

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08308

研究課題名(和文) 上皮間葉相互転換システムを利用した細胞極性の形成と消失の可逆的制御機構の解析

研究課題名(英文) Reversible interconversion of mammary epithelial cells by EGF ligands

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞に由来するがん細胞は、上皮間葉転換と間葉上皮転換を可逆的に繰り返すことによって、遠隔転移を起こす可能性がある。したがって、この特性の転換を担う分子機構を詳細に探ることで、がん細胞の転移を人為的に制御する手法の確立に寄与できると考えられる。申請者は乳腺上皮細胞MCF10Aに2種類のEGF受容体リガンドであるEGFとAmphiregulin (AREG)を作用させると、上皮様、間葉様の2つの異なる細胞特性が現れることを見出し、その分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの転移は死亡率を大幅に下げる深刻な問題であるため、転移に関わる分子機構の解明は新しい治療方法の開発に貢献できる重要な課題である。申請者は、細胞増殖の中心的役割を担うEGF受容体シグナル伝達経路の研究を行い、EGF受容体を活性化させる増殖因子EGFとAmphiregulinが乳腺上皮細胞MCF10Aの特性を変化させることを見出した。上皮の特性は細胞が集団として増殖するため、間葉の特性は細胞が集団から離脱するために重要と考えられる。EGFとAmphiregulinはEGF受容体シグナル伝達経路の活性化に強弱を生み出し、これらの可逆的特性変化をもたらすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cell plasticity is controlled by extracellular cues, but the underlying mechanisms remain to be fully understood. We demonstrate that ligand-switching between EGF and AREG, those are ligands for EGF receptor, reversibly interconvert epithelial and mesenchymal-like states of MCF10A cells by regulating EGFR signal strength.

研究分野：分子生物学

キーワード：上皮間葉転換 EGF受容体 乳腺細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

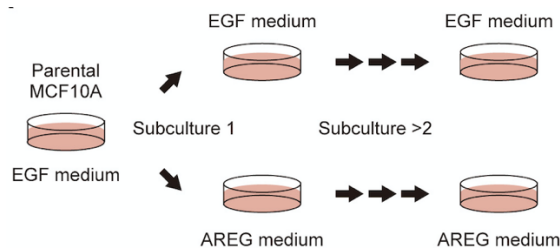
上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) とは、細胞外シグナル等によって上皮細胞が間葉化する現象である。EMT は個体発生に必須であるとともに、がんとの関連が示唆されている。即ち、原発巣の上皮細胞が EMT によって原発巣から離脱し、さらに、逆過程である間葉上皮転換 (MET) によって、遠隔転移を成立させる、という仮説である。ただし EMT, MET を引き起こす分子機構は未だ不明な点が多く、特に上皮と間葉を複数回に渡って可逆化させる仕組みはほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

申請者は細胞増殖制御の中核を担う EGF 受容体 (EGFR) シグナル伝達経路の解析を行なっており、特に、EGFR を活性化するリガンドである EGF と Amphiregulin (AREG) を研究対象としてきた。この研究の過程で、乳腺上皮細胞 MCF10A を EGF または AREG を用いて培養することで、EGF が EMT, AREG が逆反応である MET に関与することを見出した。そこでこの分子機構をさらに詳細に明らかにすることで、上皮細胞が間葉化する分子機構、および間葉化した細胞が再び上皮化する分子機構を解明し、細胞極性の形成と消失の分子機構を明らかにすることを本研究の目的とした。本研究で見出す分子機構は新規乳がん治療薬を開発するにあたっての基盤情報として有用と考えられる。

