

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670143

研究課題名(和文) エクトドメイン・シェディングの「ゆらぎ」解析とがん細胞動態予測への応用

研究課題名(英文) Study on the fluctuation of ectodomain shedding and its application to predict cancer cell dynamics

研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA, SHIGEKI)

愛媛大学・プロテサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エクトドメイン・シェディングの「ゆらぎ」とがん細胞の形質転換の「ゆらぎ」との相関を検討した。MCF-7乳癌細胞株より2クローン(#5と#8)を樹立し、各々のproHB-EGFシェディング活性と細胞形質転換との相関性を解析した。その結果、シェディング活性が強い細胞は上皮細胞様形態を維持する一方、弱い細胞は線維芽細胞様形態に変化することがわかった。以上の結果は、proHB-EGFのエクトドメイン・シェディングの「ゆらぎ」が癌細胞の形質転換に関与している可能性を強く示唆している。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the relation between phenotypic transition of tumor cells and ectodomain shedding activity of membrane-anchored growth factor proHB-EGF in breast tumor MCF-7 cells. We established two MCF-7 clones and further analyzed. One (clone #8) mostly generated epithelial-like colonies, while the other (clone #5) produced both epithelial- and fibroblast-like colonies. We demonstrated that proHB-EGF was more shed in breast tumor MCF-7 cells with epithelial-like morphology than those with fibroblast-like morphology. We speculate that ectodomain shedding of proHB-EGF could be associated with morphological phenotype transition of breast tumor cells.

研究分野：医科学一般

キーワード：エクトドメイン・シェディング がん細胞不均一性

1. 研究開始当初の背景

がん細胞形質の転換は、がん組織におけるがん細胞の多様性を生み出し、がんの治療を困難にしている。この細胞形質の多様性は、個々のタンパク質やタンパク質群の産生量の確率論的な「ゆらぎ」が原因の一つと考えられる。細胞膜タンパク質の翻訳後修飾の一つであるエクストドメイン・シェディングは、膜タンパク質の細胞外領域が、プロセシング酵素によって切断され遊離する現象であり、生体内において厳密に制御され、その破綻は多くの疾患の原因となっている。このシェディング活性そのものも、確率論的な「ゆらぎ」を含んでいると考えられる。シェディングの「ゆらぎ」とがん細胞の形質転換の「ゆらぎ」の相関性が見出されれば、シェディングの制御による新たな抗がん治療法の開発につながる可能性がある。

近年、タンパク質産生量の確率論的な「ゆらぎ」と、特にがん細胞で顕著である細胞形質転換の確率論的な「ゆらぎ」が注目されている。本研究では、タンパク質産生量と細胞形質の「ゆらぎ」をつなぐものとして、膜型細胞増殖因子のエクストドメイン・シェディングの「ゆらぎ」が関係していると仮定して、シェディングの「ゆらぎ」とがん細胞の形質転換の「ゆらぎ」に相関関係があるかを調べた。

2. 研究の目的

がん細胞形質の転換は、がん組織におけるがん細胞の多様性を生み出し、がんの治療を困難にしている。この細胞形質の多様性は、個々のタンパク質やタンパク質群の産生量の確率論的な「ゆらぎ」が原因の一つと考えられる。本研究では、タンパク質複合体によって行われる膜タンパク質の細胞外領域切断「エクストドメイン・シェディング」活性の「ゆらぎ」に注目し、その「ゆらぎ」の定量解析法の開発と、乳がん細胞の確率論的な細胞形質転換（細胞形質の「ゆらぎ」）との相関性を明らかにする。本研究は、ある細胞活性の「ゆらぎ」に注目することで、細胞集団内における細胞形質の多様性を説明し、また制御しようという極めて独創的な試みであり、成功した場合は、全く新しいがん治療や予後診断法の開発に繋がる。

3. 研究の方法

ヒト乳がん細胞への Fluhemb の導入とクローンの樹立

本研究では、ヒト乳がん細胞として MCF-7 株を用いる。レンチウイルス・ベクターを用いて、proHB-EGF のシェディングをイメージングによって定量可能な蛍光プローブ

