

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06215

研究課題名(和文) エフリン受容体シグナルの破綻によるがん悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Disruption of Eph receptor signaling in cancer cells

研究代表者

加藤 裕教 (Kato, Hironori)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エフリン受容体(Eph)は、正常な組織においてはリガンドであるephrinと結合することで、神経軸索ガイダンスや血管の誘導など、発生過程において様々な役割を担う。一方、Eph受容体はがん細胞において高発現している例が報告されており、がん悪性化に関与していることが示唆されている。本研究では、1) EphA3はリガンド非依存的に制御され、浮遊培養条件下での神経膠芽腫細胞の凝集体形成促進に働いていること、2) EphA2は低グルコース状態においてリガンド非依存的に神経膠芽腫細胞の生存維持に関わること、3) EphA3の過剰発現によって細胞の運動性が促進していること、を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん細胞においてのみ特に活性化されているEph受容体シグナルに焦点を絞り、そのシグナル伝達に関わる分子を網羅的に解析していくことで、がんの悪性化を担う新たなシグナル伝達的一端を解明することをめざすと同時に、がん細胞の悪性度の違いを分子レベルで明らかにしていくことを目的とする。本研究による成果は、副作用の少ない抗がん剤やがんの悪性度を示す新たな指標の創出に寄与する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The ephrin receptor (Eph) plays various roles in the developmental process, such as nerve axon guidance and vascular guidance, by binding to the ligand ephrin in normal tissues. On the other hand, it has been reported that the Eph receptor is highly expressed in cancer cells, suggesting that it is involved in cancer malignant transformation. In this study, it was newly found that 1) EphA3 acts in a ligand-independent manner to promote the formation of glioblastoma cell aggregates under suspension culture conditions, 2) EphA2 promotes glioblastoma cell survival under glucose-limited conditions in a ligand-independent manner, and 3) overexpression of EphA3 promotes cell motility.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん 受容体 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

Eph 受容体は、受容体型チロシンキナーゼの中でも最大のファミリーを構成し、細胞表面に存在する ephrin と結合することで Eph 受容体のチロシンキナーゼ活性が上昇し、細胞内にシグナルを伝達する。これまでもノックアウトマウスなどを用いた解析から、発生過程における神経軸索ガイダンスや血管の誘導をはじめとする細胞の位置決定や、様々な組織における恒常性の維持など、非常に多くの生理機能に関与していることが報告されている。一方で、Eph-ephrin シグナルのバランスが崩壊すると、様々な疾患に結びつくことも明らかになりつつある。その中でも EphA2 受容体は、乳がんをはじめ、肺、大腸、腎、膵がん、脳腫瘍など、数多くの組織由来のがんにおいてその発現量とがん細胞の悪性度の高さに相関性があることが確認されており、がん細胞の浸潤性への関与や、特に最近ではがん幹細胞の自己複製能や未分化性維持との関係についても報告されている。ところが、EphA2 及びその関連分子をターゲットとしたがんに対する有効な治療法が未だ確立されていないのが現状である。がん細胞における EphA2 に関する興味深い点として、正常な組織においてはリガンドである ephrin と結合することで、EphA2 は細胞内へとシグナルを伝達するが、がん細胞において高発現している EphA2 は、EGF などの刺激によって ephrin 非依存的に細胞内領域の 897 番目のセリンがリン酸化され、細胞の増殖や運動性の促進につながっていることが我々も含めて報告されている。この点から、正常な細胞とがん細胞では EphA2 を介したシグナル伝達が大きく異なることが予想され、従って本研究課題が取り組むがん細胞特異的な EphA2 のシグナル伝達の解明が、がん悪性を分子レベルで理解し、新たな診断法や治療法のターゲット開発へとつながる重要な位置づけとなる研究課題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、がん細胞においてのみ特に活性化されている Eph 受容体シグナルに焦点を絞り、そのシグナル伝達に関わる分子を網羅的に解析していくことで、がんの悪性を担う新たなシグナル伝達の一部を解明することをめざすとともに、がん細胞の悪性度の違いを分子レベルで明らかにしていくことを目的とする。本研究では、これまで申請者が明らかにしてきた EphA2 のリン酸化制御や細胞運動性促進に関わる一連の分子群の研究成果をもとに、未だ不明な点が多い EphA2 の過剰な発現とがん悪性化との関係に関わる分子機構の解明、さらには EphA2 以外の Eph 受容体によるがん悪性化のメカニズムの解明につなげていきたいと考えている。特に本研究で主に用いる神経膠芽腫細胞は、グリア細胞から発生するがん(神経膠腫)の中でも最も悪性度が高いがん細胞であるため、正常なグリア細胞あるいは比較的悪性度の低い神経膠腫細胞における Eph 受容体との違いを比較検討することで、Eph 受容体シグナルの破綻によって細胞内ではどのような異常が見られ、悪性度の高いがんへと変化していくのか、分子レベルで明らかにしていくことが可能であると考えられる。さらには、神経膠芽腫のみで見られるシグナル経路特有のタンパク修飾などの情報提供にもつながることが期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) 神経膠芽腫細胞の凝集体形成制御の解析

