

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590382

研究課題名(和文) サイトカインシグナルによる乳腺細胞の腺房構築異常とがん化との関連

研究課題名(英文) Role of growth factor and cytokine signaling in the determination of mammary epithelial cell characteristics

研究代表者

福田 信治 (Fukuda, Shinji)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：70398238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺細胞の増殖、分化、細胞死が正確に制御されることで、正常な腺房が形成される。またその制御の破綻によって、腺房や乳管を構成する細胞が過剰な増殖能や細胞死抵抗性を獲得すると乳がんを形成する。本研究では、乳腺細胞の性質を制御する上皮増殖因子群などがヒト不死化乳腺上皮細胞MCF10Aの性質を決定する分子機構を解析した。本研究によって、細胞内シグナル経路の活性化強度が乳腺細胞の形質決定や可塑性制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The family of EGF ligands and the EGF receptor (EGFR) signaling system is crucial for numerous physiological and pathological events. EGF and amphiregulin (AREG) share a common EGFR, but they are capable of inducing distinctly different biological outcomes. Here, we found that EGF and AREG reversibly interconverted two distinct phenotypes of MCF10A. They differed in the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers, the mode of cell migration and the ability for acinus-formation. We also found that ligand-switching between EGF and AREG transiently altered the integrated signal strength of the shared EGFR-MEK1-ERK2 pathway, thereby reversing the relative expression levels of a downstream EMT regulator, ZEB1, miR-205 and miR-200c. These results suggest that cognate EGFR ligands sharing the same signaling molecules could reversibly interconvert mammary epithelial cell phenotypes through the control of signal strength.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：乳腺細胞 EGF受容体 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

乳腺の腺房(acini)は、妊娠を機に発達して授乳終了に伴い退縮するというリモデリングを繰り返す組織である。乳腺細胞の増殖、分化、細胞死が正確に制御されることで、正常な腺房が形成されるが、この制御が破綻して、腺房や乳管を構成する細胞が過剰な増殖能や細胞死抵抗性を獲得すると乳がんとなる。これまで乳がんの細胞株や組織を用いた研究が盛んに行われてきた。一方で、正常な乳腺上皮細胞の形質解析や腺房組織構築の過程については、未だ不明な点が多い。したがって、腺房形成の過程を正確に理解し、どの分子機構が破綻することによってがんが引き起こされるのかを解明することが不可欠である。

2. 研究の目的

ヒト正常乳腺細胞MCF10Aの3次元培養系は、生体における腺房構築やがん化過程をin vitroで再現できるモデルである。私は、MCF10Aに上皮増殖因子epidermal growth factor(EGF)やその類縁因子amphiregulin(AREG)、またSTATファミリーのサイトカインInterferon-gamma(IFN γ)やInterleukin-6(IL6)を添加すると、MCF10Aが異なる表現型を示すことを見出した。本研究では増殖因子やサイトカインが、乳腺上皮細胞の形質決定や腺房の組織構築に果たす役割の解明を目的とした。

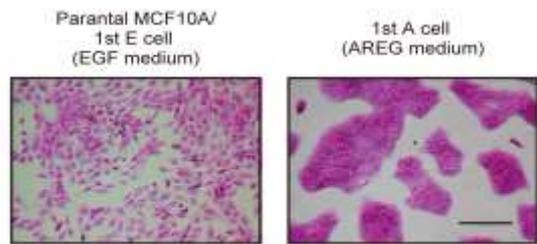
3. 研究の方法

不死化乳腺上皮細胞MCF10Aは増殖するためにEGFを必要とする細胞である。まず、構造的に類似した増殖因子AREGがEGFの増殖機能を代替できるかを検討した。次に、表現型の解析として、DNAマイクロアレイ解析を行い、得られた情報を元に、上皮・間葉のマーカー分子を用いた免疫染色で細胞の形質について検討を行った。また、MCF10Aをマトリゲル上で3次元培養し、腺房様構造の構築能、及び、構築された構造の解析を行った。

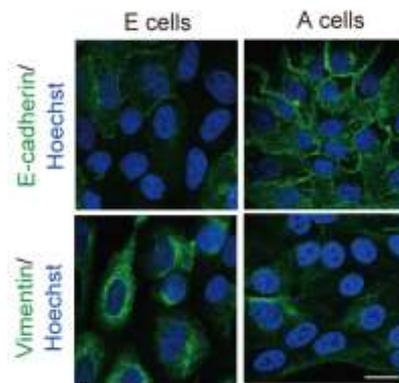
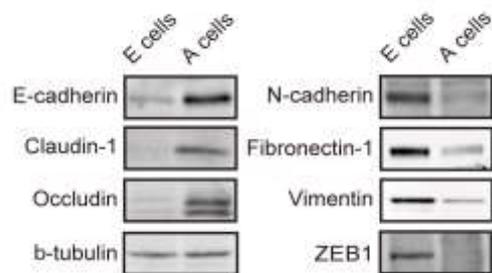
4. 研究成果

