

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15221

研究課題名(和文) エクトドメイン・シェディングの“ゆらぎ”とがん細胞不均一性の関連解析

研究課題名(英文) Fluctuation of ectodomain shedding and the emersion of cancer cell heterogeneity

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞における細胞形質の不均一性の起因を膜型細胞増殖因子EGFファミリーの細胞外領域切断“エクトドメイン・シェディング”活性の“ゆらぎ”と関連付け、研究を進めた。ヒト乳がん細胞MCF7細胞からStem type、Basal type、Luminal typeの各クローンを樹立後、各細胞タイプとEGFファミリー膜型増殖因子のシェディング定量解析を行なった。その結果、proAREGのシェディング活性が各細胞タイプとの相関性を示すこと、proAREGに特異的なシェディング制御機構としてCUL3-RhoA軸が制御するアクチンダイナミクスが関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cancer is derived a single cell and becomes to show heterogeneous population during the growth of its mass in general, which seems to lead to drug resistance. The epidermal growth factor (EGF) family are transmembrane growth factors and their ectodomain shedding is a crucial event to determine their soluble growth factor levels. We speculate that the fluctuation of the ectodomain shedding of the EGF family would be related to the emersion of heterogeneous population of cancer. In this study, we at first established three clones, stem, basal and luminal types, form human breast cancer cell line, MCF-7 cells, and then performed quantitative analysis of the ectodomain shedding of EGF family ligands in these clones. We revealed that the ectodomain shedding of proAREG uniquely showed the correlation between the shedding level and clone types, and was regulated through actin dynamics by CUL3 -RING based E3 ubiquitin ligase-dependent Rho activation.

研究分野：生化学、分子腫瘍学

キーワード：がん細胞の不均一性 乳がん細胞 ゆらぎ EGFファミリー エクトドメイン・シェディング amphiregulin CUL3 RhoA

## 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」とがん細胞特性との間に相関関係があるかを調べた。

## 2. 研究の目的

細胞形質の転換は、組織における細胞の多様性を生み出す一方で、がん細胞においては不均一性となり、その治療を困難にする。この細胞形質の多様性は、個々の細胞のダイナミクス、タンパク質の産生量や酵素反応速度の確率論的な「ゆらぎ」に起因すると考えられる。本研究では、これら3点がクロスする膜型細胞増殖因子の細胞外領域切断「エクトドメイン・シェディング」活性の「ゆらぎ」に注目し、ヒト乳腺上皮がん細胞を用いて、がん細胞特性とそのシェディング活性の「ゆらぎ」を定量化し、細胞の多様性やがん細胞の不均一性が如何に生み出されるかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ① シェディング定量測定

アミノ末端側にアルカリフォスファターゼ (AP) を融合した EGF ファミリー膜型増殖因子4種 AP-proHB-EGF, AP-proAREG, AP-proTGF- $\alpha$ , AP-proEREG をそれぞれ安定発現している HT1080 細胞株を用いて、培養上清中の AP 活性を測定することで定量化した。

### ② 薬剤処理

アクチン重合阻害剤は、1  $\mu$ M 濃度の latrunculin A 及び cytochalasin D を用いて行った。シェディング誘導は 100 nM phorbol

ester TPA で、阻害は 20 mM KB-R7785 でそれぞれ 30 分間処理をして行った。

### ③ RNA 干渉

コントロール及び cullin 各ファミリーメンバーに特異的な siRNA (Hs\_CUL1\_5921, Hs\_CUL2\_3148, Hs\_CUL3\_2205 (#1), Hs\_CUL3\_2207 (#2), Hs\_CUL4A\_6882, Hs\_CUL5\_2044 Sigma-Aldrich) を 20 nM 濃度で用いて、72 時間の Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 処理により細胞に導入した。

