

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20247027

研究課題名（和文） 上皮間充織形質転換（EMT）における浸潤性獲得機序の解析

研究課題名（英文） Invasiveness acquired during EMT

研究代表者

佐邊 壽孝（SABE HISATAKA）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40187282

研究成果の概要（和文）：

本研究は上皮間充織形質転換（EMT）進行に伴う浸潤性獲得機序の解明を目的とする。浸潤性獲得の観点から見た場合、EMTの本質は、E-カドヘリンによる細胞同士接着の脱接着と運動し浸潤する為に必要なインテグリンの活性化である。この研究は、EMTにおけるE-カドヘリンの不活性化機構とインテグリンの活性化機構の分子的詳細を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to understand precise mechanisms by which epithelial cells acquire invasiveness during their epithelial-mesenchymal transdifferentiation (EMT). Inactivation of E-cadherin and activation of some integrins are hallmark characteristics during EMT and necessary for the invasiveness. This study identified fine mechanisms as to how these cell adhesion molecules are regulated during EMT of mammary epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
総計	32,800,000	9,840,000	42,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：EMT、浸潤、Arf GTPases、E-cadherin、endocytosis、AMAP1

1. 研究開始当初の背景

上皮間充織形質転換（EMT）は外胚葉細胞が中胚葉（間充織）的の形質を獲得し、運動性を獲得する過程である。言い換えると EMT の実態は、上皮細胞が細胞内の周囲細胞や基質との接着性を変化させ、運動性の獲得と共に、組織から抜け出す事である。その為、EMT では、E-カドヘリンが不活性化され、一方、ある種のインテグリンが活性化される。また、EMT において細胞は基質上での運動性を獲

得するのみにならず、しばしば、細胞外基質に対して高い浸潤性を示す。癌の悪性度の本体は、その浸潤や転移にあるが、このような能力の獲得過程は EMT 進行過程と類似点が多い。しかし、どのようにして E-カドヘリンを不活性化するのか、どのようにしてインテグリンを活性化するのか、その分子機構は殆ど不明であった。

2. 研究の目的

EMT における E - カドヘリン不活性化、並びに、ある種のインテグリンの活性化機構の分子の詳細を明らかにする。そのことにより、別途進めている癌研究に対する基礎学問的側面を相補し、癌の治療方法や予防法の更なる発展への貢献を目指す。

3. 研究の方法

1) EMT における E - カドヘリン接着破壊機構 :

TGF β 1 によって EMT が引き起こされる乳腺上皮細胞株 NMuMG を用い、EMT における E - カドヘリン接着破壊の分子機構を解析した。この細胞では、TGF β 1 刺激によって Arf6 が活性化され、AMAP1 を介して E - カドヘリン接着破壊が起こる事をまず確認した。

2) EMT 進行におけるインテグリン活性化機構 :

他の研究費で行ってきた研究において、乳癌細胞の浸潤において β 1 インテグリンを活性化 (リサイクル) するのは、同じ Arf6 経路であることを明らかにしている。癌ではこの経路は EGFR 下流で活性化されるが、NMuMG においては TGF β 1 によって活性化され、その際、HGFR が関与した。用いた乳癌細胞は既に EMT が起こっているものである。ここでは、乳癌細胞を用いて、EGF 刺激による β 1 インテグリンのリサイクリング機構を解析した。

4. 研究成果

1) E - カドヘリン接着破壊機構 :

NMuMG 細胞において、TGF β 1 によって Arf6 が活性化する事、この活性化は Arf6 に対する GEF である GEP100 が引き起こすことを明らかにした。一方、我々は以前に EPB41L5 が EMT に伴い発現誘導されること、EPB41L5 は E - カドヘリンの endocytosis に関与する事を報告したが、Arf6 の下流因子の一つである、AMAP1 が EPB41L5 の結合相手であり、その事によって E - カドヘリンの endocytosis を引き起こす事を明らかにした。AMAP1 と EPB41L5 との結合様式は今迄にない興味深いものであり、現在、その超微細構造解析を進めている。また、TGF β 1 による GEP100 活性化の詳細も解析中である。

2) インテグリン活性化機構 :

Protein kinase D2 (PRKD2) は極性をもった上皮細胞での E - カドヘリンや β 1 インテグリンの basolateral sorting に関与することが報告されている。今回、PRKD2 も AMAP1 の結合相手であり、その事によって、AMAP1 は α 2 β 1 並びに α 3 β 1 インテグリンと複合体を形成する事、この複合体形成によって、EGFR - GEP100 - Arf6 - AMAP1 経路はこれらのインテグリンのエンドソームから細胞形質

膜へのリサイクリングを担う事を明らかにした。また、その際、活性型 Rab5c も AMAP1 に対して結合能を示す事、Rab5c は EGFR シグナルにより活性化される事、このことが細胞内での AMAP1 と EPB41L5 との結合を担うことを明らかにした。このリサイクリング機構はある種の乳癌の浸潤活性に必須であった。

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 15 件)