Fluhemb (*Inoue et al. J. Biochem., 2013*)を導入する。「ゆらぎ」の定量化には、ゲノム情報が均一な細胞集団が必要であることから、Fluhemb の発現量が比較的高く、細胞膜上での分布が見やすいクローンを選択し、ゲノム情報が均一な細胞集団を樹立する。

シェディング「ゆらぎ」の定量化解析と細胞動態解析

Fluhemb は、proHB-EGF の細胞外領域に赤色蛍光タンパク質である mCherry、細胞内領域に緑色蛍光タンパク質である AzamiGreen が挿入された構造をしている。proHB-EGF のエクストドメイン・シェディングによって、細胞外領域が遊離するので、mCherry の蛍光量が減弱し、AzamiGreen との蛍光強度比を取ることで、エクストドメイン・シェディングが定量可能である。そこで、蛍光顕微鏡下で、乳がん細胞の各クローン集団内の個々のシェディング活性を定量化し、シェディングの「ゆらぎ」と増殖能や遊走能などの細胞動態の相関を、タイムラプス・イメージングによって明らかにする。

FACS によるシェディング「ゆらぎ」の定量化解析

Fluhemb を導入した乳腺上皮細胞及び乳がん細胞の各クローン集団を、フローサイトメーターによって mCherry と AzamiGreen の発現量で展開することで、シェディング活性の異なる細胞集団をそれぞれ単離することが可能である。この実験を繰り返すことで、あるシェディング活性を持った細胞集団の、長期的なシェディング活性の「ゆらぎ」に関して知見を得ることができる。すなわち、シェディング活性の「ゆらぎ」が、何らかの機構によって長期的に固定化されるものなのか、または、あるシェディング活性を持つ細胞集団は、次世代では元のシェディング「ゆらぎ」を持った細胞集団と全く同じ「ゆらぎ」幅を持つようになるのかを解析する。

シェディングの「ゆらぎ」と細胞形質の「ゆらぎ」

乳がん細胞株は、表面抗原である CD24、CD44、EpCAM の発現パターンによって、細胞形質を以下のように分類することが可能である。

- Stem (like) type = CD24^{hi}/CD44^{neg}/EpCAM^{hi}
- Basal type = CD24^{hi}/CD44^{neg}/EpCAM^{neg}
- Luminal type = CD24^{lo}/CD44^{hi}/EpCAM^{hi}

そこで、ヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞を、まず、上記表面抗原に対する抗体を用いた

FACS 解析から細胞形質によって分離する。その後、細胞形質ごと (Stem, Basal, Luminal) に、今度はシェディング“ゆらぎ”の強弱に応じた細胞集団を FACS により分離し、その後、培養して各細胞集団を増幅させた後、それぞれの細胞集団の細胞形質の“ゆらぎ”を明らかにする。上記の研究から、細胞形質転換とシェディング活性の相関を明らかにし、細胞形質の“ゆらぎ”とシェディング“ゆらぎ”の関連性を検証する。

4. 研究の成果

ヒト乳がん細胞への Fluhemb の導入とクローンの樹立

ヒト乳がん細胞として MCF-7 株に、レンチウイルス・ベクターを用いて、proHB-EGF のシェディングをイメージングによって定量可能とする蛍光プローブ Fluhemb (Figure 1) を導入し、スパースに播種したディッシュ上でコロニー形成を促進した。