### ④ その他

アクチン染色はファロイジンによる染色、ウェスタンブロットは常法により行った。

## 4. 研究成果

がん細胞における細胞形質の不均一性は、薬剤抵抗性出現の一因であり、がん治療を困難にする。このがん細胞形質の多様性は、個々の細胞のダイナミクス、タンパク質の産生量や酵素反応速度の確率論的な「ゆらぎ」に起因すると考えられる。本研究では、これら3点がクロスする膜型細胞増殖因子の細胞外領域切断「エクトドメイン・シェディング」活性の「ゆらぎ」に焦点を当て、ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A 細胞および乳がん細胞 MCF7 細胞を用いて解析を行った。まず、3種の表面抗 CD24/CD44/EpCAM に対する抗体を用いた FACS 解析から CD24<sup>hi</sup>/CD44<sup>neg</sup>/EpCAM<sup>hi</sup> を Stem type、CD24<sup>hi</sup>/CD44<sup>neg</sup>/EpCAM<sup>neg</sup> を Basal type、CD24<sup>lo</sup>/CD44<sup>hi</sup>/EpCAM<sup>hi</sup> を Luminal type として細胞形質分画し、それぞれよりクローンを5株ずつ樹立後、それぞれの細胞集団における EGF ファミリー膜型増殖因子である proHB-EGF、proTGF- $\alpha$ 、proAREG、proEREG の各因子のシェディングを定量解析した。その結果、各細胞タイプともに proHB-EGF、proTGF- $\alpha$ 、proEREG のシェディング活性に極めて大きなばらつきが見られ、相関は認められなかった。しかし、proAREG のシェディング活性については各細胞タイプとの相関性を示す傾向が得られた。このことは、proHB-EGF、proTGF- $\alpha$ 、proEREG はそれぞれ複数のシェディング酵素が関与するのに対し、proAREG は1つのシェディング酵素が対応することから、シェディング酵素との対応性を反映していることが示唆された。

さらに、proAREG シェディング活性特異的な制御機構を探索した。まず、上記3タイプの細胞クローン間で、細胞運動性に違いが認められたことから、細胞形質膜動態を大きく制御するアクチンダイナミクスに着目し、latrunculin A 及び cytochalasin D の薬剤処理によるアクチン重合阻害下で EGF ファミリー一因

子のシェディング定量解析を行った。Fig.1に示すように、両薬剤によるアクチン重合阻害下で、AP-proHB-EGFを除く、AP-proAREG, AP-proTGF- $\alpha$ , AP-proEREG、において、それぞれのsheddingが誘導された。このことはアクチンダイナミクスが上記3種のシェディングを制御することを示唆している。

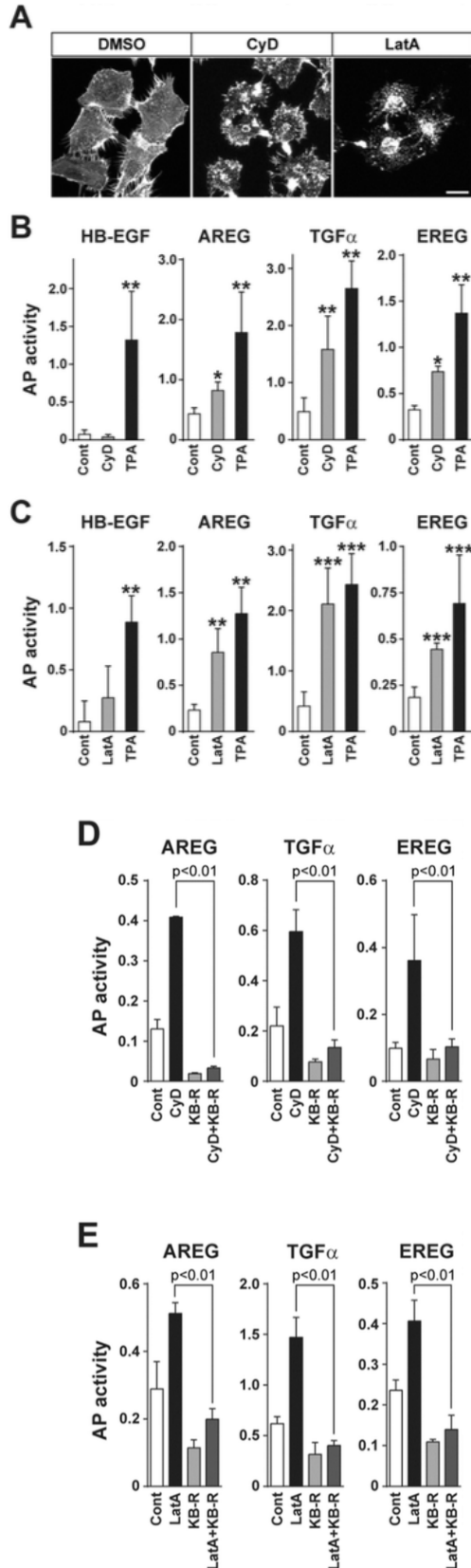


Fig. 1. Analysis of EGF family ligand shedding with the inhibitors of actin polymerization. A, HT1080 cells were treated with the inhibitors of actin polymerization, CyD (1 mM) or LatA (1 mM) for 30 min and were fixed and stained with Rhodamine phalloidin. Cells were observed by confocal microscopy. The scale bar indicates 20  $\mu$ m. B,C, HT1080 cells stably expressing each AP-tagged ligand were treated with the inhibitors or the shedding stimulant phorbol ester TPA (100 nM) for 30 min. Data represent the mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, vs. unstimulated cells. D,E, AP-ligand cells were pre-treated with the metalloprotease inhibitor, KB-R7785 (20 nM) for 30 min. The cells were subsequently incubated for 30 min in the absence or presence of CyD or LatA (1 mM). Data represent the mean  $\pm$  SD.

