化を介して下流のシグナル経路である PI3K-AKT 経路を活性化し、がん細胞の増殖や運動を亢進させ、結果としてがんの発症や浸潤・転移を促進する。ErbB2 の過剰発現を原因とする乳がんは、全ての乳がんの 20~30% を占めており、学術的にも臨床的にも大きく注目されている。一方、インテグリン $\alpha6\beta4$ もがん細胞において発現上昇、あるいは活性化しており、がん遺伝子の Src の活性を促進し、がん細胞の生存や増殖を制御している。研究代表者が所属する研究室では、細胞接着分子ネクチン (ネクチン-1、-2、-3、-4) とネクチン様分子 (Necl-1、-2、-3、-4、-5) が同じ細胞膜上の増殖因子受容体やインテグリンとシスに結合して、その活性を制御して細胞の生存や増殖、運動を制御していることを明らかにしている。これらの分子の中で、Necl-4 はがん抑制因子として知られていたが、その作用機構は不明であった。研究代表者は、乳がん由来細胞株で Necl-4 が増殖因子受容体 ErbB3 と結合して新しい機構でその活性を抑制することを見出した (*Sci. Rep.*, 2017)。この機構では、Necl-4 が ErbB3 の増殖因子結合部位や ErbB2 結合部位とは異なる部位にシスに結合し、いわゆるアロステリック様式でこの ErbB3/ErbB2 ヘテロ二量体化を抑制してその下流シグナルの活性化を抑制した。これにより、ErbB3 のリガンドであるヘレグリン依存的ながん細胞の運動およびがん細胞の足場非依存的な細胞生存を阻害した。一方、ネクチン-4 は正常細胞ではほとんど発現しておらず、種々のがん細胞で過剰発現しているが、研究代表者は、乳がん由来細胞株におけるネクチン-4 による ErbB2 の新しい活性化機構を解明した。この機構では、ネクチン-4 が ErbB2 にシスに結合してそのホモ二量体化を促進することで AKT を介するシグナル伝達を活性化し、細胞増殖を促進した。最近、他の研究者によって、血中循環中の乳がん細胞株にはネクチン-4 と-1 およびインテグリン $\alpha6\beta4$ が発現しており、ネクチン-4 と-1 がトランスに結合して隣接するがん細胞を接着させ、ネクチン-4 がインテグリン $\alpha6\beta4$ とシスに結合してがん細胞の生存を制御することが報告された。また、乳がん細胞株の転移にはインテグリン $\alpha6\beta4$ を含んだエキソソームが関与することも報告された。そこで本研究では、がんの発症と転移の過程におけるがん細胞とその幹細胞の増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構を解明することを目的にして、この機構に果たすネクチン-4 と-1、ErbB2 およびインテグリン $\alpha6\beta4$ の機能と作用機構に関して以下の3つの課題を解析する (図1)。



2. 研究の目的

がん細胞の増殖・運動の停止・再開は、原発巣や血中循環中および転移巣のがん細胞で認められるが、がん細胞とその幹細胞の間での形質転換の過程でも認められる。このがん細胞やその幹細胞の増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構は、がんの発症と転移、再発の機構を理解する上で重要な課題であるが、現在なお未解明である。そこで、ネクチン-4 による ErbB2 とインテグリン $\alpha6\beta4$ 活性化と増殖制御、生存制御の作用機構に着目し、上記に示した重要かつ未解明な課題解決、あるいはその一助なることを目指す。

3. 研究の方法

(I) がん細胞とその幹細胞の増殖と運動の停止と再開のスイッチ機構

乳がん由来細胞株ではがん細胞の増殖と運動、少なくともそれらの一部は、ネクチン-4 と-1、ErbB2 およびインテグリン $\alpha6\beta4$ の相互作用によって制御されると考えられるため、これらの相互作用が何らかの機構でコントロールされると、環境依存性の乳がん細胞やその幹細胞の増殖・運動の停止・再開を制御することが可能となる。本機構を解明するために、これら分子の発現や

相互作用、増殖・運動に関わるシグナル伝達分子の活性化、それに伴う新規な分子の発現誘導を解析する。また、それらの遺伝子を siRNA や shRNA を用いたノックダウンにより、乳がん由来がん細胞株同士や、乳がん由来がん細胞の幹細胞の接着と細胞外基質 (ECM) との接着ががん細胞の増殖と運動に及ぼす影響を解析する。

