

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18408

研究課題名(和文)Lats1キナーゼを介した新規EMT-MET制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel EMT-MET control mechanism by LATS1 kinase

研究代表者

向井 智美(Mukai, Satomi)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号：10706146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移過程において、上皮間葉転換(EMT)と間葉上皮転換(MET)は重要なステップである。様々なEMTのメカニズムが報告されているが、間葉系の表現型を維持する機構については不明な点が多い。今回我々はHippo pathwayの構成因子であるLATS1キナーゼが、高悪性度の間葉系様乳癌細胞(MDA-MB-231細胞)において、ZEB1のS939をリン酸化し、E-cadherin(上皮マーカー)の発現を抑制することで、間葉系の維持を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-to-epithelial transition (MET) play pivotal roles in tumor metastasis. In spite of many reports on various mechanisms of EMT, the maintenance mechanism of the mesenchymal phenotypes in transited cells remains obscure. Here, we show that LATS1, a core kinase of the Hippo pathway, maintains mesenchymal phenotypes through phosphorylation of ZEB1 S939 and suppression of E-cadherin (a marker of epithelial cells) to inhibit reversion from mesenchymal to epithelial phenotypes in the mesenchymal-like breast cancer cell line MDA-MB-231.

研究分野：総合生物

キーワード：LATS1 EMT Hippo pathway

### 1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤転移過程において、上皮間葉転換 (EMT) は重要なプロセスである。EMT は上皮系細胞がその細胞接着機能を失い、遊走性の高い間葉系細胞に変化する現象で、癌においては原発巣の上皮系癌細胞が基底膜を通過する際にそれを起こすことが知られている。EMT がおこる際には細胞間の接着因子である E-カドヘリンの発現低下と、その転写抑制因子である ZEB や SNAIL の発現上昇がみられることが特徴である。一旦間葉系の性質を獲得すると、その性質を維持する機構があることが考えられるが、その機構については不明な点が多い。

癌抑制遺伝子 LATS1/LATS2 キナーゼは、Hippo pathway の構成因子として知られているが、その他にも Hippo pathway 非依存的に、様々な基質を介して細胞周期制御や DNA 損傷応答を行っている。近年では LATS2 が SNAIL をリン酸化し、EMT を制御することが報告されたが、LATS1 は SNAIL のリン酸化に寄与せず、EMT への関与は不明のままであった。

### 2. 研究の目的

これまでに、申請者は高転移性の乳癌細胞株において、LATS1 をノックダウンすると E-カドヘリンの発現量が上昇することを見出していた。さらに、LATS1 が ZEB1 をリン酸化することも新たに見出していた。

そこで、本研究では、LATS1-ZEB1 経路に着目し、LATS1 による新規の EMT-MET 調節機構を明らかにし、癌の浸潤転移における新たな分子機構モデルを提唱することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) LATS1/LATS2 ノックダウン細胞を用いた E-カドヘリンの発現確認および運動能への影響の確認

高転移性の間葉系様乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞を用いて、siRNA による LATS1 または LATS2 のノックダウンを行い、E-カドヘリンの発現量をウエスタンブロットングやリアルタイム PCR によって検出し、コントロール細胞 (GL2) と比較した。

上記と同様に、LATS1 または LATS2 のノックダウンを行い、創傷治癒実験によって細胞の運動能への影響を確認した。

(2) ZEB1 のリン酸化部位の決定

既に LATS1 が ZEB1 をリン酸化することを明らかにしていたので、リン酸化候補部位を含む ZEB1 断片化および部位変異体のリコンビナントタンパクを精製し、これらを用いた *in vitro* キナーゼアッセイによって LATS1 による特異的なリン酸化部位を探索した。

(3) リン酸化抗体の作製と品質チェック

上記(2)で決定したリン酸化部位を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作製し、ドットプロット、キナーゼアッセイ、ペプチドコンペティション、フォスファターゼアッセイなどで、抗体の品質を確認した。

(4) ZEB1 のリン酸化によるタンパク安定性への影響の確認

LATS1 ノックダウン細胞に、シクロヘキシミド (タンパク合成阻害剤) または、MG132 (プロテアソーム阻害剤)などを添加し、タンパク安定性をウエスタンブロットングによって評価した。

上記(2)で決定した ZEB1 のリン酸化部位について、非リン酸化型変異体とリン酸化模倣型変異体を作製した。この変異体を培養細胞に過剰発現させ、と同様の方法でタンパク安定性を評価した。

(5) ZEB1 のリン酸化による E-カドヘリン発現量への影響の確認

上記(4)で作製した ZEB1 の変異体を用いて、E-カドヘリンの発現量に変化がみられるか、リアルタイム PCR によって確認した。

(6) 高悪性度の乳がん患者における ZEB1 リン酸化レベルの確認

浸潤性乳管がん患者と非浸潤性乳管がん患者の組織切片における、ZEB1 リン酸化レベルを、リン酸化抗体を用いて、免疫組織染色により比較した。

### 4. 研究成果

(1) LATS1/LATS2 ノックダウン細胞を用いた E-カドヘリンの発現確認および運動能への影響の確認

MDA-MB-231 細胞を用いて LATS1 または LATS2 をノックダウンすると、LATS1 ノックダウン細胞でのみ E-カドヘリンの発現量がコントロール細胞に比べて上昇した (図 1)。