(1) EGFとAREGは異なる表現型の上皮細胞集団を生み出す

AREGはEGFと同様にEGF受容体に結合して細胞内シグナル伝達経路を活性化する。ただしEGF受容体に対する親和性はEGFと比較して、AREGの方が10倍以上低いことが知られている。私はEGFと等モルのAREGを培地に添加し、細胞増殖が維持できるかどうかを確認した。その結果、確かにMCF10はAREGで維持できることが分かった。興味深いことに、両因子で培養した細胞は、表現型が明らかに異なるものであった。



表現型の違いを解析するため、マイクロアレイ解析を行ったところ、EGFで培養した細胞集団では、相対的に間葉細胞マーカー(N-cadherin, vimentinなど)の発現量が高く、AREGで培養した細部尾集団は上皮細胞マーカー(E-cadherin, claudinなど)の発現量が高いことが分かった。

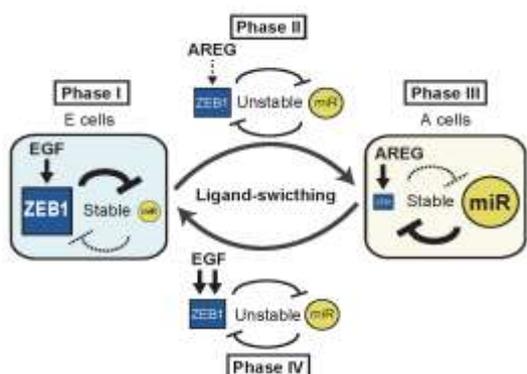


(2) EGFとAREGが誘導する表現型変化は可逆的に制御できる

AREGで強い上皮の表現型を呈したMCF10Aについて、培地を再度EGF含有のものに戻したところ、当初の間葉様細胞の表現型を呈することが分かった。またEGFとAREGの切り換えは表現型の変化を複数回に渡って繰り返すことが可能であった。これらの特性は乳腺細胞が本来持っている可塑性によるものである可能性が考えられた。

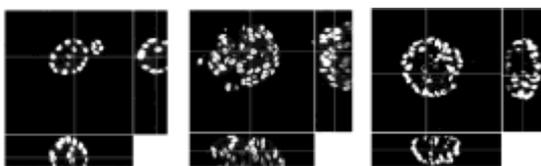
(3) EGF と AREG は共通の EGF 受容体-MAP キナーゼ細胞内シグナル伝達経路を介して、異なる表現型を導く

EGF と AREG が活性化する EGFR-MAP キナーゼ経路について解析した。その結果、EGF が EGFR 経路を強く活性化する一方で、AREG による活性化の程度は非常に弱く、この結果、上皮間葉転換の制御因子である ZEB1 の発現量変化がもたらされ、最終的に、上皮・間葉という形質が決定されていることが明らかになった。下記がモデル図である(福田信治、論文投稿中)。



(4) IL-6 と IFN γ は異常な腺房様構造を形成させる

MCF10A をマトリゲル上で培養し、腺房様構造の形態を観察した。下記左図が EGF のみで培養した結果である。これに対して、IFN γ を添加すると内腔にも細胞が存在する異常な構造を示すことが分かった(下記図、中央)。IL-6 を添加した場合、下記図右に示すように、サイズの大きな腺房様構造が形成された。IFN γ あるいは IL6 単独では腺房形成活性がなく、腺房形成には EGF ファミリーの増殖因子が必要なことから、STAT 経路の作用点は EGF 受容体 (EGFR) 経路上に存在すると考えられた。この点については、解決すべき今後の課題として検討する必要がある。



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 Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, Lu ZG,

Fukuda S, Higashiyama S, Ono M, Yoshida K. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 14;111(2):717-22.

doi: 10.1073/pnas.1313675111. Epub 2013 Dec 30. PubMed PMID: 24379358; PubMed Central PMCID: PMC3896180. 査読有

② Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, Ebi M, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T. Annexin A2 regulates a disintegrin and metalloproteinase 17-mediated ectodomain shedding of pro-tumor necrosis factor- α in monocytes and colon epithelial cells. Inflamm Bowel Dis. 2013 Jun;19(7):1365-73. doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f43a. PubMed PMID: 23702712. 査読有

③ Miwa D, Sakaue T, Inoue H, Takemori N, Kurokawa M, Fukuda S, Omi K, Goishi K, Higashiyama S. Protein kinase D2 and heat shock protein 90 beta are required for BCL6-associated zinc finger protein mRNA stabilization induced by vascular endothelial growth factor-A. Angiogenesis. 2013 Jul;16(3):675-88. doi: 10.1007/s10456-013-9345-x. Epub 2013 Mar 21. PubMed PMID: 23515950. 査読有