(II) がん細胞とその幹細胞の新たな生存機構

上記と同様な手法を用いて、乳がん由来がん細胞株同士や、乳がん由来がん細胞の幹細胞の接着と ECM との接着ががん細胞の生存に及ぼす影響を解析する。

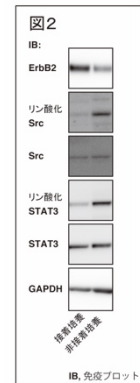
(III) がん細胞の転移過程におけるエクソソームの作用機構

インテグリン $\alpha 6\beta 4$ やネクチン-4、ErbB2 を含むエクソソームによるがん細胞の転移や増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構への関与、また、エクソソームの具体的な標的細胞/ECM、それを介したがん細胞定着機構は不明である。本機構を解明するために、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ 陽性エクソソームが血管外のどの標的細胞/ECM に結合するか検討を行う。乳がん細胞の転移先と考えられる臓器から血管を採取するとともに、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ を発現している乳がん細胞の培養上清からエクソソームを精製する。精製エクソソームを色素で標識後、血管に添加し、どこにシグナルが見られるか解析する。精製エクソソームから、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ が含まれるエクソソームを免疫沈降法により単離し、ネクチン-4や-1 および ErbB2 の有無を検討する。あるいは、質量分析でインテグリン $\alpha 6\beta 4$ 陽性エクソソームに充填されている分子を網羅的に解析する。エクソソームにおけるネクチン-4と-1 や ErbB2、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ の重要性を検討するため、可能である場合は、これらの分子を CRISPR-Cas9 法や siRNA、shRNA で発現を減少させた乳がん細胞から精製したエクソソームを用いて上記と同様の実験を行う。

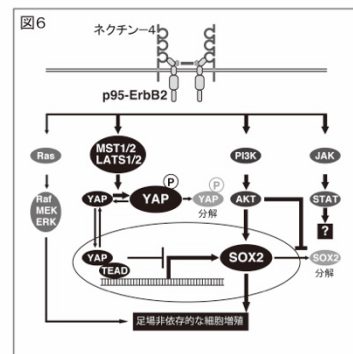
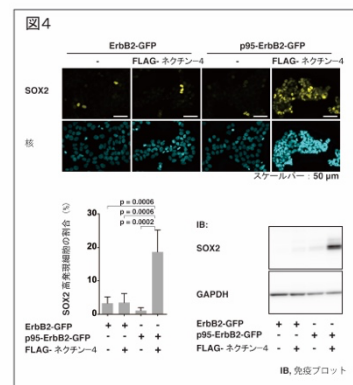
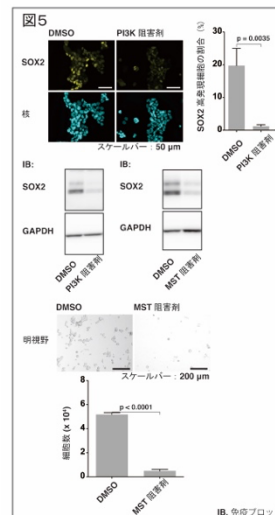
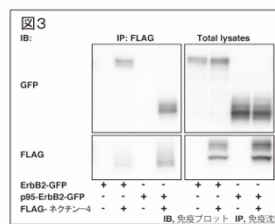
4. 研究成果

(I) がん細胞とその幹細胞の増殖と運動の停止と再開のスイッチ機構および新たな生存機構

乳がん細胞では、増殖・運動と生存、少なくともそれらの一部は、ネクチン-4 や ErbB2、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ の相互作用により制御されると考えられている。そこで、これら分子の発現や増殖・運動に関わるシグナル伝達分子の活性化を、原発巣を模した接着状態、血中循環中を模した非接着状態でウェスタンブロットにより比較検討した。その結果、非接着状態では増殖に重要な ErbB2 の発現量が顕著に減少していた。また、生存に重要な Src の活性化が認められ、予想外に、STAT3 の活性化も検出された (図2)。ErbB2 と Src、STAT3 の発現変動および活性化、ネクチン-4 とインテグリン $\alpha 6\beta 4$ などの分子の機能的な相互作用により、がん細胞の増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構および生存機構が制御されている可能性が考えられた。一方、この解析中に予想外の結果が得られた。ネクチン-4 は、ErbB2 を標的とした抗体医薬トラスツズマブに耐性をもつ ErbB2 のバリエーションである、p95-ErbB2 とも結合することが免疫沈降実験により明らかとなった (図3)。また、ネクチン-4 と p95-ErbB2 が結合した場合にのみ、がん細胞の増殖や生存に寄与する転写因子 SOX2 の発現が促進されることが細胞染色実験とウェスタンブロットにより明らかとなった (図4)。