さらに、アクチン重合の制御に重要な RhoAを標的としたシグナル経路の一つであるcullin(CUL)依存性ユビキチンE3リガーゼシステムを、CULメンバー特異的siRNAを用いて検討したところ、proAREGのみがCUL3特異的に制御を受けることを突き止めた (Fig.2&3)。

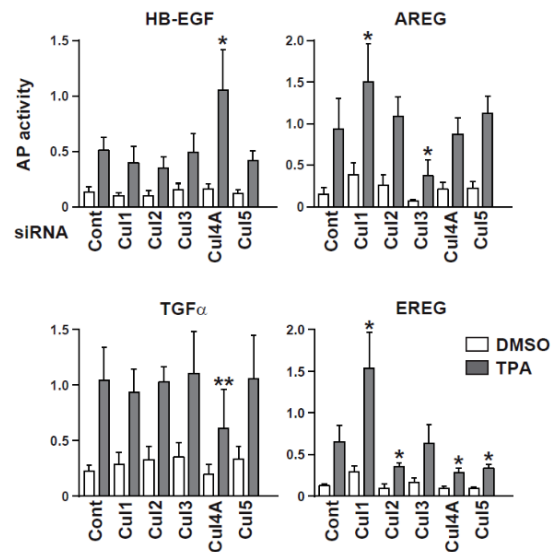
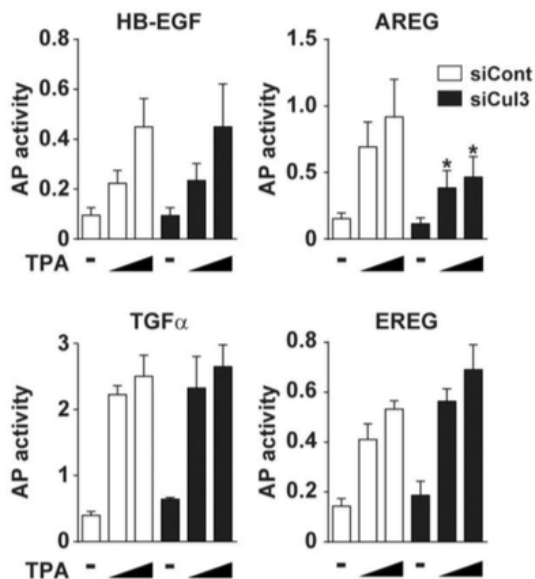


Fig. 2. Cullin E3 ubiquitin ligases regulate EGF family shedding. AP-ligand cells were transfected with control or each cullin siRNAs (20 nM). After 72 h, cells were treated with TPA (100 nM) for 30 min. Data represent the mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.01, \*\* $p$  < 0.05, vs. control siRNA treated cells.

これまでに、我々は、CUL3システムの一つがRhoAの活性発現を制御することを見出していることから(J Cell Biol. 2018)、RhoA阻害剤であるC3 transferaseのシェディングに及ぼす作用を検討した結果、C3 transferaseによるRhoA阻害によって、

proAREGのシェディングは有意に亢進した



(Fig.4)。

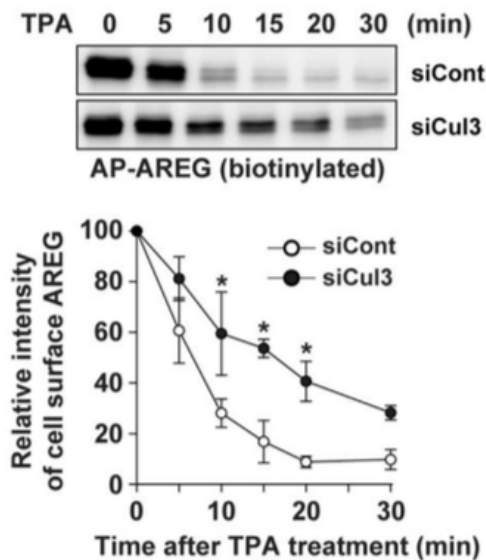


Fig. 3. Cul3 regulates AREG shedding. AP-ligand cells were transfected with control or Cul3 siRNAs (20 nM). After 72 h, cells were treated with TPA (10, 100 nM, bars from left to right) for 30 min. Data represent the mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.01, vs. unstimulated cells. AP-AREG cells were transfected with siRNA and stimulated with 100 nM TPA for the indicated time periods and were biotinylated with a membrane-impermeable biotinylation reagent. The biotinylated proteins were immunoprecipitated with an anti-AREG antibody and were analyzed by Western blotting using HRP- conjugated streptavidin. The intensity of biotinylated AP-AREG bands is represented as a fold-change relative to baseline levels (0 min). Data represent the mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.01, vs. control siRNA treated cells.