3. 研究の方法

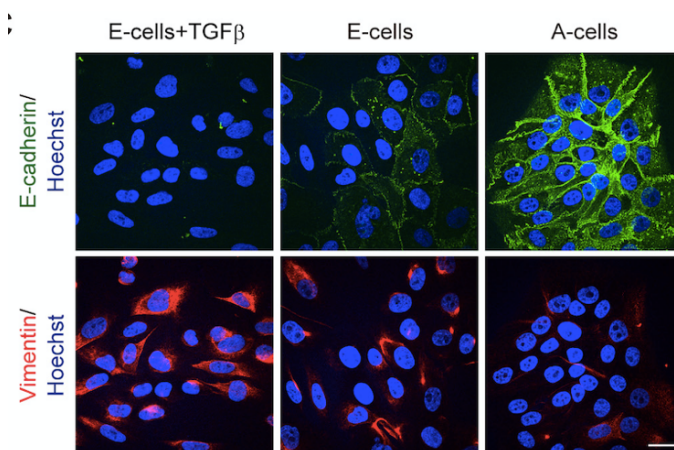
MCF10A を等モル濃度の EGF または AREG で培養し、EGF で間葉特性の強い細胞集団、AREG で上皮特性の強い細胞集団を得た (右図参照)。両細胞集団から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。ここで得られた情報を元に、EGFR 経路の下流で働きうる因子の阻害剤を使い、上皮間葉の可逆的転換に関わる分子の同定を行なった。同定した分子についてはレンチウイルス発現系、Western blot, 蛍光免疫染色、FACS 等の分子生物学的手法を駆使し、乳腺細胞の特性制御を担うかどうかを検討した。



4. 研究成果

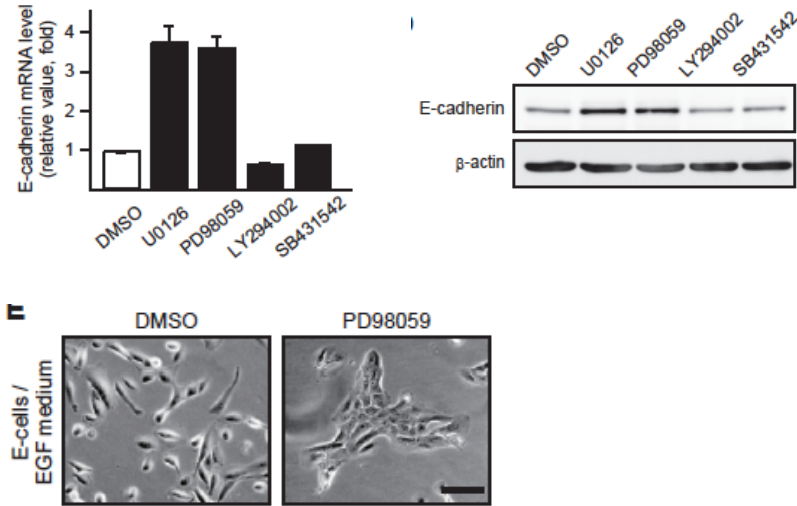
(1) マイクロアレイ解析とその確認

AREG で培養した細胞集団は、細胞接着因子 E-Cadherin を含む上皮マーカー分子を高発現していた。一方で、EGF で培養した細胞集団は間葉マーカーとして使われる N-Cadherin の発現量が高かった。この遺伝子発現レベルでの結果は Western blot および免疫染色によって裏付けられた (下図)。



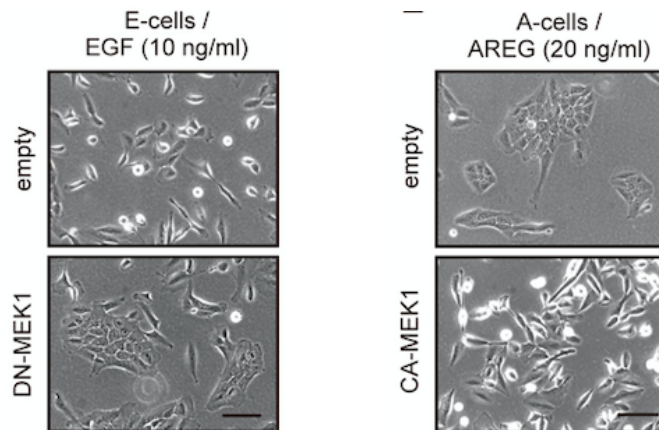
(2) 阻害剤を用いた解析

細胞内シグナル伝達経路の各種阻害剤存在下で MCF10A を培養したところ、MEK 阻害剤 U0120 によって間葉系の細胞の形態が上皮様に変化することが明らかになった。このとき細胞接着因子 E-cadherin は mRNA、タンパク質レベルで上昇していた。このことは EGF ファミリー分子が EGFR 経路を活性化し、下流に様々な分子群がある中で、MEK-ERK 経路の活性化が上皮間葉特性の制御に関わることを示唆した。



