

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500389

研究課題名（和文）*Erc* 欠損による腫瘍増殖の抑制機構および関わるシグナル伝達系の解明研究課題名（英文）The mechanism of loss of *Erc* gene ameliorates renal carcinogenesis and modulates integrin related pathway

研究代表者

張 丹青 (ZHANG DANQING)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40296877

研究成果の概要（和文）：

本研究では *Tsc2* KO マウスにおける *Erc/mesothelin* 欠損により *Tsc2* KO マウス腎腫瘍の増殖や細胞の接着などが抑制されているメカニズムの一部を解明した。*Erc* 産物は細胞膜の脂質ラフトに存在し、Integrin および EGF 受容体のシグナル伝達に関与することを明らかにした。*Erc* 欠損の場合、EGFR の活性化が抑制され、EGF 受容体リン酸化 (Tyr1092) レベルが低下し、エンドサイトーシスの抑制などにより EGFR 蛋白全量が高くなることを判り、*Erc* は EGFR 制御分子の一つとして働いている可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the position of *Erc/mesothelin* in signal pathway, we continue the studies and found that a novel function for *Erc* in the regulation of cell phenotype through controlling EGF receptor phosphorylation (Tyr1092), integrin $\beta 1$ recycling and localization to lipid raft via a specific downstream effector pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験動物学・腫瘍学

科研費の分科・細目：実験動物学・疾患モデル

キーワード：(1) *Erc/mesothelin*; (2) *Tsc2* 遺伝子; (3) GPI アンカー蛋白; (4) ノックアウトマウス; (5) シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Erc (Expressed in renal carcinoma) は遺伝性腎癌 (*Tsc2* 変異) モデル動物の腎腫瘍で発現が誘導される遺伝子であり、ヒトの中皮腫や膵臓癌など悪性腫瘍において特異的に高発現する *Mesothelin* 遺伝子のホモログである。我々はこれまで *Erc* ノックアウト

(KO) マウスと *Tsc2* KO マウスの交配実験において、*Erc* ホモ変異により腎腫瘍の成長が著しく抑制される結果を得ている。また、*Tsc2*; *Erc* 両欠損腎腫瘍細胞株を樹立して実験を進め、*Erc* 発現による細胞-基質接着の増強と Integrin $\beta 1$ 関連シグナル伝達の変化を見出している。

2. 研究の目的

我々は、Erc が細胞接着等の制御に関わることによって腫瘍発生の modifier として働いていると考え、Erc が関わる反応経路が腫瘍発生をコントロールするための標的の一つであると予想している。本研究では *Tsc2* KO と *Tsc2;Erc* ダブル KO マウスおよびその腎腫瘍細胞株を用いて *in vivo* と *in vitro* の実験系を併用し、腫瘍発生・増殖における *Erc/mesothelin* 遺伝子の役割およびメカニズムを解明し、Erc/mesothelin 高発現の悪性腫瘍や中皮腫の治療法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

(1) *Tsc2*ヘテロ変異個体マウス系の作製と退交配

我々が独自に樹立した *Tsc2;Erc* ダブル KO マウスおよび実験関連マウスを C57BL/6 マウスと戻し交配し、遺伝的背景を均一化する。

(2) 病理組織、血清学および免疫染色検査

実験マウスを解剖し、病理標本を作製、免疫染色などを含めて検査する。マウス血清を凍結保存し、血中サイトカインなどを調べる。

(3) *Erc* ノックダウン腎腫瘍細胞株の樹立

Erc を強発現する *Tsc2* ノックアウトマウス由来の腎腫瘍細胞株に、*Erc* 発現抑制のための shRNA を導入し、安定細胞株を樹立する。上記の細胞株をヌードマウスに移植し、造腫瘍能の変化を調べる。

(4) *Erc* の局在とシグナル伝達の解析

トリトン X-100 処理した細胞ホモジェネートのショ糖密度勾配遠心による低密度画分に回収された蛋白を用いて *Erc* 産物の脂質ラフトの存在および他の蛋白のシグナル伝達関連をウェスタンブロット法により解析する。