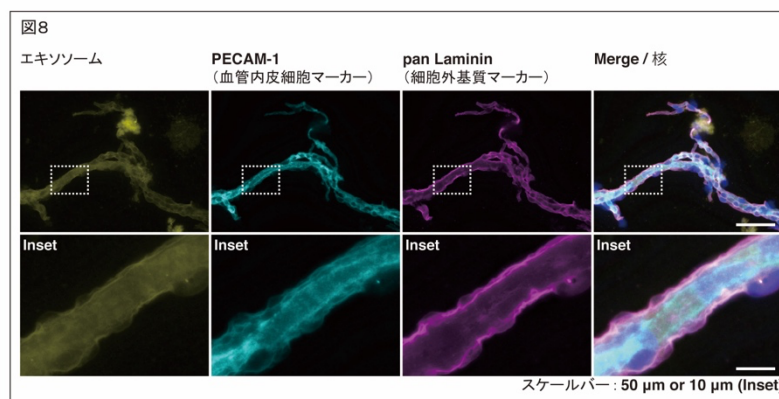
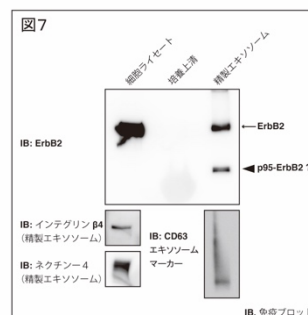
SOX2 の発現は PI3K-AKT 経路と、MST1/2、LATS1/2、YAP から構成される Hippo 経路を介していることが、それぞれの経路の阻害剤で処理した細胞の染色実験とウェスタンブロットで明らかとなった (図5)。発現した SOX2 は、乳がん細胞の足場非依存的な増殖に寄与していた (図5)。これらの結果から、ネクチン-4 と p95-ErbB2 が協調的に機能して、PI3K-AKT 経路と Hippo 経路を介した SOX2 の発現を促進し、乳がん細胞の足場非依存的な増殖を亢進することが明らかとなった (図6)。これまでがん細胞は、血中循環中はほとんど増殖しないと考えられてきた。実際に増殖を制御する ErbB2 の発現や、生存を制御する Src の活性が変化している。一方でネクチン-4 と p95-ErbB2 は発現するがん細胞では、上記の機構によって血中においても増殖が亢進して



いることが示唆され、より悪性度が高い可能性が考えられた。さらにこの研究により、がん細胞の増殖・運動の停止・再開、少なくともそれらの一端は、ErbB2 と Src の発現変動、ネクチン-4 と p95-ErbB2 の協調作用、それによる SOX2 の発現促進を介して制御されていることが考えられた。

(II) がん細胞の転移過程におけるエクソソームの作用機構

インテグリン $\alpha 6\beta 4$ やネクチン-4、ErbB2 を含むエクソソームによるがん細胞の転移や増殖・運動の停止・再開のスイッチ機構への関与、また、エクソソームの具体的な標的細胞/ECM、それを介したがん細胞定着機構は不明である。これらを解明するために、まず乳がん細胞である SUM190-PT 細胞由来のエクソソームを、細胞培養上清から精製した。なお、この細胞培養上清には牛胎児血清が含まれていないため、精製されたエクソソームは SUM190-PT 細胞由来であると考えられる。次に、精製したエクソソームにインテグリン $\alpha 6\beta 4$ とネクチン-4、ErbB2 が含まれることをウェスタンブロットで確認した (図7)。予想外に、精製したエクソソームでは分子量 90 kDa 付近に ErbB2 抗体で検出されるタンパク質が認められたことから、ErbB2 のバリエーションである p95-ErbB2 の可能性が考えられた (図7矢じり)。このタンパク質は細胞ライセートではほとんど検出されず、エクソソーム特異的であった (図7)。次に、エクソソームの具体的な標的細胞/ECM を探索するため、乳がん細胞の転移先の一つである脳から血管を採取した。さらに、精製したエクソソームを蛍光色素で標識し、採取した脳血管とインキュベート後、PECAM-1 (血管内皮細胞マーカー) 抗体と pan Laminin (細胞外基質マーカー) 抗体で染色した。エクソソームの蛍光は、細胞内皮細胞と細胞外基質の両方で検出されたことから、血管内皮細胞と血管周囲の細胞外基質が標的である可能性が考えられた (図8)。エクソソームが血管周囲の細胞外基質で検出されたこと、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ やネクチン-4、ErbB2 がエクソソームから検出されたことから、少なくとも細胞外基質において、エクソソームとそれに含まれる分子の機能を介してがん細胞の増殖や生存に寄与する可能性が考えられた。さらに p95-ErbB2 もエクソソームに含まれる場合は、前述に示すように、ネクチン-4 と p95-ErbB2 が協調的に機能して、SOX2 の発現を介した作用も起きる可能性が考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kedashiro Shin, Kameyama Takeshi, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 11
2. 論文標題 Nectin-4 and p95-ErbB2 cooperatively regulate Hippo signaling-dependent SOX2 gene expression, enhancing anchorage-independent T47D cell proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86437-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kedashiro Shin, Sugiura Ayumu, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 9
2. 論文標題 Nectin-4 cis-interacts with ErbB2 and its trastuzumab-resistant splice variants, enhancing their activation and DNA synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55460-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------