

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07104

研究課題名（和文）エンドソーム上でEGFRの分解・リサイクルを決定する新規分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis for determining degradation and recycling of EGFR on endosomes

研究代表者

植村 武文（Uemura, Takefumi）

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80548925

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）：EGFRの運搬についてはエンドサイトーシス経路がこれまでに多くの報告が発表されているが、リサイクリング経路についてはよくわかっていない。本研究ではクラスリンアダプターであるAP-1およびGGA2がEGFRをリサイクリングエンドソームで認識し、そのリサイクリングに関わることを発表した。また、両因子は癌組織の腫瘍部において高発現していることから、腫瘍細胞において両因子の機能が増殖・浸潤に重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：EGFRのリサイクリングの分子基盤はよくわかっていなかったが、本研究によりクラスリンアダプターのAP-1およびGGA2の関与を明らかにした。

社会的意義：分子標的薬によるEGFRの阻害は癌治療の戦略であるが、その使用は数年後に薬剤耐性細胞を伴う。本研究で見出したEGFR阻害は新たな癌治療戦略であり、新たな抗癌剤による癌治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Endocytic pathway of EGFR has been intensively studied. However, recycling pathway of EGFR remains poorly understood. In the present study, I found the role of clathrin adaptors AP-1 and GGA2 in EGFR recycling. They recognize EGFR on the recycling endosomes which is positive for Rab11, and knockdown of each adaptor decreases the recycling rates of EGFR. I also observed the upregulations of AP-1 and GGA2 on endosomal structures in tumors of some cancer tissues, which suggests the importance of AP-1 and GGA2 in growth and invasion of cancer cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：EGFR メンブレントラフィック クラスリンアダプター エンドソーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

EGFR (上皮成長因子受容体) の活性亢進は癌の原因であり、そのチロシンキナーゼ活性を阻害する gefitinib などが抗癌剤として使用されている。メンブレントラフィック/小胞輸送の分野では長年、EGFR の分解機構が研究されてきた: EGF と結合し活性化した EGFR はエンドサイトーシスにより取り込まれ、エンドソームを経てリソソームで分解される。一方、取り込まれた EGFR が再び細胞膜に戻される画分も存在する。この機構 (リサイクル機構) は EGFR 発現に重要であるため、癌病態に関与すると考えられる。EGFR リサイクルはデフォルトと考えられてきたが、Rab11 や Eps15 などの関連因子が同定され、調節性の運搬機構である事が分かってきた。

GGA (Golgi-localized, γ -adaptin ear containing, ARF binding proteins。ヒトでは 3 種) や、ヘテロ 4 量体である AP 複合体 (adaptor protein complex。ヒトでは 5 種) はゴルジ体・エンドソームに発現するクラスリンアダプターであり、リソソーム酵素の選別受容体であるマンノース 6 リン酸受容体 (MPR) など、病態生理学的に重要なカーゴ分子の選別輸送に関与する。申請書は過去に GGA2 が EGFR を認識する事、GGA2 の発現抑制により EGFR のリソソーム分解が亢進する事を発表した (PMID: 29358589, 31659673)。また、EGFR 抗体を用いた免疫沈降法及び質量分析により、EGFR 運搬に関わる因子の同定を試みた。その結果、GGA2 の他に AP1、AP2、AP4、AP5 のサブユニットが EGFR 結合因子として観察された。よって本研究では、EGFR 運搬における GGA や AP 複合体の役割を解析することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、エンドソーム上での GGA2・AP 複合体の機能解析に焦点を絞り、EGFR 運搬機構を明らかにする。EGFR 機能は癌病態に関わる為、癌細胞挙動における GGA2・AP 複合体の関与、ヒト癌組織における発現を解析する。さらに EGFR 運搬をより理解する為、関連分子群の同定を進める。

3. 研究の方法

実験 1. AP 複合体間の比較

ARPE19 細胞に各 AP 複合体のサブユニットに対する siRNA を導入し、ウェスタンブロットにより EGFR 発現への影響を解析した。

実験 2. GGA2・AP1-EGFR 間結合の起こる場所の特定

ARPE19 細胞、H1975 細胞において、AP1-EGFR 間の結合を PLA (proximity ligation assay) により解析した。また、GGA2・AP1-EGFR 間結合の起こる場所の特定するために、GFP-Rab5a、あるいは GFP-Rab11a を発現する ARPE19 細胞において、PLA シグナルとの共局在率を解析した。

実験 3. GGA2・AP1 の局在の相互依存性

ARPE19 細胞において GGA2 あるいは AP1 をノックダウンし、それぞれの細胞内局在を免疫染色により解析した。

実験 4. EGFR 以外の RTK 発現への GGA2・AP1 ノックダウンの影響

ARPE19 細胞、H1975 細胞において GGA2 あるいは AP1 をノックダウンし、surface biotinylation による解析を行った。トータルライゼートと細胞膜画分における各分子の発現をウェスタンブロットにより解析した。