(5) RT-PCR およびリアルタイム PCR および GeneChip 解析

Erc 関連細胞株を用いて、mRNA 転写レベルへの影響を調べる。

4. 研究成果

(1) *Erc* 欠損による *Tsc2* KO マウス腎腫瘍の抑制

Tsc2 KO マウスは18ヶ月齢では直径 \geq 3mmの腎腫瘍が 58.8%に発生したのに対して、*Tsc2* KO;*Erc* $-/-$ では 8.6%に発生し、著しく抑制されることを示した (Fig. 1. A, B)。細胞増殖マーカーの Ki67 陽性細胞が減少し、アポトーシス細胞が増加することを示した (Fig. 1. C, D)。

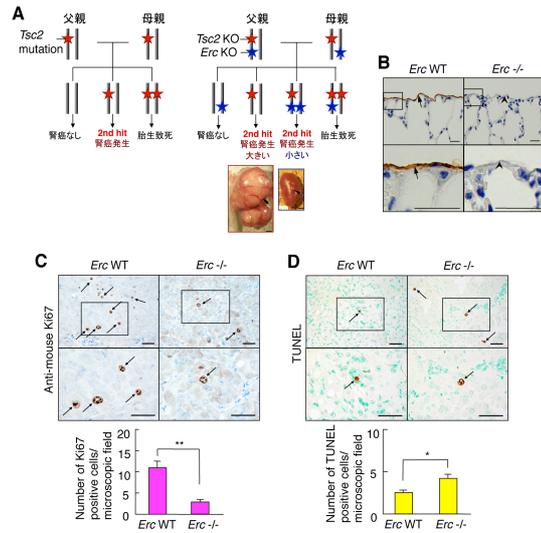


Fig. 1. *Tsc2* KO mice and *Tsc2;Erc* double KO mice

A, 交配実験により、*Tsc2* KO マウスに *Erc* 遺伝子欠損の遺伝的背景を導入すると、腎腫瘍のサイズが抑制された。B, 抗 *Erc* 抗体による免疫組織染色 (肺)。矢印は中皮部位の *Erc* 陽性を示す。C, *Erc* 欠損による腎腫瘍細胞増殖能の低下および D, 細胞死の亢進を示す。矢印は Ki67 陽性細胞 (C) およびアポトーシス細胞 (D) を示す。

(2) *Tsc2* KO 腎腫瘍細胞株の造腫瘍能における *Erc* 遺伝子の影響

腎腫瘍細胞株をヌードマウス皮下へ移植する実験において、*Erc* ノックダウン腫瘍細胞の増殖がコントロール細胞に比べ著しく抑制される傾向を示した (Fig. 2)。

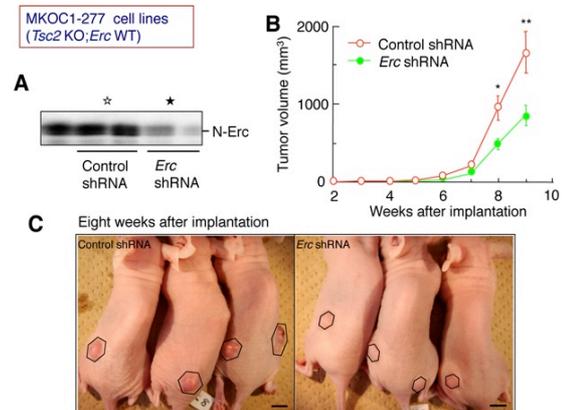


Fig. 2. Influence of *Erc*-suppressed on tumorigenic phenotype by *Tsc2*-deficient *Erc* WT cells in nude mice

shRNA による *Erc* 発現抑制 (A) と移植実験における *Erc* 抑制による造腫瘍能の低下 (B, C) を示す。

(3) *Erc* 発現による細胞接着性への影響と Akt シグナル伝達系の関連

Tsc2/Erc 両欠損腎腫瘍細胞株に *Erc* を強発現させた場合、コラーゲンコートプレートに

に対する細胞接着が強くなり、Wortmannin 或いは Akt 阻害剤により Akt リン酸化を抑制した場合に細胞接着性が低下することを示した (Fig. 3)。Erc はインテグリンの下流シグナル、PI3K-Akt シグナルを活性化して、細胞の接着性を増強する。この働きを通じて、腫瘍の発生や進展を促進している可能性が示唆された。