(3) EGFR 経路の人為的恒常活性化および阻害

上記研究より、EGFR 経路下流で機能する MEK1 が重要な役割を果たすことが示唆された。この仮説を証明するため、MCF10A に恒常活性化型 MEK1 (Ser218D/Ser222E) およびドミナントネガティブ型 MEK1 (Ser218A/Ser222A) を、レンチウイルスベクターを用いて発現させた。この結果、EGF 受容体経路の活性化強度を強く維持することで間葉系の特性が現れ、活性化の程度が弱くなると上皮系の特性が強くなることが明らかになった (下図)。



本報告に用いた図は Fukuda S et al, Sci Rep. 2016 より改変引用したものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ohno Y, Koizumi M, Nakayama H, Watanabe T, Hirooka M, Tokumoto Y, Kuroda T, Abe M, Fukuda S, Higashiyama S, Kumagi T, Hiasa Y. Downregulation of ANP32B exerts anti-apoptotic effects in hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2017 May 9;12(5):e0177343. doi: 10.1371/journal.pone.0177343. eCollection 2017. PubMed PMID: 28486557; PubMed Central PMCID: PMC5423643. 査読有
- ② Nishida-Fukuda H, Araki R, Shudou M, Okazaki H, Tomono Y, Nakayama H, Fukuda S, Sakaue T, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Detmar M, Higashiyama S, Hirakawa S. Ectodomain Shedding of Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1 (LYVE-1) Is Induced by Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A). J Biol Chem. 2016 May 13;291(20):10490-500. doi: 10.1074/jbc.M115.683201. Epub 2016 Mar 10. PubMed PMID: 26966180; PubMed Central PMCID: PMC4865900. 査読有
- ③ Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nanba D, Nakashiro K, Nakayama H, Kubota H, Higashiyama S. Reversible interconversion and maintenance of mammary epithelial cell characteristics by the ligand-regulated EGFR system. Sci Rep. 2016 Feb 2;6:20209. doi: 10.1038/srep20209. PubMed PMID: 26831618; PubMed Central PMCID: PMC4735799. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) は核外移行シグナルによって核と細胞質をシャトルする
福田 信治、福田 尚代、Deborah A. Lannigan、東山 繁樹、第 60 回日本生化学会中国四国支部例会 2019 年 5 月 17 日-18 日
- ② 増殖因子による Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) の細胞内局在制御機構
福田 信治、福田 尚代、Deborah A. Lannigan、東山 繁樹、第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日-30 日
- ③ Regulation of the intracellular localization of Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) by EGF
Shinji Fukuda, Hisayo Nishida-Fukuda, Subaru Sakamoto, Deborah A. Lannigan, Shigeki Higashiyama, プロテインアイランド松山 2018 年 9 月 12 日
- ④ Cullin-3 ユビキチン複合体による shedding 制御
松木依理奈、近藤綾乃、楠本智章、藤原章、坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、福田信治、東山繁樹、中山寛尚、第 59 回日本生化学会中国四国支部例会 2018 年 5 月 26 日-27 日
- ⑤ 細胞増殖シグナル研究と医療応用への可能性
福田信治、公開研究会「先端医療とプラズマ医療」2015 年 5 月 30 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：東山 繁樹

ローマ字氏名：(Higashiyama Shigeki)

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：プロテオサイエンスセンター

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：60202272

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：福田尚代

ローマ字氏名：Fukuda Hisayo