④ Nakayama H, Fukuda S, Matsushita N, Nishida-Fukuda H, Inoue H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. Human antigen R-mediated mRNA stabilization is required for ultraviolet B-induced autoinduction of amphiregulin in keratinocytes. J Biol Chem. 2013 Apr 12;288(15):10338-48. doi: 10.1074/jbc.M112.417527. Epub 2013 Feb 21. PubMed PMID: 23430747; PubMed Central

PMCID: PMC3624417. 査読有

⑤ Shimura T, Yoshida M, Fukuda S, Ebi M, Hirata Y, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T. Nuclear translocation of the cytoplasmic domain of HB-EGF induces gastric cancer invasion. BMC Cancer. 2012 May 30;12:205. doi: 10.1186/1471-2407-12-205. PubMed PMID: 22646534; PubMed Central PMCID: PMC3414754. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① EGF ファミリーの増殖因子による乳腺細胞の細胞間接着制御機構 ポスター発表
福田 信治, 福田(西田)尚代, 東山 繁樹
第 37 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜
2014 年 11 月 25-27 日
- ② EGF 受容体シグナルによる乳腺細胞の可逆的な表現型変換の制御機構解析 ポスター発表
福田(西田) 尚代, 福田 信治, 東山 繁樹
第 37 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜
2014 年 11 月 25-27 日
- ③ The EGF family growth factors generate distinct mammary cell types through the regulation of EGFR signaling pathway ポスター発表
Shinji Fukuda, Nishida-Fukuda Hisayo, Shigeki Higashiyama
プロテイン・アイランド・松山 国際シンポジウム 2014 愛媛大学 南加記念ホール
2014 年 9 月 16-17 日
- ④ Signal strength generated by the EGF family of growth factors regulates epithelial and mesenchymal-like characters of mammary cells ポスター発表
Nishida-Fukuda Hisayo, Shinji Fukuda, Shigeki Higashiyama
プロテイン・アイランド・松山 国際シンポジウム 2014 愛媛大学 南加記念ホール
2014 年 9 月 16-17 日
- ⑤ EGF 受容体シグナル伝達経路の活性化強度変動による乳腺細胞間接着制御機構 口頭発表
福田 信治, 福田(西田) 尚代, 東山 繁樹
第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 愛媛大学 南加記念ホール
2014 年 6 月 6-7 日
- ⑥ EGF ファミリー増殖因子-EGF 受容体シグナル伝達経路が制御する乳腺細胞形質の可逆的な変換機構 口頭発表
福田(西田) 尚代, 福田 信治, 東山 繁樹
第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 愛媛大学 南加記念ホール
2014 年 6 月 6-7 日
- ⑦ 遺伝子導入技術を用いた細胞間接着制御機構の解析 口頭発表
福田 信治
先端医療とプラズマ医療 公開研究会 愛媛大学 メディアホール
2014 年 3 月 22 日
- ⑧ EGF 受容体シグナルと乳腺上皮細胞間接着 口頭発表
福田 信治
第 21 回 愛媛オンコロジーフォーラム ホテル JAL シティ松山
2014 年 2 月 28 日 招待講演
- ⑨ EGF 受容体シグナルの活性化強度による乳腺細胞間接着の制御機構 ポスター発表
福田 信治, 福田(西田)尚代, 東山 繁樹
第 10 回宮崎サイエンスキャンプ シーガイヤコンベンションセンター
2014 年 2 月 14-16 日
- ⑩ G protein-coupled receptor 56 (GPR56) によるヒト培養乳腺細胞の増殖・運動能制御機構 ポスター発表
越智仁美, 福田(西田)尚代, 吉本彩花, 福田 信治, 東山 繁樹
第 36 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3-6 日
- ⑪ ヒト培養乳腺細胞における G protein-coupled receptor 56 (GPR56) の発現解析 ポスター発表
吉本彩花, 福田(西田)尚代, 越智仁美, 福田 信治, 東山 繁樹
第 36 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3-6 日
- ⑫ RNA 結合蛋白質 Human antigen R による膜型増殖因子 Amphiregulin の mRNA 安定化機構の解析 口頭発表
福田 信治, 中山寛尚, 松下夏樹, 福田(西田)尚代, 井上博文, 白方裕司, 橋本公二, 東山 繁樹
第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会 徳島大学大塚講堂
2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日 (優秀研究賞受賞)
- ⑬ HuR-mediated mRNA stabilization is required for UVB-induced autoinduction of

AMPHIREGULIN in keratinocytes ポスター
一発表

福田 信治, 中山寛尚, 松下夏樹, 福田
(西田)尚代, 井上博文, 白方裕司, 橋本
公二, 東山 繁樹

第35回日本分子生物学会 福岡国際会議
場

2012年12月11-14日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 信治 (Fukuda, Shinji)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
講師
研究者番号: 70398238

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (Higashiyama, Shigeki)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
教授
研究者番号: 60202272

武森 信暁 (Takemori, Nobuaki)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
講師
研究者番号: 40533047

(4) 研究協力者

福田 尚代 (Fukuda, Hisayo)
愛媛大学・医学部・研究員