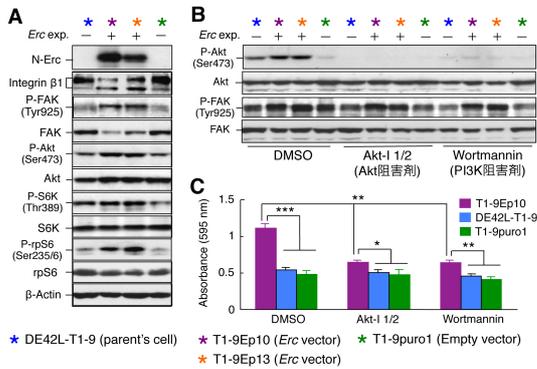


Fig. 3. Cell adhesion was decreased by treated with Akt inhibitors

A, Erc 発現によるインテグリンおよびその下流の蛋白リン酸化への影響を示す。B と C, Akt リン酸化の抑制 (B) による細胞接着性の低下 (C) を示す。

(4) Erc 発現による EGF 受容体への影響

Tsc2;Erc 両欠損腎腫瘍細胞株に *Erc* を強発現させた場合、上皮成長因子受容体 (EGFR) 蛋白全量は著しく減少するが、リン酸化 (pTyr1092) のレベルが高くなることがわかった。一方、高濃度 EGF より刺激した場合は *Erc* を強発現させた場合と同じ傾向を示した。リアルタイム PCR および GeneChip 解析した結果、mRNA の変動が EGFR 蛋白全量レベルの変動と一致することを確認した。(Fig. 4)。

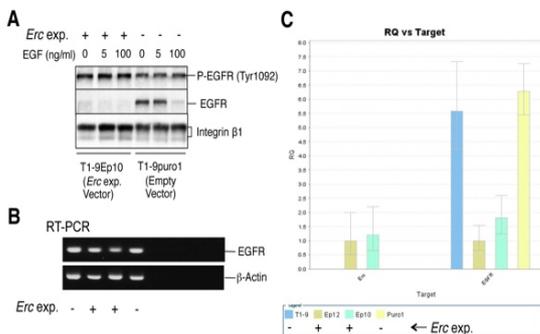


Fig. 4. Effects of Erc expression on EGFR in renal tumor cell lines from *Tsc2*^{+/-} mice

Erc 強発現による EGF 受容体蛋白量の低下および EGF 受容体リン酸化の増強 (A) と *Erc* 欠損による EGF 受容体 mRNA の低下 (B, RT-PCR; C, リアルタイム PCR) を示す。

(5) Erc 発現による脂質ラフト蛋白の変化

脂質ラフトは細胞膜に存在する流動的なマイクロドメインであり、細胞膜における情報伝達の中心的な部位である可能性が示唆されている。トリトンX-100処理した細胞ホモジェネートをショ糖密度勾配遠心によって分画し、ウェスタンブロット法より解析した結果、Erc は脂質ラフトに存在することが判り、Erc を強発現した場合にリン酸化 (Tyr1092) EGFR のレベルと Integrin β 1 の発現が高くなる傾向が示唆された。一方、EGFR 蛋白全量の差は認めなかった (Fig. 5)。

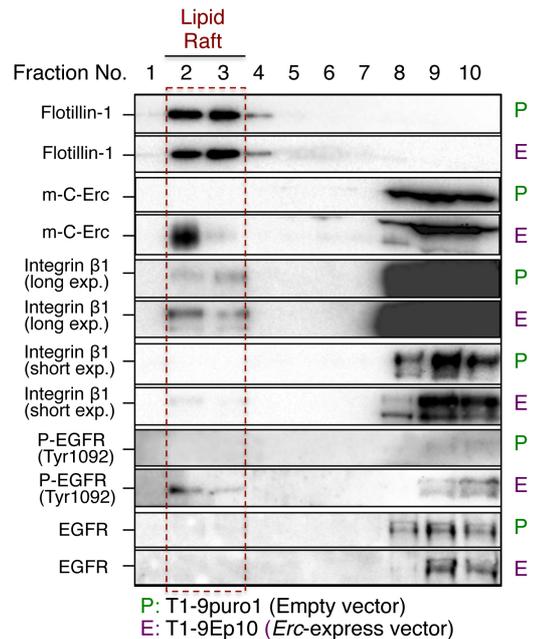


Fig. 5. Influence of *Erc*-express in lipid raft
ショ糖密度勾配遠心による低密度画分に回収された蛋白 (レーン 1 ~ 10) の内レーン 2 と 3 は脂質ラフトの蛋白である。Flotillin-1 は脂質ラフトのマーカーである。各抗体は左に示している。同じ抗体の上段は *Erc* 欠損、下段は *Erc* 発現細胞の蛋白である。