- ① Rab5c mediates AMAP1-PRKD2 complex to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. Onodera Y., Nam JM., Hashimoto A., Norman JC., Shirato H., Hashimoto S. and Sabe H. *J. Cell Biol.*, (in press) 2012, 査読有
- ② GBF1 bears a novel phosphatidylinositol-phosphate binding module, BP3K, to link PI3K activity with Arf1 activation involved in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis and superoxide production. Mazaki Y., Nishimura Y. and Sabe H. *Mol. Cell Biol.*, (in press) 2012, 査読有
- ③ Grp1 plays a key role in linking insulin signaling to glut4 recycling. Li J., Malaby AW., Famulok M., Sabe H., Lambright DG. and Hsu VW. *Dev Cell.*, (in press) 2012, 査読有
- ④ EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of Madin-Darby canine kidney cells by inactivating Ezrin through negative regulation of RhoA. Wakayama Y., Miura K., Sabe H. and Mochizuki N. *J Biol Chem*, 286: 44243-44253, 2011, 査読有, doi:10.1074/jbc.M111.267047
- ⑤ GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. Hashimoto A., Hashimoto S., Ando R., Noda K., Ogawa E., Kotani H., Hirose M., Menju T., Morishige M., Manabe T., Toda Y., Ishida S. and Sabe H. *PLoS One*, 6:e23359, 2011, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0023359
- ⑥ Engagement of overexpressed Her2 with GEP100 induces autonomous invasive activities and provides a biomarker for metastases of lung adenocarcinoma. Menju T., Hashimoto S., Hashimoto A., Otsuka Y., Handa H., Ogawa E., Toda Y., Wada H., Date H. and Sabe H. *PLoS One*, 6:e25301,

- 2011, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0025301
- ⑦ Cancer early dissemination: cancerous epithelial-mesenchymal transdifferentiation and transforming growth factor β signalling. Sabe H. *J Biochem*, 149: 633-639, 2011, 査読有, doi:10.1093/jb/mvr044
- ⑧ Zyxin mediates actin fiber reorganization in epithelial-mesenchymal transition and contributes to endocardial morphogenesis. Mori M., Nakagami H., Koibuchi N., Miura K., Takami Y., Koriyama H., Hayashi H., Sabe H., Mochizuki N., Morishita R. and Kaneda Y. *Mol Biol Cell*, 20:3115-3124, 2009, 査読有, doi:10.1091/mbc.E09-01-0046
- ⑨ EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. Miura K., Nam JM., Kojima C., Mochizuki N. and Sabe H. *Mol Biol Cell*, 20:1949-1959, 2009, 査読有, doi:10.1091/mbc.E08-06-0549
- ⑩ The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. Sabe H., Hashimoto S., Morishige M., Ogawa E., Hashimoto A., Nam JM., Miura K., Yano H. and Onodera Y. *Traffic*, 10:982-993, 2009, 査読有, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00917.x
- ⑪ The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside. Sabe H., Hashimoto S., Morishige M., Hashimoto A. and Ogawa E. *Cell Adh Migr*, 2:71-73, 2008, 査読有, <http://www.landesbioscience.com/journals/celladhesion/SabeCAM2-2.pdf>
- ⑫ IRES-mediated translational control of AMAP1 expression during differentiation of monocyte U937 cells. Miyata M., Raven JF., Baltzis D., Koromilas AE. and Sabe H. *Cell Cycle*, 7:3273-3281, 2008, 査読有, <http://www.landesbioscience.com/journals/c/MiyataCC7-20.pdf>
- ⑬ EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. Hirano M., Hashimoto S., Yonemura S., Sabe H. and Aizawa S. *J Cell Biol*, 182:1217-1230, 2008, 査読有, doi: 10.1083/jcb.200712086
- ⑭ Fbx8 makes Arf6 refractory to function via ubiquitination. Yano H., Kobayashi I., Onodera Y., Luton F., Franco M., Mazaki Y., Hashimoto S., Iwai K., Ronai Z. and Sabe H. *Mol Biol Cell*, 19:822-832, 2008, 査読有, doi: 10.1091/mbc.E07-08-0763
- ⑮ GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. Morishige M., Hashimoto S., Ogawa E., Toda Y., Kotani H., Hirose M., Wei S., Hashimoto A., Yamada A., Yano H., Mazaki Y., Kodama H., Nio Y., Manabe T., Wada H., Kobayashi H. and Sabe H. *Nat Cell Biol*, 10:85-92, 2008, 査読有, doi:10.1038/ncb1672
- [学会発表] (計 30 件)
- 1) 佐邊壽孝, p53 mutation and TGF β signaling culminate in cancer invasiveness via GEP100-Arf6-AMAP1 pathway, Cell Migration in Biology and Medicine, 2012年1月23日, 九州大学(福岡県)
 - 2) 佐邊壽孝, p53 mutation and TGF β signaling culminate in cancer invasiveness via GEP100-Arf6-AMAP1 pathway, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月15日, パシフィコ横浜(神奈川県)
 - 3) 橋本あり, Mutant p53 is essential for TGF β 1-induced breast cancer cell invasion, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月15日, パシフィコ横浜(神奈川県)
 - 4) 橋本茂, EZH2 regulates Arf6 activity necessary for invasiveness of some breast cancer cells under normoxia and hypoxia, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(神奈川県)
 - 5) 小野寺康仁, AMAP1 promotes β 1 integrin recycling via PRKD2 and Rab5c in EGF-induced invasion of breast cancer cells (104/120), 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場(愛知県)
 - 6) 橋本あり, Mutant p53 is essential for TGF β 1-induced breast cancer cell invasiveness, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場(愛知県)
 - 7) 橋本茂, EZH2 is essential to Arf6 activation necessary for TGF β 1- and hypoxia-induced invasiveness of breast cancer cells, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場(愛知県)
 - 8) 橋本あり, HGFR/c-Met-mediated activation of GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is an integral part for TGF β -induced cancerous EMT and invasiveness, 第63回日本細胞生物学会大会, 2011年6月28日, 北海道大学