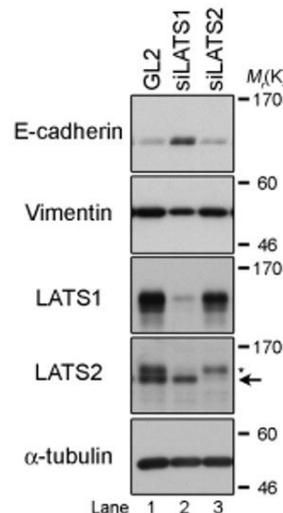


図1 LATS1/LATS2ノックダウン細胞における E-カドヘリンの発現量

さらに、損傷治癒実験により運動能を確認したところ、LATS1 ノックダウン細胞では運動能が抑制された(図 2)。

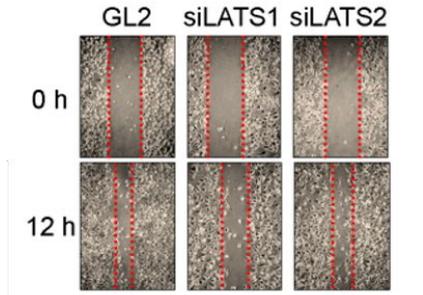


図2 LATS1/LATS2ノックダウン細胞における運動能の違い

### (2) ZEB1 のリン酸化部位の決定

E-カドヘリンの転写抑制因子である ZEB1 は、すでに LATS1 によってリン酸化されることを見出していた。そこで、リン酸化候補部位を含む ZEB1 断片化および部位変異体のタンパクを精製し、*in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、LATS1 の主要なリン酸化部位として ZEB1 の 939 番目のセリン残基 (ZEB1 S939) を同定した。

### (3) リン酸化抗体の作製と品質チェック

ZEB1 S939 のリン酸化に対する抗リン酸化抗体 (pS939 抗体) を作製し、ドットプロット、キナーゼアッセイ、フォスファターゼアッセイ等により、pS939 抗体がリン酸化 S939 を特異的に認識することを確認した。この抗体を用いて、実際に MDA-MB-231 細胞内で、ZEB1 が LATS1 によってリン酸化されることを ZEB1 および LATS1 のノックダウンにより確認し(図 3, Lane 1-3)、同時にリン酸化および非リン酸化ペプチドを用いたペプチドコンペティションによってリン酸化抗体由来であることを確認した(図 3, Lane 4-6)。

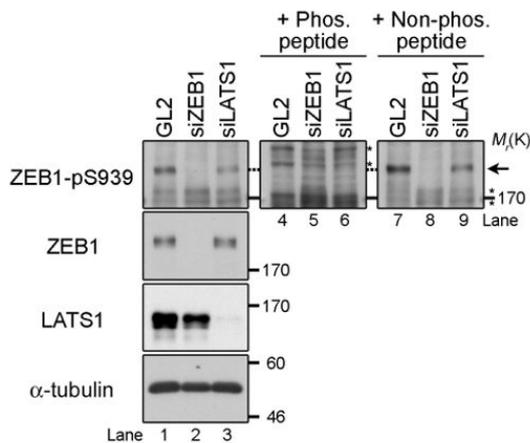


図3 MDA-MB-231細胞内における ZEB1 S939のリン酸化レベル

### (4) ZEB1 のリン酸化によるタンパク安定性への影響の確認

LATS1 ノックダウン細胞およびコントロール細胞に、シクロヘキシミド (タンパク合成阻害剤) を添加し、タンパク安定性をウェスタンブロットングによって評価した。その結果、LATS1 ノックダウン細胞では ZEB1 タンパクが不安定になることが明らかとなった(図 4)。

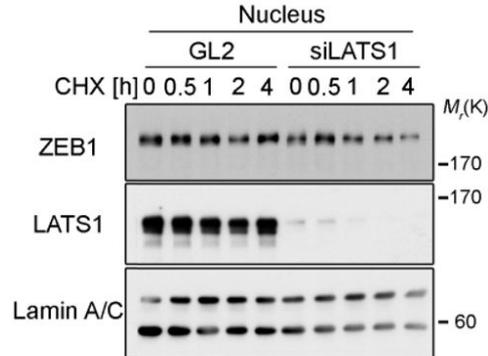


図4 LATS1ノックダウン細胞における ZEB1の安定性

さらに、ZEB1 S939 のリン酸化模倣型変異体 (S939D) と非リン酸化型変異体 (S939A) を作製し、同様にタンパク安定性を確認したところ、リン酸化模倣型ではタンパクが安定化する傾向が見られた。以上の結果より、LATS1 による ZEB1 のリン酸化は、ZEB1 タンパクの安定性に寄与する可能性が示唆された。