考察

以上の結果より、*Erc* は EGFR 制御分子の一つとして働いている可能性が示唆され、*Erc* 欠損の場合、EGFR 活性化が抑制され、エンドサイトーシスの抑制などにより EGFR 蛋白全量が高くなることが予想される。また、*Erc* は脂質ラフトに存在することが、密度勾配遠心による細胞分画法を用いて確認することができた。*Erc* 発現細胞は脂質ラフトにおける Integrin およびリン酸化 EGF 受容体のレベルが強い傾向を示した。これらの結果は、我々が以前得た *Erc* の Integrin 及びその下流の PI3K-Akt シグナルへの影響 (Zhang D, et al. Cancer Sci. 2011;102:720-7.) に関連するものと考えられ、*Erc* は脂質ラフトを介

して、Integrin および EGF 受容体リン酸化など、シグナル伝達系に重要な分子の動態変化を惹起することが推察される。細胞内外に情報を伝達し、細胞接着の制御などに機能を発揮していることが予想された (Fig. 6)。

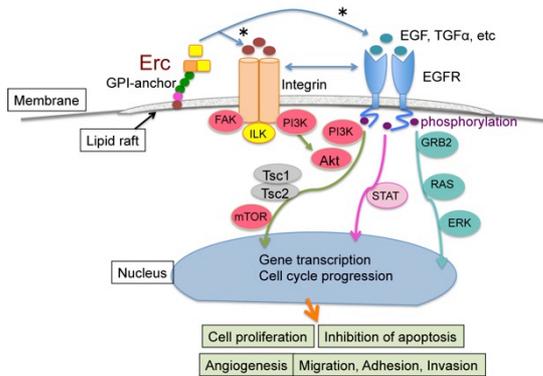


Fig. 6. Hypothesis of the role of Erc with Integrin and EGFR in lipid raft
細胞膜の脂質ラフトにおける Erc と Integrin および EGF 受容体のシグナル伝達 (仮説) を示す。

今後の課題

Erc シグナル伝達系の解明は、腫瘍発生に関連する新たなシグナル伝達系の解明に繋がる可能性があると考えられる。将来的には Erc 発現の制御機構に関わる因子を分子標的とした薬剤の開発を進め、ヒトのがんや悪性中皮腫のみならず TSC2 遺伝子変異を原因とする結節性硬化症の治療・予防の開発に貢献できるものと期待され、疾患の克服に寄与する。自ら作製した Tsc2;Erc ダブル KO と Tsc2 KO マウスおよびその腎腫瘍細胞株を用いて、マルチプレックスサスペンションアレイによるマウス血中 VEGF などサイトカインの動態変化を解析する。Erc 発現によって生ずるシグナル伝達系の変化に関して、脂質ラフトにおける Erc と EGFR および integrin など細胞接着制御分子の関連を明らかにし、Erc シグナル伝達経路の同定を行う。さらに Gene tip Exon Array による Erc 発現の有無により変化する遺伝子の同定し、リアルタイム PCR で mRNA レベルを確認し、治療標的の経路を追求する。

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 10 件)

① Okura H, Kobayashi T, Zhang D, Hino O, et al. Tuberin activates and controls the distribution of Rac1 via

association with p62 and ubiquitin through the mTORC1 signaling pathway. Int J Oncol. 査読有, 掲載決定, 他 4 名, 2, 5 と 8 番目. 2013; x:xxxxx. doi: 10.3892/ijo. xxxxxxxx.

② Kawai A, Kobayashi T, Hino O. Folliculin regulates cyclin D1 expression through cis-acting elements in the 3' untranslated region of cyclin D1 mRNA. Int J Oncol. 査読有, 2013; 42(5):1597-604. doi: 10.3892/ijo.2013.1862.

③ Ohsawa M, Kobayashi T, Hino O, et al. TSC1 controls distribution of actin fibers through its effect on function of Rho family of small GTPases and regulates cell migration and polarity. PLoS One. 査読有, 他 3 名, 2 と 6 番目. 2013; 8(1):e54503. doi: 10.1371/journal.pone.0054503.