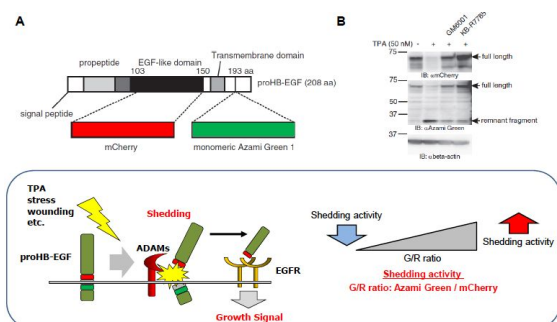


Figure 1. The fluorescent proHB-EGF-based metalloprotease biosensor Fluhemb. (A) Structure of Fluhemb. (B) After serum starvation, Fluhemb-HT1080 cells (human fibrosarcoma cells) were stimulated by TPA (50 nM) for 60 min. For metalloprotease inhibition, the cells were treated with 20 μ M of GM6001 or KB-R7785 for 30 min before TPA stimulation. The whole-cell lysate was analyzed using SDS-PAGE and western blotting. Fluhemb was detected by anti-mCherry or anti-mAG antibodies. Detection of beta-actin was used as a loading control. The images were obtained by fluorescent microscopy, and signal intensity of Azami Green and mCherry on the plasma membrane (free edge and cell-cell contact sites) was measured with Fiji software. Shedding activity was shown as G/R ratio (Azami Green / mCherry). The figures 1A&B are adopted from Inoue et al., J. Biochem. 154: 67-76, 2013.

シェディングの“ゆらぎ”と細胞形態の“ゆらぎ”の関連解析

“ゆらぎ”の定量化には、ゲノム情報が均一な細胞集団が必要であることから、Fluhemb の発現量が比較的高く、細胞膜上での分布が見やすいクローン#5、#8 を選択した (Figure 2)。さらに各クローンから 2 回の

サブクローニングを繰り返し、複数のサブクローンを樹立し、proHB-EGF シェディング定量に供した。Figure 2 に示す様に、MCF-7 細胞クローン#5 や#8 をさらにサブクローニングし、その形態を観察した。その結果、クローン#8 では、親クローンに類似した上皮形態を示すクローンが多くサブクローニングされたのに対し、クローン#5 では親クローンとは明らかに異なる間葉形態を示すクローンが多く樹立されてきた。このことは、MCF-7 株が不均一な特性を持つ細胞集団であることを示している。

また、樹立できた各クローン、サブクローン細胞株における proHB-EGF シェディング活性を、Fluhemb を用いてイメージング定量を行った (Figure 3)。Figure 3 に示す様に、サブクローン#5-1、#5-2、およびクローン#8 では AzamiGreen/mCherry (Green/Red : G/R) ratio がそれぞれ、0.67、0.78、0.86 であった。これらの結果から、間葉形態を示すクローン#5 では上皮形態を示すクローン#8 に比べて、G/R ratio が低い傾向を示した。またこれらの各クローン、サブクローンの細胞増殖活性を検討した結果、上皮形態を示すクローン細胞#8 は、間葉形態を示すクローン細胞#5 より高い増殖活性を示す傾向が観察された。

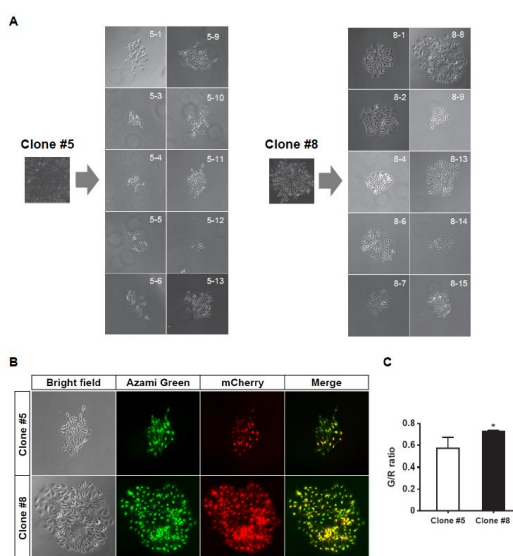


Figure 2. Analysis of MCF7 clone phenotype and shedding activity. (A) Fluhemb construction was introduced into MCF7 cells (human breast cancer cell line) and established MCF7 clones (#1-10) stably expressing Fluhemb. Clone #5 gave rise to colonies with both epithelial and fibroblast-like morphology after sub-cultivation (7 days). Clone #8 gave rise to colonies with epithelial-like morphology after sub-cultivation (7 days). (B) Fluorescent images of MCF7 clone #5 and #8. (C) Fluorescent intensity of Azami Green and mCherry.

