

令和元年9月2日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07119

研究課題名(和文) 非リン酸化型ErbB受容体による細胞接着制御機構とその破綻による腫瘍悪性化

研究課題名(英文) Ligand-independent roles of ErbB receptors on the regulation of cell-cell adhesion

研究代表者

寺林 健 (TERABAYASHI, Takeshi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40452429

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)：上皮細胞の細胞間接着の破綻は腫瘍悪性化などの様々な疾患に繋がる。細胞間接着形成制御機構に関する研究は大きく進展しているものの、全体を統合的に制御するメカニズムについては未だ明らかになっていない。申請者はこれまでの研究で、非リン酸化型ErbB3が多種のキナーゼの活性制御を介して上皮細胞の細胞間接着形成を制御することを明らかにしている。このことから、非リン酸化ErbB3シグナル伝達の破綻は腫瘍の悪性化に大きく寄与する可能性が考えられ、本研究課題においてはこの仮説の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞間接着形成に関与する様々なシグナル伝達が明らかになっているが、多くは細胞間接着形成の過程の一部分に焦点をあてたものであり、細胞間接着形成全体を包括的に制御する因子については、未だその知見が乏しい。本研究では非リン酸化型ErbB3の細胞間接着形成統括因子としての機能確立を目指したものであり、細胞間接着形成、さらに腫瘍悪性化の新たな分子機序の解明につながると考えている。また、非リン酸化型受容体によるシグナル伝達は、他の受容体チロシンキナーゼにも存在する可能性は高い。がん細胞の薬剤耐性獲得の機序を解き明かす新たな鍵となる可能性があり、新規癌分子標的薬の開発に向けた礎となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：Internalisation and trafficking of activated receptor tyrosine kinases (RTKs) determines duration and spatial distribution of growth factor signalling. Here we show that the ErbB3 receptor acts in a ligand-independent manner to sort cell-surface proteins for endocytic recycling in breast epithelial cells. Loss of ErbB3 abrogates recycling of integrins from a Rab4-positive compartment and redirects it towards degradation. Consequently, delivery of integrins to the leading front of migrating epithelial cells is impaired and cell migration compromised upon loss of ErbB3. Mechanistically, ErbB3 interacts and stabilises the Rab4/5 effector rabaptin5 and the endosomal adaptor GGA3 thereby facilitating assembly of the Arf6-GGA3-rabaptin5 complex, required for recycling of cargo including integrins. We show that ErbB3 is an integral part in the endosomal trafficking machinery, provoking the notion that RTKs might play a more instrumental role in vesicular trafficking than commonly perceived.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞極性 腫瘍形成 癌悪性化 ErbB受容体ファミリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞やその上皮細胞が形成する組織・器官などの高次機能構造体の恒常性維持を維持するためには、細胞内小器官や細胞膜の適切な配置をとることが必要である。この配置は偏向性もったものであり、このことにより上皮細胞は細胞に極性を有することになる。上皮細胞極性の破綻は様々な疾患・疾病の原因となることが、申請者も含め、多くの研究者によって示されてきた。細胞極性形成・維持の基盤となる細胞構造の1つが上皮細胞の細胞間接着である。上皮細胞の強固な細胞間接着は、細胞骨格の再編成や細胞膜の輸送、細胞膜上の蛋白質の適切な配置など、多くの過程を経て形成される。これらの個々の過程を制御するシグナル伝達については、これまでに数多くの報告がなされてきた。しかしながら、これらのシグナル伝達を統合的に制御する因子やシグナル伝達については未だ明らかになっていない。

一方、膜型チロシンキナーゼである ErbB 受容体ファミリーは細胞の増殖・生存を制御するシグナル伝達に関わる蛋白質であり、増幅や活性化型変異がみられるなど、腫瘍形成やその悪性化との非常に深く関わっている。ErbB 受容体はリガンド結合依存的にホモ/ヘテロ 2 量体を形成、さらに自己リン酸化することによって、下流のシグナル伝達を活性化する。そのため、これまでの行われてきた研究は『リン酸化型』ErbB 受容体に着目して進められており、『非リン酸化型』ErbB 受容体に対してはその機能の解析が行われてこなかった。

2. 研究の目的

先行研究から、申請者は ErbB 受容体ファミリーの1つである ErbB3 がヒト乳腺上皮細胞の細胞間接着形成を制御することを見出している。細胞間接着形成の制御には『非リン酸化型』の ErbB3 が関与しており、セリン/スレオニンキナーゼ X と細胞間接着形成開始直後に結合、その活性を制御することで、E-cadherin はゴルジ体から細胞膜へと輸送される。また、非リン酸化型 ErbB3 は細胞間接着形成時において、2種類のチロシンキナーゼとも内在性複合体を形成する。本研究課題では、1) ErbB3 とこれらのタンパク質リン酸化酵素による細胞間接着制御機構、2) 非リン酸化型 ErbB3 シグナル伝達の破綻が腫瘍の悪性化に寄与する可能性について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 非リン酸化型 ErbB3 による細胞間接着制御機構の解明

ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A 細胞において各遺伝子をノックダウンすることで、細胞間接着ならびの細胞機能について、細胞生物学的・生化学的解析を行った。

(2) 非リン酸化型 ErbB3 シグナル伝達の破綻と腫瘍の悪性化

これまでに原発腫瘍で見ついている ErbB3 の変異が ErbB3 の細胞間接着制御能に対してどのような影響を及ぼすかについて細胞生物学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 非リン酸化型 ErbB3 による細胞間接着制御機構の解明

細胞間接着形成時において、非リン酸化型 ErbB3 はセリン/スレオニンキナーゼ X と結合し、E-cadherin の細胞膜への輸送を促進する。ErbB3 と複合体を形成するセリン/スレオニンキナーゼ X の活性は細胞内小胞輸送に必要なことが知られていたことから、非リン酸化型 ErbB3 による細胞内小胞輸送について更なる検討を行った。

セリン/スレオニンキナーゼ X に対する阻害薬で処理したとき、ErbB3 は Rab4-positive

recycling endosome との共局在が観察された。興味深いことに、ErbB3 の Rab11-positive endosome との共局在は観察されなかった。また、Rab4-positive recycling endosome において ErbB3 は integrin $\beta 1$ と共局在しており、ErbB3 のノックダウンにより、integrin $\beta 1$ の総発現量と細胞膜表面上への局在が減少することから、ErbB3 は endocytosis された integrin $\beta 1$ の運命を規定することが示唆された。さらに、ErbB3 は Rab4/5 のエフェクター分子である Rabaptin5 やアダプター分子の GGA3 と相互作用し、そのタンパク質安定性を制御すること、ErbB3-Rabaptin5 複合体の喪失が integrin $\beta 1$ の発現量減少につながることも明らかにした。Integrin $\beta 1$ は細胞間接着形成に關与することが知られており、非リン酸化型 ErbB3 は E-cadherin や integrin などの接着分子の細胞内輸送を制御することで、細胞間接着形成に対して重要な役割を果たしていると考えられた。

(2) 非リン酸化型 ErbB3 シグナル伝達の破綻と腫瘍の悪性化

これまでに肺や乳腺など多くの組織由来の原発性腫瘍で ErbB3 の変異が報告されている。これらの変異の多くはそのキナーゼドメイン内に見つかっており、そのいくつかは EGFR の活性化をより強く誘導する。このことから、ErbB3 の変異は腫瘍悪性化につながると考えられることから、これらの変異体が細胞間接着形成を阻害する可能性について検討を行った。

非リン酸化型 ErbB3 はそのキナーゼドメインを介してチロシンキナーゼ a と相互作用し、このことによりチロシンキナーゼ a は活性化する。原発性腫瘍で見出された ErbB3 の変異のうち 4 箇所はチロシンキナーゼ a との結合に必要な領域に含まれていたことから、これらの変異を ErbB3 に導入し、チロシンキナーゼ a との結合と活性化を検証した。ErbB3 変異体は全てチロシンキナーゼ a との結合能を保持していたものの、4 つのうち 1 つの変異体