既に作製した EphA3 過剰発現細胞、あるいは発現抑制細胞を用いて浮遊培養を行い、形成される凝集体の大きさを顕微鏡にて解析を行った。浮遊状態でのがん細胞の凝集体形成は、がんの転移と深く関わっていることが報告されている。また、浮遊状態で凝集体を形成させた細胞から細胞溶解液を回収し、細胞内で活性化されているシグナル伝達の違いを調べた。一方、EphA3 の発現の有無によって発現レベルが異なるタンパク質を浮遊培養から細胞を回収し検討を行った。

### 2) 低グルコース培養による細胞の生存性の解析

グルコースを含まない培地を作成し、細胞を 12 時間培養した後の細胞死の割合を、培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼの酵素活性を測定することによって算出した。EphA2 のリン酸化レベルは、抗リン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法により検出した。また、EphA2 欠損神経膠芽腫細胞は、CRISPR-Cas9 システムにより樹立した。

### 3) 神経膠芽腫細胞の細胞運動性の解析

神経膠芽腫細胞の細胞運動性の違いを過剰発現細胞、あるいは RNAi による発現抑制により解析を行なった。細胞運動性については、トランスウェルを用いて行い、細胞を crystal violet で染色することにより移動した細胞の数を測定した。

## 4. 研究成果

### 1) EphA3 による浮遊培養条件下での神経膠芽腫細胞の凝集体形成促進

神経膠芽腫細胞において高発現が確認されている EphA3 受容体に着目し、EphA3 欠損細胞及び過剰発現細胞をそれぞれ神経膠芽腫細胞で作成し、これらの細胞を用いて神経膠芽腫細胞における EphA3 受容体の発現が及ぼす影響について解析を行った。がん細胞は、浮遊条件下で培養すると細胞同士が結合し大きな細胞の凝集体を形成することが知られており、単体の細胞より細胞死が引き起こされる割合が少なく、さらには細胞凝集体の大きさとがん細胞の増殖及び生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

存との間には相関があることが報告されている。我々の結果から、EphA3 欠損細胞では神経膠芽腫細胞の浮遊培養条件下で形成される細胞の凝集体の大きさが有意に小さくなった一方、EphA3 過剰発現細胞では凝集体の形成が促進された。また、浮遊培養条件下では神経膠芽腫の悪性化に大きく関わっている EGF によって EphA3 の発現がタンパク質レベルで制御され、それには EGF による Akt の活性化が必要であることも示唆された。さらには、EphA3 は N-cadherin の発現上昇を促進することで、凝集体の形成を促進していることも見出された。この機能には、リガンドである ephrin の関与は認められなかった。以上の結果から、EphA3 は EGF-Akt シグナル経路によってリガンド非依存的に制御され、浮遊培養条件下での神経膠芽腫細胞の凝集体形成促進に働いていることが示唆された。

### 2) EphA2 による低グルコース条件下での神経膠芽腫細胞の生存維持促進

神経膠芽腫細胞において高発現が確認されている EphA2 受容体に着目し、EphA2 の高い発現量が神経膠芽腫細胞に及ぼす影響について検討を行った。その結果、グルコース欠乏条件下において EphA2 の 897 番目のセリンのリン酸化が亢進していることが明らかになった。さらに、グルコース欠乏による EphA2 のリン酸化には活性酸素種の蓄積が関与していることが見出された。また、神経膠芽腫 U251 細胞を用いて、EphA2 欠損細胞を CRISPR/CAS9 システムによって作成し、グルコース欠乏における EphA2 の役割を検討した。その結果、グルコース欠乏において EphA2 欠損細胞は、コントロール細胞と比較して有意に細胞生存率が低いことが明らかになった。以上の結果から、EphA2 は低グルコース状態において 897 番目のセリンがリン酸化を受け、その結果低グルコース環境における神経膠芽腫細胞の生存維持に関わることが示唆された。

