

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08648

研究課題名(和文) 上皮間葉転換に寄与するリン酸化蛋白質の研究

研究課題名(英文) Identification of phosphoproteins contributing to Epithelial-Mesenchymal Transition.

研究代表者

白木原 琢哉 (Shirakihara, Takuya)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30548756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞への長期のTGF- β 刺激は筋線維芽細胞様の変化(EMyoT)を誘導し、TGF- β とFGF-2の共刺激はEMTを増強する(eEMT)。そこで、eEMT誘導に関わるリン酸化シグナル経路の解明を目指した。ショットガン法による網羅的探索からEMyoTとeEMTでそれぞれ約250のタンパク質発現の上昇を認めた。SILAC法とチロシンリン酸化抗体による精製を組み合わせた探索から、EMyoTとeEMTでは約800のタンパク質リン酸化が異なることを明らかにした。複数のeEMT特異的リン酸化タンパク質のノックダウンではeEMT誘導能への変化は見出せなかったが、Axlの阻害剤はeEMT誘導を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- β とFGF-2の長期曝露によるeEMTは創傷治癒部位や繊維化形成部位、がん微小環境など実際の生体内で誘導されている現象であることが推測できる。それ故、本研究で明らかにしたAxl阻害剤によるeEMT誘導の抑制は、EMTを標的とした治療法開発に繋がる可能性がある。また、SILAC法から新規に同定した123のeEMT特異的なチロシンリン酸化タンパク質の中にも繊維化やがんの浸潤・転移促進に重要な未知のシグナル因子が含まれていることが予測される。

研究成果の概要(英文)：Long-term TGF- β stimulation of epithelial cells induces myofibroblast-like changes (EMyoT), and co-stimulation of TGF- β and FGF-2 enhances EMT (eEMT). Therefore, this study aimed to reveal the phosphorylation signaling pathway involved in the induction of eEMT. Comprehensive shotgun proteomic analysis revealed approximately 250 elevated protein expression in EMyoT and eEMT, respectively, and a combined search using the SILAC method and purification with tyrosine phosphorylation antibodies revealed approximately 800 distinct protein phosphorylations in EMyoT and eEMT. Knockdown of multiple eEMT-specific phosphoproteins did not reveal any change in eEMT inducibility, but inhibitors of Axl suppressed eEMT induction.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：EMT チロシンリン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EMTとは個体形成や創傷治癒過程で観察される上皮細胞が形態的及び機能的に間葉細胞様に分化転換する現象であり、病理学的にも肺や肝臓の線維化疾患やがんの進展への深い関与が知られている。

TGF- β はEMTを誘導する主要なサイトカインであり、上皮細胞の培養液中に添加すると線維芽細胞様の形態変化や上皮・間葉マーカーの変化、運動能の亢進を誘導する(tEMT; TGF- β induced-EMT)。研究代表者は、tEMT獲得後の持続的なTGF- β 刺激下で α -SMAの発現が高まり、筋線維芽細胞様の性質を獲得していることを発見した(EMyoT; epithelial-myofibroblast transition)。一方で、tEMT獲得細胞にFGF-2を更に加えたところTGF- β 長期培養によるEMyoT誘導は抑制され、代わりに線維芽細胞様の細胞骨格の変化や運動能・浸潤能・細胞外基質分解能が増強された(eEMT; enhanced-EMT, Shirakihara T, et al. EMBO J. 30:783-, 2011)。

そこで、FGFシグナルによるEMT増強の分子メカニズムをタンパク質修飾の観点から解明し、生体内での当該現象の確認を目的として、eEMTによって新規にリン酸化されるタンパク質の網羅的探索を試みた。

2. 研究の目的

TGF- β とFGF-2の両シグナルが合わさってeEMTが誘導されるときに新規にリン酸化されたタンパク質を特定し、EMTの特徴である形態変化や運動能亢進を促すリン酸化シグナル経路を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1)eEMT特異的チロシンリン酸化タンパク質の探索

マウス乳腺上皮NMuMG細胞を無刺激、TGF- β 刺激(EMyoT)、TGF- β とFGF-2の共刺激(eEMT)の下で長期培養し、総タンパク質の差異をショットガン法によって調査する。

通常培地もしくは安定同位体標識をしたリジンを含むSILAC培地で15日間培養したNMuMG細胞をそれぞれ4日間リガンド刺激し、EMyoTとeEMTを誘導する。それぞれの細胞抽出液を混合した後、抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降を行い、LC-MS解析により濃縮したリン酸化タンパク質の網羅的な探索を行う。各タンパク質のリン酸化状態の比と総タンパク質量の比を比べ、EMyoT特異的にチロシンリン酸化修飾が上昇しているタンパク質を特定する。

(2)eEMT特異的な発現上昇タンパク質やチロシンリン酸化タンパク質の機能解析

LC-MSによって同定したEMyoT特異的なチロシンリン酸化タンパク質群から着目した因子のノックダウンを行い、EMyoT誘導が抑制されるかを観察する。また、酵素活性等の機能を有するタンパク質に対しては阻害剤を用いて、同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1) EMyoT, eEMTの細胞内総タンパク質の比較

NMuMG細胞を1ng/ml TGF- β や30ng/ml FGF-2で4日間処理し、回収した総タンパク質をショットガン法によって網羅的に探索した。同定した3625のタンパク質のうち、EMyoTとeEMTではそれぞれ247と237の発現量が無刺激と比較して2倍以上に上昇しており、166タンパク質が共通であった(図1)。一方、71タンパク質がeEMTで特異的に上昇しており、その中で54タンパク質がEMyoTと比較してeEMT特異的で2倍以上増加しているものとして同定された。