実験 5. GGA2・AP1 ノックダウン細胞における EGFR の取り込みとリサイクルの解析

ARPE19 細胞において GGA2 あるいは AP1 をノックダウンし、surface biotinylation を行った。その後、EGF 有無の条件で培養し、還元剤 (グルタチオン) 処理により EGFR 取り込み率とリサイクル率を解析した。

実験 6. AP1 の癌組織における発現解析

肺癌組織、肝癌組織、大腸癌組織において、AP1 発現を免疫染色により解析した。また福島県立医科大学 乳腺外科学講座との共同研究により、乳癌組織における AP1 発現をウェスタンブロットと免疫染色により解析した。

実験 7. 癌細胞挙動への AP1 ノックダウンの影響

ARPE19 細胞、H1975 細胞、SKBR-3 細胞において、恒常的に AP1 をノックダウンした細胞を

作製し、細胞増殖を解析した。SKBR-3 については Transwell チャンバーと Matrigel invasion チャンバーを用いて移動、浸潤を解析した。またヌードマウスに AP1 ノックダウン H1975 細胞を移植し、1 週ごとに腫瘍のサイズを計測することで腫瘍形成能を解析した。

実験 8. EGFR 運搬に関わる因子の同定

EGFR と結合する因子を免疫沈降実験と質量分析により抽出し、さらに siRNA スクリーニングによって EGFR 発現調節に関わる因子を同定した。

4. 研究成果

実験 8 により、GGA2、AP1、AP3、AP5 を EGFR 結合因子として同定した。GGA2 については以前に我々のグループが EGFR 運搬に関わる因子として報告しており、実験系の確かさは確認された。実験 1 により、AP1、AP3、AP4、AP5 のどれが EGFR 発現に関わるか解析した。その結果として、AP1 ノックダウン細胞では顕著に EGFR 発現が低下することを観察した (図 1)。

実験 4 により、AP1 ノックダウン細胞、GGA2 ノックダウン細胞における EGFR と、AP1・GGA のカーゴとして知られる CIMPR の発現を解析した。AP1 ノックダウン細胞、GGA2 ノックダウン細胞ではトータルライセートおよび細胞膜画分において CIMPR 発現がコントロールに対して増加しているのに対して、EGFR 発現は顕著に減少していた。この結果は、AP1・GGA2 に依存した CIMPR 運搬経路と EGFR 運搬経路は異なるものであることが示唆された。

実験 2 では AP1-EGFR 間結合、GGA2-EGFR 間結合を PLA (proximity ligation assay) により解析した。この手法の利点は結合が起こる場所を可視化できることである。その結果として、どちらも細胞中に分散した PLA 陽性構造が観察された (図 2)。一方で AP1-CIMPR、GGA2-CIMPR の PLA 陽性構造は TGN と思われる核近傍パターンであった。この結果から、AP1・GGA2 は EGFR をエンドソームで認識し、CIMPR を TGN で認識することが示唆された。

AP1 の細胞内発現部位を解析したところ、従来から知られる trans-Golgi network だけではなく、Rab11 陽性のリサイクリングエンドソームにも AP1 が局在する事を見出した。そこで、GFP-Rab5a (初期エンドソームマーカー) あるいは GFP-Rab11a (リサイクリングエンドソームマーカー) を発現する細胞で PLA を行った。AP1・GGA2-EGFR の PLA 構造は Rab5a よりも Rab11a の局在とよく一致しており、この結果は AP1・GGA2 はリサイクリングエンドソームで EGFR を認識することを意味する。

リサイクリングエンドソームは細胞内に取り込まれた分子を再び細胞膜に戻すためのオルガネラである。そこで実験 5 により、AP1・GGA2 ノックダウン細胞における EGFR 取り込みとそのリサイクルを解析した。その結果として、EGFR 取り込みには影響がなかったが、リサイクルは両ノックダウン細胞で低下していた。これは、AP1・GGA2 がリサイクリングエンドソームで EGFR を認識しそのリサイクル経路に関わる事、AP1・GGA2 の機能破綻がリサイクルの低下を引き起こし、EGFR はリソソームに誤って運搬されることを示唆する。

次に AP1・GGA2 の局在の関係性を実験 3 で解析した。GGA2 ノックダウン細胞では核近傍の AP1 発現が増加し、AP1 ノックダウン細胞では核近傍の GGA2 発現が増加した。この結果は AP1・GGA2 がエンドソームに局在するためお互いを必要としていることを示唆する。