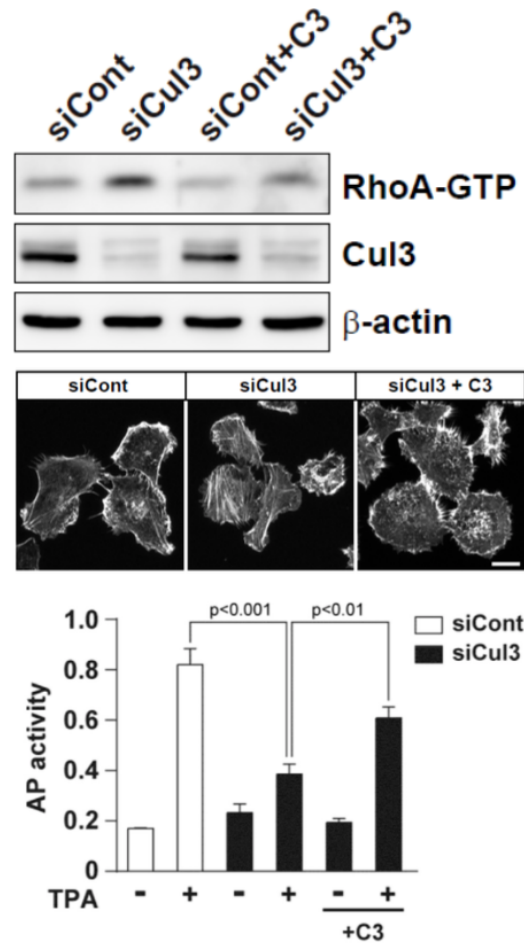


Fig. 4. Cul3 regulates AREG shedding in a RhoA dependent manner. AP-AREG cells were transfected with control or Cul3 siRNAs (20 nM). After 24 h, cells were treated with the Rho inhibitor C3 transferase (0.5 mg/ml) for 48 h. Cell lysates were pulled down with rotekin beads, followed by Western blotting with anti-RhoA antibody (upper). Cells were fixed and stained with Rhodamine phalloidin. Cells were observed by confocal microscopy. The scale bar indicates 20  $\mu$ m (middle). Cells were treated with TPA (100 nM) for 30 min and were analyzed by AP assay (lower).

以上のことから、EGFファミリー因子の中でproAREGに特異的なシェディング制御機構として、CUL3-RhoA制御軸を見出した。

これまでに、ヒト乳がん細胞 MCF7 細胞から Stem type、Basal type、Luminal type の各クローンを樹立後、各細胞タイプと EGF ファミリー膜型増殖因子のシェディング定量解析から、proAREG のシェディング活性が各細胞タイプとの相関性を示すこと、proAREG に特異的なシェディング制御機構として CUL3-RhoA 軸が制御するアクチンダイナミクスが関与することを明らかにした。今後は、分泌型 AREG の定量解析、CUL3 依存的 RhoA の活性化システムの定量解析が、ヒト

乳がん細胞の不均一性出現の予測方法として有用性であるかどうかを *in vitro* 及び *in vivo* モデルを用いて検証する。

#### 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 4 件)

1. Cullin 3 regulates ADAMs-mediated ectodomain shedding of amphiregulin. Nakayama H, Sakaue T, Maekawa M, Fujisaki A, Higashiyama S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Apr 30;499(1):17-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.097. (査読有)

2. Glutamate-dependent ectodomain shedding of neuregulin-1 type II precursors in rat forebrain neurons. Iwakura Y, Wang R, Inamura N, Araki K, Higashiyama S, Takei N, Nawa H. *PLoS One*. 2017 Mar 28;12(3):e0174780. doi: 10.1371/journal.pone.0174780. (査読有)

3. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. Groth E, Pruessmeyer J, Babendreyer A, Schumacher J, Pasqualon T, Dreymueller D, Higashiyama S, Lorenzen I, Grötzinger J, Cataldo D, Ludwig A. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov;1863(11):2795-2808. doi: 10.1016/j.bbamer.2016.09.002. (査読有)

4. Ectodomain Shedding of Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1 (LYVE-1) Is Induced by Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A). 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. *J Biol Chem*. 2016 May 13;291(20):10490-500. doi: 10.1074/jbc.M115.683201. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Cullin3 コピキチン複合体による shedding 制御解析, 口頭, 松本依理奈, 近藤綾乃, 楠本智章, 藤原彰, 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, 2018/5/26, 米子, 国内

2. EGF ファミリー分子の shedding 特性解析, 口頭, 中山寛尚, 坂上倫久, 前川大志, 藤崎亜耶子, 東山繁樹 第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2016/5/28, 高知, 国内

[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

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

(4) 研究協力者

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