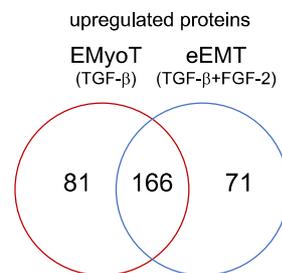


図1. eEMT特異的に71タンパク質の発現上昇が認められ、うち54がEMyoTの2倍以上であった。

(2) EMyoT, eEMT のチロシンリン酸化タンパク質の精製と同定

安定同位体標識をしたリジンを含む SILAC 培地で培養した EMyoT と eEMT の細胞抽出液を混合し、総タンパク質と抗チロシンリン酸化抗体により精製したリン酸化タンパク質を再びショットガン法で解析した(図2)。リン酸化タンパク質濃縮方法などの最適化を行い、785 のタンパク質にリン酸化状態の差が認められた。123 のチロシンリン酸化タンパク質は複数回の SILAC で再現よく同定され、その中には細胞運動、細胞間接着、細胞骨格に関わるタンパク質や受容体、転写因子等が含まれていた。

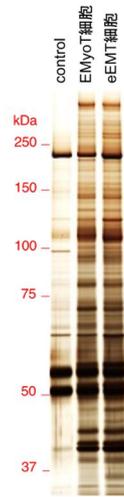


図2. EMyoTやeEMTの細胞抽出液を抗リン酸化チロシン抗体で濃縮し、銀染色で検出した。

(3) 同定したタンパク質の機能解析

EMyoT と eEMT でチロシンリン酸化状態の異なるタンパク質から eEMT の機能に關与するリン酸化を探索することを試みた。既知の機能や発現場所、リン酸化量などを材料に注目したタンパク質を shRNA でノックダウンし、eEMT 誘導に影響が現れるかどうかを観察した。およそ 30 種のタンパク質に対して shRNA を設計してノックダウンを行ったが、NMuMG 細胞の eEMT 誘導能に大きな変化は見出せなかった。また、eEMT 特異的リン酸化タンパク質として同定した 6 種のタンパク質の抗体を購入し、抗チロシンリン酸化抗体により精製した eEMT 特異的リン酸化タンパク質の検出を試みたが、どの抗体でも確認することができなかった。

そこで次に、候補タンパク質の一つであるチロシンキナーゼ Ax1 に着目し、その活性の阻害効果を検討した。Gilteritinib など複数の Ax1 阻害剤は TGF- β と FGF2 による eEMT 誘導を阻害する様子が観察された(図3)。ただし、ウェスタンブロットでは eEMT による Ax1 のリン酸化を検出することはできなかった。

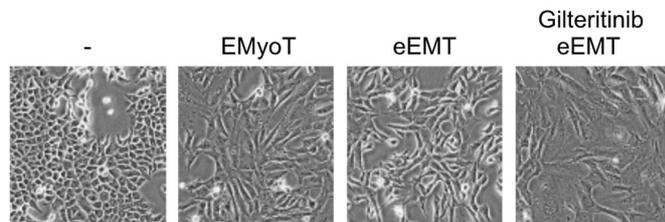


図3. 3日間のTGF- β とFGF-2刺激によるeEMTの形態変化誘導は、100nM Gilteritinibによって抑制され、EMyoTに近い形態を示した。

一方、別な方法を用いて eEMT で活性化しているチロシンキナーゼの探索も試みた。各種マウス受容体型チロシンキナーゼのリン酸化抗体アレイを用いて、無刺激、tEMT (TGF- β 刺激 1 日間)、EMyoT (TGF- β 刺激 5 日間)、eEMT (TGF- β +FGF-2 刺激 5 日間)の比較を行った。しかし、各メンブレン間で差異を認めることはできなかった(図4)。最後に、様々なチロシンキナーゼを標的とした

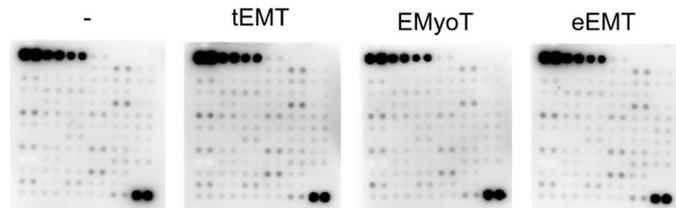


図4. 無刺激、tEMT、EMyoT、eEMTをそれぞれ誘導したNMuMG細胞の抽出液中のリン酸化タンパク質を抗体アレイにより検出した。

阻害剤を使って eEMT 誘導阻害作用のスクリーニングを行った結果、新たに 2 種類の阻害剤が TGF- β と FGF2 添加 3 日後に誘導される eEMT の形態変化を抑制することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shirakihara Takuya, Yamaguchi Hideki, Kondo Tadashi, Yashiro Masakazu, Sakai Ryuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Transferrin receptor 1 promotes the fibroblast growth factor receptor-mediated oncogenic potential of diffused-type gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02270-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 白木原琢哉
2. 発表標題 スキルス胃がんの進展に関わるFGFR2結合タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白木原琢哉
2. 発表標題 Functional analysis of FGFR2 binding target protein in scirrhou gastric cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白木原琢哉, 堺隆一
2. 発表標題 スキルス胃がんの進展に関わるFGF受容体結合タンパク質TfR1の機能解析
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木原琢哉, 堺隆一
2. 発表標題 びまん性胃癌の進展に関わるFGFR2結合タンパク質の探索と機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Shirakihara, Ryuichi Sakai
2. 発表標題 Identification and functional analysis of FGFR2 binding proteins in diffuse-type gastric carcinoma
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Shirakihara
2. 発表標題 The effects of FGF signaling on TGF-beta-induced EMT
3. 学会等名 8th International EMT Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------