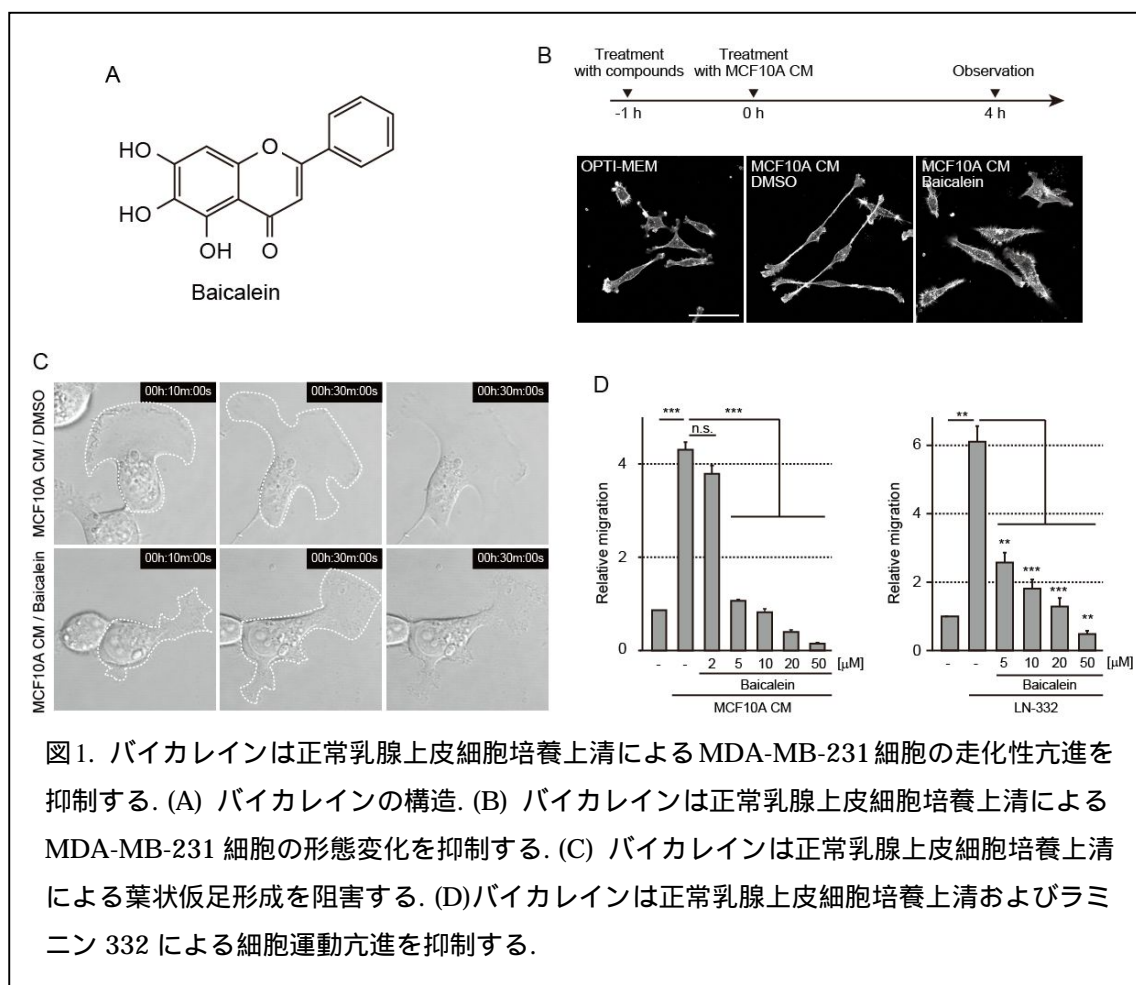


図1. バイカレインは正常乳腺上皮細胞培養上清によるMDA-MB-231細胞の走化性亢進を抑制する。(A) バイカレインの構造。(B) バイカレインは正常乳腺上皮細胞培養上清によるMDA-MB-231細胞の形態変化を抑制する。(C) バイカレインは正常乳腺上皮細胞培養上清による葉状仮足形成を阻害する。(D) バイカレインは正常乳腺上皮細胞培養上清およびラミニン 332 による細胞運動亢進を抑制する。

はチロシンキナーゼ a の活性化能を喪失していた。申請者は先行研究において、チロシンキナーゼ a の活性は細胞間接着形成に重要な役割を果たしていることを見出している。このことから、ErbB3 の変異による非リン酸化型 ErbB3 - チロシンキナーゼ a 経路の喪失は、腫瘍悪性化に大きく寄与すると推察される。現在、ErbB3 のノックアウト細胞を作出しており、今後、変異型 Erbb3 をノックアウト細胞に戻すことで、細胞間接着形成ならびに腫瘍悪性化に対する効果について検証を行っていく予定である。