AP1・GGA2 の発現抑制が他の RTK (receptor tyrosine kinase) の発現にも影響するか実験

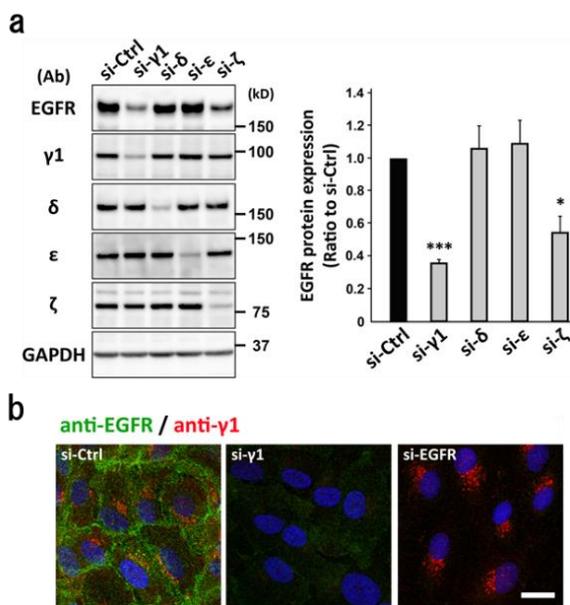


図1. AP1の発現抑制はEGFR量を低下させる。

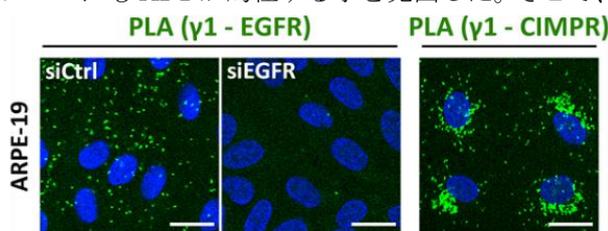


図2. AP1-EGFR間結合はエンドソームで起こる。

4で解析した。ARPE19細胞において、両因子のノックダウンはHer4、METの発現に影響していた。H1975細胞ではMET発現が両因子のノックダウンにより低下し、AP1ノックダウンでIGF1RやEphA2が、GGA2ノックダウンでHer2発現が低下していた。

実験7でAP1ノックダウン細胞の挙動を解析した。H1975細胞に $\gamma 1$ サブユニットに対するshRNAをレンチウイルスにより導入し、恒常的にAP1をノックダウンした細胞を作製し、解析に用いた。細胞増殖はAP1ノックダウンで顕著に低下していた(図3)。またこの細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を解析したところ、AP1ノックダウンでは顕著に低下していた(図3)。

実験6において、腫瘍組織におけるAP1の発現解析を行った。肺癌(非小細胞肺癌のみ)、肝癌、大腸癌の腫瘍部ではAP1発現が亢進しており(図4)、細胞内にAP1陽性構造が分散していた。この構造はTGNマーカーであるTGN46とはあまり一致せず、エンドソームマーカーであるEEA1とよく局在が一致していた。この結果は腫瘍組織内の癌細胞においてもAP1のエンドソーム局在が重要であることを示唆する。

以上の結果をまとめて論文発表した(PMID: 34799560)。

乳癌組織におけるAP1の解析を福島県立医科大学 乳腺外科学講座と共同で行った。

乳癌細胞由来のSKBR-3細胞に $\gamma 1$ サブユニットに対するshRNAをレンチウイルスにより導入し、恒常的にAP1をノックダウンした。この細胞は増殖能、移動能、浸潤能がコントロール細胞に比べて顕著に低下していた(実験7、図5)。

乳癌組織においてAP1発現を解析したところ、腫瘍部で発現が高く、特にKi-67 (high)、ER(-)、PgR(-)、HER2(+)の患者でその傾向が観察された。またAP1の高発現が無再発生存期間の短縮に関連することを見出した。細胞内での局在はTGNマーカーとはあまり一致せず、エンドソームと局在が一致していた(実験6)。これは肺癌、肝癌、大腸癌で観られた傾向と同様であり、癌組織におけるエンドソームAP1機能の重要性が示唆された。

以上の結果をまとめて論文発表した(PMID: 38265632)。

EGFR運搬を明らかにするため、EGFRと結合する因子を免疫沈降・質量分析により抽出し、siRNAスクリーニングにより複数の因子を同定した。今後これらの解析を進め、論文等で発表していく予定である。