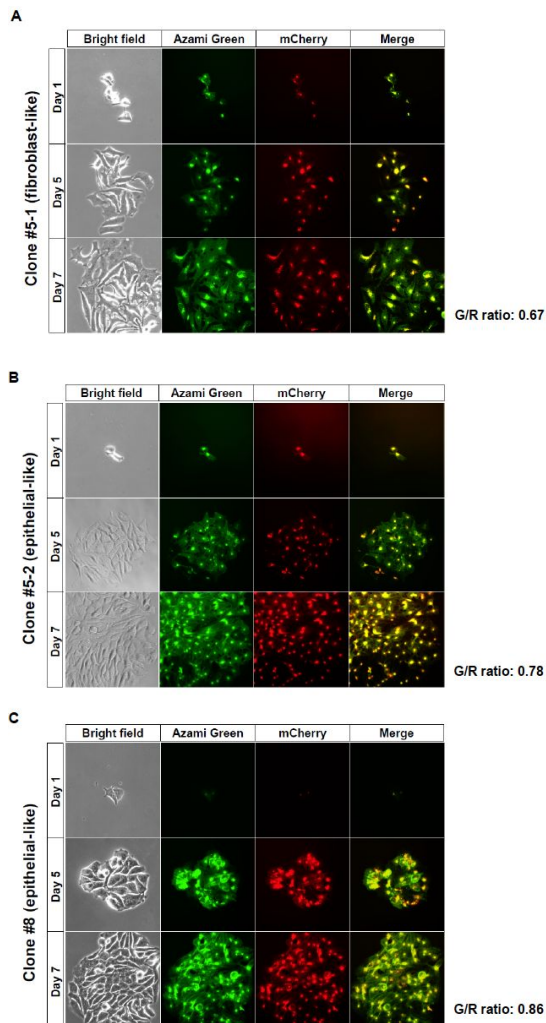


Figure 3. Analysis of MCF7 clone phenotype and shedding activity (time-course analysis). (A-C) Fluorescent images of Fluohemb-MCF7 clones. Images were captured at Day 1, 5 and 7. Fluorescent intensity of Azami Green and mCherry was measured by Fiji software. The G/R ratio was calculated in each clone. Data represent the mean \pm S.D. (n=3), *p < 0.05.

シェディングの“ゆらぎ”と細胞形質の“ゆらぎ”の関連解析

次に、乳がん細胞株 MCF-7 細胞を、まず、上記表面抗原に対する抗体を用いた FACS 解析から細胞形質によって分離した。CD24^{hi}/CD44^{neg}/EpCAM^{hi} を Stem type、CD24^{hi}/CD44^{neg}/EpCAM^{neg} を Basal type、CD24^{lo}/CD44^{hi}/EpCAM^{hi} を Luminal type とし、それぞれの細胞集団における proHB-EGF シェディングを Fluohemb を用いてイメージング定量解析を行った。Stem type、Basal type、Luminal type の各タイプにおいて FACS により分離した 3 つの細胞形質分画における G/R ratio を測定した。その結果、各分画ともに極めて大きなばらつきを示した。このことは、上記の Stem type、Basal

type、Luminal type の各分画がかなり不均一な細胞集団であることを示唆すると共に、上記の表面抗原分類がその特性を反映するには不十分であることを示唆している。

まとめ

我々はまず、膜型細胞増殖因子 proHB-EGF のエクストドメイン・シェディングを蛍光イメージングによって定量可能とするプローブ Fluohemb を安定発現する MCF-7 乳癌細胞株を樹立した。次に異なる細胞形態を示すクローンごとにシェディング活性と細胞形質との相関性を解析したところ、シェディング活性が強い細胞は上皮細胞様形態を維持する一方、弱い細胞は線維芽細胞様形態を示すことがわかった (Figure 4)。以上の結果は、proHB-EGF のエクストドメイン・シェディングの「ゆらぎ」が癌細胞の形質転換に関係している可能性を示唆している。以上より、細胞の形態形質の転換とシェディング活性に相関性を見出し、細胞形質の“ゆらぎ”とシェディング“ゆらぎ”の関連性を示唆することができた。

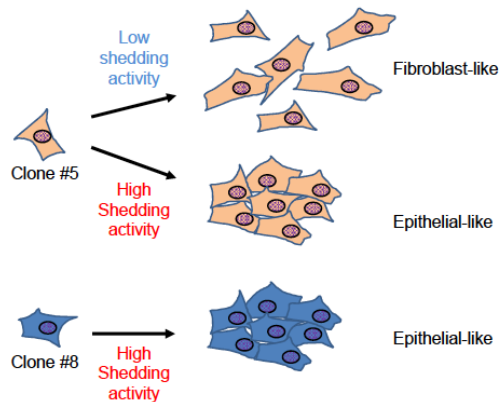


Figure 4. MCF7 clone phenotypes and proHB-EGF shedding activity. The clones showing low shedding show fibroblast-like morphology, and the clones showing high shedding show epithelial-like morphology.