### 3) EphA3 による細胞の運動性促進作用

神経膠芽腫細胞において高発現が確認されている EphA3 受容体について、siRNA を用いた EphA3 の発現抑制、及び過剰発現による神経膠芽腫細胞への影響について解析を行った。その結果、siRNA を用いて EphA3 のノックダウンを行った細胞では、コントロール細胞と比較して細胞の運動性の低下が見られた。一方、EphA3 を恒常的に発現させた細胞では、コントロール細胞と比べて運動性の促進が観察された。また、EphA3 を恒常的に発現させた細胞において、ミオシン軽鎖のリン酸化の増加が見られ、ROCK 阻害剤である Y-27632 によりミオシン軽鎖のリン酸化、並びに細胞運動性の促進作用が抑制された。細胞運動性の促進作用は、Rho 特異的阻害剤である C3 酵素によっても抑制された。以上の結果から、神経膠芽腫細胞では EphA3 の高発現によって、リガンド非依存的に細胞の運動性が促進し、その作用に Rho-ROCK 経路が関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Itsuki, Yoshimura Shige H., Katoh Hironori	4. 巻 295
2. 論文標題 High cell density increases glioblastoma cell viability under glucose deprivation via degradation of the cystine/glutamate transporter xCT (SLC7A11)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6936 ~ 6945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012213	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 -
1. 著者名 Yamamoto Marina, Teramoto Koji, Katoh Hironori	4. 巻 78
2. 論文標題 Epidermal growth factor promotes glioblastoma cell death under glucose deprivation via upregulation of xCT (SLC7A11)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109874 ~ 109874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2020.109874	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 -
1. 著者名 Hayashima Kazuki, Kimura Ikuo, Katoh Hironori	4. 巻 539
2. 論文標題 Role of ferritinophagy in cystine deprivation-induced cell death in glioblastoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.075	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 -
1. 著者名 Koji Teramoto, Hironori Katoh	4. 巻 62
2. 論文標題 The cystine/glutamate antiporter xCT is a key regulator of EphA2 S897 phosphorylation under glucose-limited conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.05.014	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 -

1. 著者名 Toyama, M., Hamaoka, Y., Katoh, H.	4. 巻 508
2. 論文標題 EphA3 is up-regulated by epidermal growth factor and promotes formation of glioblastoma cell aggregates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 715-721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.002	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 -

1. 著者名 Umeda K., Negishi, M., Katoh, H.	4. 巻 17
2. 論文標題 RasGRF1 mediates brain-derived neurotrophic factor-induced axonal growth in primary cultured cortical neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 56-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.11.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山口一樹、吉村成弘、加藤裕教
2. 発表標題 mTOR活性に制御されたリソソームによるxCTの分解が、神経膠芽腫細胞におけるグルコース欠乏状態での細胞生存に關与する
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 文室彩音、寺本昂司、渡邊祐三、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞のグルコース依存性におけるxCT結合タンパク質の役割
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蜷川優希、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞におけるシスチン欠乏に対する応答性の違い
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早嶋一貴、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞におけるシスチン欠乏とGPX4阻害の応答性の違い
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中溝悠太、田村裕穂、加藤裕教
2. 発表標題 EphA2による神経膠芽腫細胞増殖制御におけるFilaminAの役割
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺本昂司、木村郁夫、加藤裕教
2. 発表標題 EphA3による神経膠芽腫細胞の運動性制御とその分子機構
3. 学会等名 第141回 日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuho Hamaoka, Hironori Katoh
2. 発表標題 The role of EphA2 in EGF-induced glioblastoma cell proliferation.
3. 学会等名 4th International Cancer Symposium/Cancer Research Center of Lyon (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱岡裕穂、渡邊祐三、加藤裕教
2. 発表標題 グリオブラストーマ細胞増殖制御に関わるEphA2結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口翔太、加藤裕教
2. 発表標題 Scribbleによるグリオブラストーマ細胞の増殖制御
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口一樹、加藤裕教
2. 発表標題 グリオブラストーマ細胞におけるmTORシグナルによるグルコース依存性とxCT発現の制御
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺本昂司、加藤裕教
2. 発表標題 グルコース飢餓によるアミノ酸トランスポーターxCTを介したEphA2リガンド非依存的シグナルの制御
3. 学会等名 第66回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺本昂司、根岸 学、加藤裕教
2. 発表標題 グルコース飢餓によるEphA2リガンド非依存的シグナルの活性化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本茉里奈、根岸 学、加藤裕教
2. 発表標題 グリオblastoma細胞におけるグルコース依存性とxCTの発現調節
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018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
---------	---------