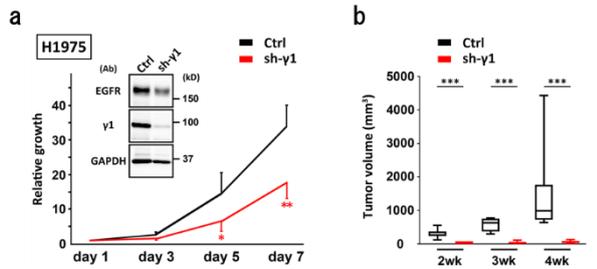


図3. AP1発現抑制はin vitro (a)、in vivo (b)において細胞増殖を低下させる。

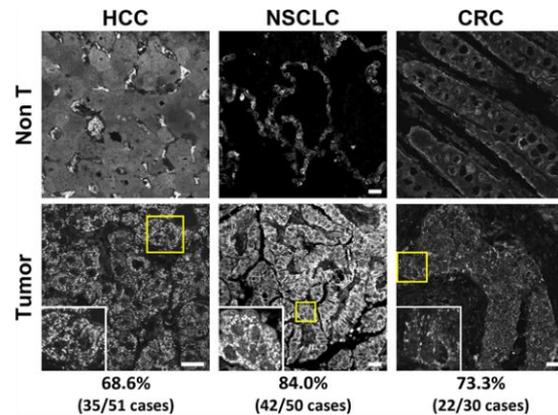


図4. 各癌組織の腫瘍部においてAP1は強く発現する。

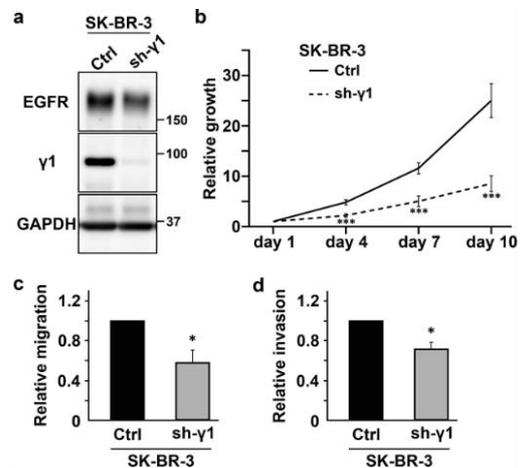


図5. SK-BR-3細胞においてAP1を恒常的に発現抑制すると増殖、移動、浸潤が低下する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Nobuhiro Hoshi, Takefumi Uemura, Kazunoshin Tachibana, Sadahiko Abe, Yuko Murakami-Nishimagi, Maiko Okano, Masaru Noda, Katsuharu Saito, Koji Kono, Tohru Ohtake, Satoshi Waguri | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Endosomal protein expression of 1-adaptin is associated with tumor growth activity and relapse-free survival in breast cancer | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Breast Cancer | 6. 最初と最後の頁 305~316 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-023-01539-1 | 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 Kuchitsu Y, Mukai K, Uematsu R, Takaada Y, Shinojima A, Shindo R, Shoji T, Hamano S, Ogawa E, Sato R, Miyake K, Kato A, Kawaguchi Y, Nishitani-Isa M, Izawa K, Nishikomori R, Yasumi T, Suzuki T, Dohmae N, Uemura T, Barber GN, Arai H, Waguri S, Taguchi T. | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Nature Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 453-466 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-023-01098-9. | 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 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Ishimura R, El-Gowily AH, Noshiro D, Komatsu-Hirota S, Ono Y, Shindo M, Hatta T, Abe M, Uemura T, Lee-Okada HC, Mohamed TM, Yokomizo T, Ueno T, Sakimura K, Natsume T, Sorimachi H, Inada T, Waguri S, Noda NN, Komatsu M. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 The UFM1 system regulates ER-phagy through the ufmylation of CYB5R3. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 7857 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35501-0. | 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 該当する |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Takefumi Uemura, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Satoshi Waguri | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Clathrin adapters AP-1 and GGA2 support expression of epidermal growth factor receptor for cell growth | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncogenesis | 6. 最初と最後の頁 80 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-021-00367-2. | 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 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 植村武文、和栗聡 |
| 2. 発表標題 クラスリンアダプターAP-1複合体によるEGFR発現調節機構 |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 植村武文、和栗聡 |
| 2. 発表標題 クラスリンアダプターAP-1複合体はEGFR発現を調節する |
| 3. 学会等名 第68回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 植村武文、和栗聡 |
| 2. 発表標題 膜交通によるEGFRの寿命調節機構 |
| 3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 植村武文、和栗聡 |
| 2. 発表標題 Recycling endosome-localized clathrin adaptors AP-1 and GGA2 regulate cell surface expression of EGFR for cell growth |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takefumi Uemura, Satoshi Waguri |
| 2. 発表標題 Roles of recycling endosome-localized clathrin adaptors AP-1 and GGA2 in regulation of cell surface expression of EGFR for cell growth |
| 3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会全国学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|