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8件)(全て査読有り)

1. Two clonal types of human skin fibroblasts with different potentials for proliferation and tissue remodeling ability. Hiraoka C, Toki F, Shiraiishi K, Sayama K, Nishimura EK, Miura H, Higashiyama S, Nanba D. J Dermatol Sci. 2016 May;82(2):84-94. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.01.009.

2. Reversible interconversion and maintenance of mammary epithelial cell characteristics by the ligand-regulated EGFR system. Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nanba D, Nakashiro K, Nakayama H, Kubota H, Higashiyama S. *Sci Rep*. 2016 Feb 2;6:20209. doi: 10.1038/srep20209.
3. Rotation is the primary motion of paired human epidermal keratinocytes. Tate S, Imai M, Matsushita N, Nishimura EK, Higashiyama S, Nanba D. *J Dermatol Sci*. 2015 Sep;79(3):194-202. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.05.008.
4. Cell motion predicts human epidermal stemness. Nanba D, Toki F, Tate S, Imai M, Matsushita N, Shiraiishi K, Sayama K, Toki H, Higashiyama S, Barrandon Y. *J Cell Biol*. 2015 Apr 27;209(2):305-15. doi: 10.1083/jcb.201409024.
5. ADAM17 promotes proliferation of collecting duct kidney epithelial cells through ERK activation and increased glycolysis in polycystic kidney disease. Beck Gooz M, Maldonado EN, Dang Y, Amria MY, Higashiyama S, Abboud HE, Lemasters JJ, Bell PD. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):F551-9. doi: 10.1152/ajprenal.00218.2014.
6. Pathophysiology of lung injury induced by common bile duct ligation in mice. Shikata F, Sakaue T, Nakashiro K, Okazaki M, Kurata M, Okamura T, Okura M, Ryugo M, Nakamura Y, Yasugi T, Higashiyama S, Izutani H. *PLoS One*. 2014 Apr 14;9(4):e94550. doi: 10.1371/journal.pone.0094550.
7. Cisplatin resistance by induction of aldo-keto reductase family 1 member C2 in human bladder cancer cells. Shirato A, Kikugawa T, Miura N, Tanji N, Takemori N, Higashiyama S, Yokoyama M. *Oncol Lett*. 2014 Mar;7(3):674-678. Epub 2013 Dec 19.
8. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, Lu ZG, Fukuda S, Higashiyama S, Ono M, Yoshida K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 14;111(2):717-22. doi: 10.1073/pnas.1313675111.

[学会発表] (計4件)

1. 河村勇志, 田中涼果, 難波大輔, 東山繁樹
乳がん細胞の形質転換に伴う proHB-EGF
のエクトドメインシェディング活性変化

第74回日本癌学会学術総会
名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
2015年10月8-10日 ポスター発表

2. 河村勇志, 田中涼果, 難波大輔, 東山繁樹
乳がん細胞における形質転換と
proHB-EGFのエクトドメインシェディング
の相関性
第73回日本癌学会学術総会
パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
2014年9月25-27日 ポスター発表
3. 福田 信治, 福田(西田)尚代, 東山繁樹
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
第37回日本分子生物学会
パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
2014年11月25-27日 ポスター発表
4. 福田(西田)尚代, 福田 信治, 東山繁樹
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
第37回日本分子生物学会
パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
2014年11月25-27日 ポスター発表

[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

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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

難波 大輔 (NANBA DAISUKE)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号: 10380255

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

中山 寛尚 (NAKAYAMA HIROINAO)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教
研究者番号: 40512132