- (北海道)
- 9) 小野寺康仁, Glucose metabolism and intracellular trafficking in tumor malignancy, 第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 北海道大学(北海道)
 - 10) 橋本茂, Arf6 activation under hypoxia and its relationship to invasion, EMT conversion and stemness of breast cancer cells, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会合同大会, 2010 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
 - 11) 小野寺康仁, Intracellular trafficking and glucose metabolism in tumor malignancy, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会合同大会, 2010 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
 - 12) 橋本あり, TGFβ1 activates GEP100-Arf6-AMAP1 pathway to induce EMT, and possible relationship of this activation to cancer, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会合同大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
 - 13) 橋本茂, Hypoxia-induced invasive activity of breast cancer cells involves Arf6 activation, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 24 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 14) 橋本あり, HGFR-mediated GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is an integral part for TGFβ-induced cancerous EMT and invasiveness, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 24 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 15) 佐邊壽孝, The Arf6-AMAP1 Pathway Contributes to Cancerous EMT, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 16) 小野寺康仁, Roles of intracellular trafficking and glucose metabolism in tumor malignancy, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 17) 佐邊壽孝, The Arf6-AMAP1 Pathway Contributes to Cancerous EMT, 第 30 回札幌国際がんシンポジウム, 2010 年 6 月 29 日, 北海道大学 (北海道)
 - 18) 橋本あり, GEP100-Arf6-AMAP1 経路は癌浸潤と血管新生に対する共通の分子標的である, 第 62 回本細胞生物学会大会, 2010 年 5 月 20 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 19) 小野寺康仁, Intracellular traffic and glucose metabolism in tumor malignancy, 第 62 回本細胞生物学会大会, 2010 年 5 月 20 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 20) 佐邊壽孝, 転移部における癌の休眠と再発: 癌的 EMT から考える, 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010 年 5 月 19 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
 - 21) 小野寺康仁, 癌細胞の休眠と再活性化: 糖代謝と小胞輸送の関与, 第 2 回シグナルネットワーク研究会, 2010 年 5 月 14 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
 - 22) 佐邊壽孝, Integrin activation and E-cadherin inactivation by the Arf6 pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. 第 6 回 OOTR 年次学会, 2010 年 2 月 25 日, ウェスティン都ホテル京都 (京都府)
 - 23) 真崎雄一, Both GBF1 and PI3-kinase are essential for Arf1 activation necessary for neutrophil directional migration, 第 39 回日本免疫学会学術集会, 2009 年 12 月 2 日, ウェスティン都ホテル京都 (京都府)
 - 24) 橋本あり, 腫瘍血管における透過性亢進に関与する分子輸送のメカニズム及び病態の解明, 細胞内ロジスティクス斑会議, 2009 年 11 月 11 日, 万座ビーチリゾート会議場 (沖縄県)
 - 25) 佐邊壽孝, メンブレントラフィックと癌浸潤形質獲得機序, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
 - 26) 三浦浩一, EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
 - 27) 佐邊壽孝, Integrin activation and E-cadherin inactivation by the Arf6 pathway specific to breast cancer invasion and metastasis., 2009 FEBS workshop, 2009 年 9 月 6 日, Hotel Veronika (Seefeld)
 - 28) 真崎雄一, Roles of GBF1 in neutrophil chemotaxis, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009 年 6 月 2 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
 - 29) 三浦浩一, EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009 年 6 月 2 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
 - 30) 毛受暁史, Arf6-AMAP1 pathway in invasion of lung cancer and malignant mesothelioma cell lines, 20th EORTC-NCL-AACR Symposium on

Molecular Targets and Cancer
Therapeutics, 2008 年 10 月 22 日,
Geneva palexpo (Switzerland)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 橋本あり、杉野弘和、橋本茂、佐邊
壽孝、メディカルレビュー社、乳癌レビ
ュー2012 EMT-基礎的観点から, 2011,
7, 29-35

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~g21001/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐邊 壽孝 (SABE HISATAKA)
大学院医学研究科・教授
研究者番号：40187282

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：