また申請者はこれらの解析の中で、ヒト乳腺上皮細胞の培養上清が乳がん細胞株の走化性を亢進することを見出している。実際に、ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A 細胞の培養上清に含まれる分泌型ラミニン-332 が乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞の葉状仮足形成と運動能の亢進を引き起こす。さらに申請者は生薬由来化合物のスクリーニングを行い、『オウゴン』に含まれる『バイカレイン』がこの分泌型ラミニン-332 による運動能亢進を抑制することも見出している(図 1)。これらの結果は投稿論文として発表を行った(Terabayashi et al. 2018)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) **Terabayashi T.**, Tokumar A., **Ishizaki T.**, and Hanada K. Analysis of chromosomal DNA fragmentation in apoptosis by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods in Mol Biol.* 査読有 In press
- (2) **Terabayashi T.** and Hanada K. Genome instability syndromes caused by impaired DNA repair and aberrant DNA damage responses. *Cell Biol Toxicol* 34(5):337-350 (2018) 査読有 doi: 10.1007/s10565-018-9429-x
- (3) Sasaki M., **Terabayashi T.**, Weiss S., and Ferby I. The tumour suppressor Mig6 controls mitotic progression and the G2/M DNA damage checkpoint by stabilizing the Wee1 kinase. *Cell Rep.* 24(5): 1278-1289 (2018) 査読有 doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.064
- (4) **Terabayashi T.**, Hanada K., Motani K., Kosako H., Yamaoka M., Kimura T. and **Ishizaki T.** Baicalein disturbs the morphological plasticity and motility of breast adenocarcinoma cells depending on the tumour microenvironment. *Genes Cells* 23(6): 466-479 (2018) 査読有 doi: 10.1111/gtc.12584
- (5) Yamaoka M., Ando T., **Terabayashi T.**, Okamoto M., Takei M., Nishioka T., Kaibuchi K., Matsunaga K., Ishizaki R., Izumi T., Niki I., **Ishizaki T.** and Kimura T. PI3K regulates endocytosis after insulin secretion via signaling crosstalk between Arf6 and Rab27a. *J Cell Sci.* 129(3): 637-649 (2016) 査読有 doi: 10.1242/jcs.180141
- (6) **石崎敏理、寺林健** ROCK に関するこれまでの研究と最近の動向 医薬ジャーナル Vol.52(6) 1489-1494 (2016) 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 木村 俊秀、姫野 冴美、山岡 真美、**寺林 健、石崎 敏理** インスリン分泌後のエンドサイトーシス 第 41 回 日本分子生物学会年会 2018 年
- (2) 木村 俊秀、姫野 冴美、山岡 真美、**寺林 健、石崎 敏理** GDP 型 Rab27a 新規結合タンパク質の同定とエンドサイトーシスの制御. 第 61 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年

- (3) Abe I., Teshima Y., Yonehara Y., Kaku H., Kira S., Oniki T., Ikebe Y., Kondo H., Saito S., **Terabayashi T.**, **Ishizaki T.**, and Takahashi N. Role of Rho-mDia1 Signaling to Maintain Cardiac Function in Response to Pressure Overload in Mice 第 82 回日本循環器学会 2018 年
- (4) 山岡 真美、荒巻 千香子、姫野 冴美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村 俊秀 膵 B 細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの分子メカニズムの解析. 第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年
- (5) 山岡 真美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村 俊秀 膵 B 細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年
- (6) 姫野 冴美、山岡 真美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村 俊秀 膵 B 細胞における GDP 型 Rab27a 新規結合タンパク質の機能解析. 第 90 回 日本薬理学会年会 2017 年
- (7) 荒巻 千香子、山岡 真美、姫野 冴美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村 俊秀 膵 B 細胞におけるエンドサイトーシスの解析. 第 90 回 日本薬理学会年会 2017 年
- (8) 山岡 真美、荒巻 千香子、姫野 冴美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村 俊秀 膵 B 細胞における Rab27a-GAP を介したグルコース誘導性エンドサイトーシスの制御. 第 90 回 日本薬理学会年会 2017 年
- (9) Abe I., Teshima Y., Yonehara Y., Kaku H., Kira S., Oniki T., Ikebe Y., Kondo H., Saito S., **Terabayashi T.**, **Ishizaki T.**, and Takahashi N. Role of Rho-mDia1 Signaling in the Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophic Response. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年
- (10) 安部 一太郎、手嶋 泰之、**寺林 健**、**石崎 敏理**、高橋 尚彦 心肥大応答における mDia の役割 第 26 回日本病態生理学会 2016 年
- (11) 安部 一太郎、手嶋 泰之、池邊 有希、鬼木 崇裕、近藤 秀和、齋藤 聖多郎、**寺林 健**、**石崎 敏理**、高橋 尚彦 心肥大応答における Rho-mDia シグナルの役割 Molecular Cardiovascular Conference II (2016) 2016 年
- (12) 山岡 真美、姫野 冴美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村 俊秀 G タンパク質によるインスリン分泌後のエンドサイトーシスの制御. 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016 年
- (13) 山岡 真美、姫野 冴美、**寺林 健**、**石崎 敏理**、木村俊秀 グルコースが誘導するエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析. 第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：散乱光分析による皮膚疾患の検出方法

発明者：井上 高教、高成 広起、**橋本 悟**、**寺林 健**

権利者：国立大学法人大分大学

種類：特願

番号：2017-108201

出願年：2017 年

国内外の別： 国内

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

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石崎 敏理

ローマ字氏名：Toshimasa Ishizaki

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70293876

研究分担者氏名：橋本 悟

ローマ字氏名：Satoru Hashimoto

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：環境医学研究所

職名：特任准教授

研究者番号（8桁）：60352150

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。