### (5) ZEB1 のリン酸化による E-カドヘリン発現量への影響の確認

MDA-MB-231 細胞に ZEB1 の各種変異体を過剰発現させ、E-カドヘリンの発現量をリアルタイム PCR によって確認した。その結果、タンパク安定性の高い ZEB1 リン酸化模倣変異体 (S939D) 発現細胞において、E-カドヘリンの発現が抑制される傾向が確認できた。

### (6) 高悪性度の乳がん患者における ZEB1 リン酸化レベルの確認

浸潤性乳管がん患者と非浸潤性乳管がん患者の組織切片における、ZEB1 リン酸化レベルを、リン酸化抗体を用いて、免疫組織染色により比較した。その結果、浸潤性の乳がん患者では ZEB1 S939 が高頻度にリン酸化されることが明らかとなった(図 5)。

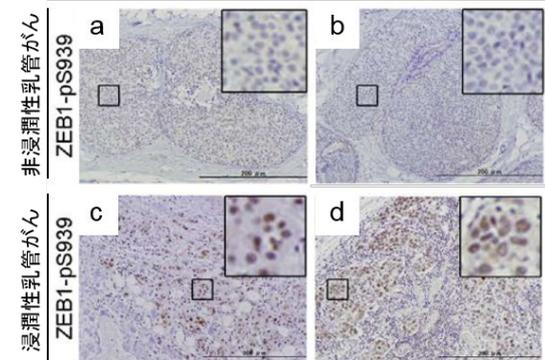
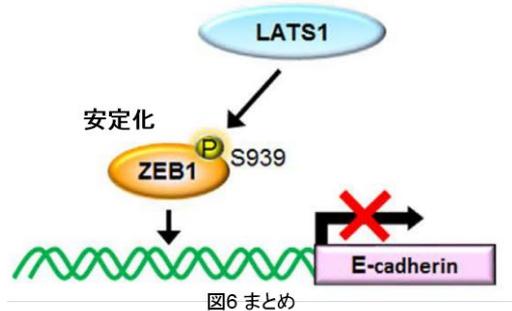
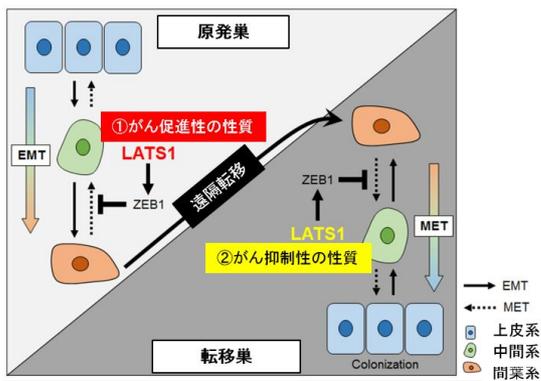


図5 非浸潤性および浸潤性乳管がんにおける ZEB1 S939のリン酸化レベルの比較

これらの結果より、高転移性の乳癌細胞において、LATS1はZEB1をリン酸化し、ZEB1タンパクを安定化することによって、E-カドヘリンの発現量を抑制する機能があることが明らかとなった(図6)。



今回の発見により、間葉系のがん細胞において、LATS1がE-カドヘリンの発現抑制をおこない、間葉系の性質を維持するために必要であることが示唆された(論文投稿中)。これはLATS1が、原発巣において、EMTを起こした間葉系がん細胞を、再び上皮系に戻することを抑制する「がん促進性の性質」と、転移巣の間葉系がん細胞がMETを起こし、上皮系のがん細胞への転換を完了させることを抑制する「がん抑制性の性質」の両方を併せ持つことを示唆している(図7)。本研究成果は、LATS1-ZEB1経路を標的とした悪性癌の浸潤・転移における新しい治療法や診断方法の開発に繋がると期待できる。



## 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 1件)

Mukai S, Yabuta N, Yoshida K, Okamoto A, Miura D, Furuta Y, Abe T, Nojima H.

Lats1 suppresses centrosome overduplication by modulating the stability of Cdc25B.

**Sci Rep.** 2015 Nov 4;5:16173. doi: 10.1038/srep16173. 【査読あり】

〔学会発表〕(計 3件)

向井 智美、藪田 紀一、谷野 美智枝、鳥形 康輔、関戸 好孝、田中 伸哉、野島 博

LATS1は浸潤性乳がん細胞においてE-cadherinの転写抑制因子をリン酸化することによってE-cadherinの発現を抑制する

第75回日本癌学会学術総会

平成28年10月6日~8日

「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

向井 智美、安藤 有美、加藤 依香、鳥形 康輔、藪田 紀一、野島 博

Lats1キナーゼはZEB1をリン酸化し、乳癌細胞におけるEMT-METを制御する

第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会

平成27年12月1日~4日

「神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)」

向井 智美、鳥形 康輔、藪田 紀一、野島 博

Lats1とLats2によるZEB1のリン酸化は乳癌細胞においてEMT-METを制御する

第74回日本癌学会学術総会

平成27年10月8日~10日

「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

向井 智美 (MUKAI, Satomi)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号: 10706146