④ Zhang D, Kobayashi T, Hino O, et al. Deficiency of the *Erc/mesothelin* gene ameliorates renal carcinogenesis in Tsc2 knockout mice. Cancer Sci. 査読有, 他 8 名, 1, 2 と 13 番目. 2011; 102(4):720-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01846.x.

⑤ Wang L, Kobayashi T, Zhang D, Hino O, et al. Serine 62 is a phosphorylation site in folliculin, the Birt-Hogg-Dubé gene product. FEBS Lett. 査読有, 他 11 名, 2, 8 と 15 番目. 2010; 584(1):39-43. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.033.

⑥ Kokubo T, Kobayashi T, Hino O, et al. Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model. Cancer Sci. 査読有, 他 7 名, 3 と 9 番目. 2010; 101(3):616-23. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01456.x.

⑦ Inoue H, Hino O, Kobayashi T, et al. Phosphorylated hamartin-Hsp70 complex regulates apoptosis via mitochondrial localization. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 他 7 名, 5 と 6 番目. 2010; 391(1):1148-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.054.

⑧ Tan K, Hino O, Fujii H, et al. Mesothelin (MSLN) promoter is hypomethylated in malignant mesothelioma, but its expression is

- not associated with methylation status of the promoter. *Hum Pathol.* 査読有, 他 9 名, 11 番目. 2010; 41(9):1330-8. doi: 10.1016/j.humpath.2010.03.002.
- ⑨ Wang T, Kajino K, Hino O, et al. Suppression of cell death by the secretory form of N-terminal ERC/mesothelin. *Int J Mol Med.* 査読有, 他 6 名, 9 番目. 2010; 26(2):185-91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596597>
- ⑩ Inami K, Abe M, Hino O, et al. Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 査読有, 他 6 名, 9 番目. 2010; 101(4):969-74. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01463.x.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 小橋 (張) 丹青ら、Reduced the phosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor in *Erc*-deficient renal tumor cells of *Tsc2* KO mice. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌、札幌
- ② 小橋 (張) 丹青ら、Loss of *Erc/mesothelin* gene reduced the phosphorylation of EGFR and modulates PI3K-Akt pathway in renal tumor cells of *Tsc2* KO mice. 第 26 回モロシヌス研究会、2012 年 6 月 15 日、東京大学弥生講堂、東京
- ③ 小橋 (張) 丹青ら、Loss of *Erc/mesothelin* gene decreased the growth of renal tumors in *Tsc2* KO mice and modulates PI3K-Akt 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、横浜
- ④ 大倉英浩ら、TSC2 positively regulates activity and controls intracellular localization of Rac1 through mTORC1 signaling 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、横浜
- ⑤ 大倉英浩ら、mTOR による Rac 活性および細胞内局在制御機構. 第 70 回脳神経外科学術総会、2011 年 10 月 12 日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑥ 小橋 (張) 丹青ら、Enhancement of cell adhesion by *Erc/mesothelin* through modulation of PI3K-Akt pathway in *Tsc2* KO mice renal tumor 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、名古屋

- ⑦ 小橋 (張) 丹青ら、Loss of *Erc/mesothelin* gene decreased the growth of renal tumors in *Tsc2* knockout mice. The 4th AFLAS Congress Meeting、2010 年 11 月 9 日、台北国際会議センター、台北、中国台湾
- ⑧ 小橋 (張) 丹青ら、*Erc/mesothelin* gene regulates the growth of renal tumors in *Tsc2* KO mice and modulates integrin pathway. 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
- ⑨ 大倉英浩ら、Functional relationship between Rac activation and Rheb-GAP activity of tuberin. 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
- ⑩ 松岡周二ら、Complete blockade of LPS-induced endotoxin shock by cytolytic anti-MHC class I a2 domain monoclonal antibody RE2. 14th International Congress of Immunology. 2010 年 8 月 22 日、神戸国際会議場、神戸
- ⑪ 小橋 (張) 丹青ら、Loss of *Erc* gene ameliorates renal carcinogenesis and modulates integrin pathway in *Tsc2* KO mouse. 第 99 回日本病理学会総会. 2010 年 4 月 27 日、京王プラザ (新宿)、東京

[その他]

ホームページ

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/labobunshi_byori/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張 丹青 (ZHANG DANQING)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 40296877

(2) 研究分担者

小林 敏之 (KOBAYASHI TOSHIYUKI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 40260070

(3) 研究分担者

樋野 興夫 (HINO OKIO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 90127910