

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06218

研究課題名(和文) HB-EGF-HSPG-ErbB4シグナル系の導入によるがん細胞増殖抑制法の検討

研究課題名(英文) Inhibition of cell proliferation by induction of HB-EGF-HSPG-ErbB4 signaling system

研究代表者

岩本 亮 (IWAMOTO, Ryo)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：10213323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリン結合性増殖因子HB-EGFはその受容体ErbB1あるいはErbB4を介して細胞にシグナルを伝達する。HB-EGFは種々の癌において増殖促進に機能するが、マウス心臓弁形成過程では、間質細胞に対して増殖抑制に機能し、これには間質内でHB-EGFとヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)との相互作用が必須であり、受容体としてはErbB4が機能している。本研究では、HB-EGFが発現し増殖促進に機能しているがん細胞に対し、HSPG及びErbB4を導入することで、細胞を増殖させているHB-EGFを増殖抑制に転換させ増殖を阻止する事を目的とする、新規ながん治療法の開発をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFファミリーの増殖因子と、その受容体であるErbBファミリー2量体の相互・対応関係については、理論的にはそのリガンド-受容体のトランス関係及び受容体2量体化のシス関係、及びこれらの膨大な組合せから生じる下流シグナルの多様性が考えられてきたが、実際の生体内でこのような相互関係が、相反する拮抗シグナルによる細胞増殖制御機構として機能しているということはこれまで全く知られていなかった。この知見を、本研究で応用的に用いることにより、従来の分子標的治療のように標的分子を封じるのではなく、活性転換という形で「標的を生かして使う」という、新たなコンセプトを打ち出すもので、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The heparin-binding growth factor HB-EGF transduces signals to cells via its receptor ErbB1 and/or ErbB4. Although HB-EGF functions to promote cell proliferation in various cancers, it also functions to suppress proliferation of stromal cells during mouse heart valve formation, in which the interaction of HB-EGF to heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) is essential, and ErbB4 functions in this process. In this study, we aim to develop a novel cancer therapy by introducing HSPGs and ErbB4 into cancer cells expressing HB-EGF, which functions to promote proliferation, and to prevent proliferation by converting HB-EGF bioactivity into suppression of proliferation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞増殖因子 増殖抑制 細胞・組織 がん シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ ErbB ファミリーは、EGFR(ErbB1)から ErbB4 の4種類から構成される。ErbB 受容体にリガンドが結合すると各々はホモあるいはヘテロ2量体を形成し、細胞内キナーゼが相互の複数の細胞質領域チロシン残基をリン酸化し、これらを認識する種々のアダプタータンパクをそこへリクルートすることで、下流へのシグナル伝達を惹起する。各 ErbB 受容体への種々のリガンドの親和性の違いや、各 ErbB 受容体の細胞内領域アミノ酸配列の多様性と各 ErbB の2量体の膨大な組合せにより、下流シグナルの多様性が生じる。EGF ファミリーはこの ErbB ファミリー受容体に結合する増殖因子の仲間であり、本研究報告者らはそれらの中で特に HB-EGF の研究を行っている。HB-EGF は EGFR あるいは ErbB4 と結合するため、理論上 HB-EGF は両者いずれかから構成されるすべてのホモあるいはヘテロ2量体に結合して多様なシグナルを伝達できる。

HB-EGF は卵巣がんを含む様々ながん細胞の増殖等の病理的過程に深く関わっている [1]。一方で HB-EGF は種々の生理的過程においても実に様々な役割を果たしていることが、申請者らによる主にノックアウト (KO) などの HB-EGF 遺伝子改変マウスを用いた研究から明らかになっている [2]。例えば上皮の発生・再生過程における上皮シートの移動や、心臓の機能維持における心筋細胞の生存に HB-EGF は必須に機能している。さらに HB-EGF は肺胞形成過程 [3] や心臓弁形成過程 [4-7] においては細胞増殖の抑制に機能している。これらの知見で特に興味深いことは、HB-EGF ががんなどの病理的過程では細胞増殖促進に機能しているのに対し、マウスの生理的過程において増殖促進に機能している過程が1つも見つかっていない、特に肺胞形成過程や心臓弁形成過程では逆に増殖抑制に機能しているという点である。このことは HB-EGF の本来の機能が増殖促進ではなく、実は細胞移動や増殖抑制因子としての機能であり、病理的過程ではこのような機能を制御する機構が破綻し、HB-EGF が増殖促進機能に転換しているという仮説が考えられる。さらに考察を進めると、生理的過程において HB-EGF を増殖抑制因子として機能するよう規定している制御因子あるいはシステム (因子群) を、この HB-EGF 制御が破綻しているがん細胞などに導入することで、がんの治療が可能となる。つまりこれは、制御破綻状態の HB-EGF を正常な制御状態に復帰させるという新たな疾病治療法となり得る。

このような仮説・展望に基づき、申請者らはこれまでに特に心臓弁形成過程に着目し、HB-EGF による細胞増殖抑制の分子メカニズム解明を進めた。種々の変異 HB-EGF 遺伝子改変マウス (ノックアウト、非分泌型ノックイン、HSPG 結合不全型ノックイン) による研究から、心臓弁の発生過程で HB-EGF は弁内皮細胞に局限して発現し間質内に分泌され、HSPG を介して間質細胞に作用し、その増殖を抑制する事が明らかとなった。実際、これら全ての変異 HB-EGF マウス胎仔で間質細胞の過増殖を伴った弁肥厚を呈する [4-6]。さらにその後の研究から、HB-EGF 欠失時の間質細胞の過増殖では、間質細胞上で EGFR のホモ2量体が機能しているのに対し、HB-EGF が増殖を抑制するときは、EGFR/ErbB4 ヘテロ2量体が機能していること、そして特に ErbB4 細胞内領域 (ICD) の細胞内切断遊離が増殖抑制に必須であることが明らかとなった [7]。

2. 研究の目的

これらの知見から、HB-EGF を増殖抑制因子として機能するよう規定している制御因子あるいはシステム (因子群) について、細胞外因子として HSPG、細胞内因子として ErbB4 シグナルがその有力な候補であることが強く示唆される。そこで本研究の目的は、HB-EGF が増殖促進に機能しているがん細胞において、HSPG と ErbB4 を適切に導入することにより、HB-EGF の活性を細胞

増殖促進から抑制へ転換させるという新たながん治療法を検討し、その確立を目指すことである。この最終目的のために、本研究では HB-EGF による細胞増殖抑制に関わる ErbB4 側、HSPG 側双方の分子機構の解析を行う。

3. 研究の方法

1) ErbB4導入による細胞増殖抑制系の確立とその分子機構の解析

ErbB4 には、その alternative splicing の違いにより、ICD 細胞内切断遊離を受けるもの (JM-a) と受けないもの (JM-b) ICD 内に特異モチーフを有するもの (CYT-1) と有さないもの (CYT-2) の計 4 通りの型がある。

1-1) 種々のヒトあるいはマウスの正常あるいは癌細胞株への CYT-1 型あるいは CYT-2 型 ErbB4-ICD の誘導発現による細胞増殖抑制系の検討。

1-2) 上記で効果的な CYT 型/細胞株での全長 JM-a 型 ErbB4 の導入発現と HB-EGF 添加による細胞増殖抑制系の検討・確立。

1-3) 上記増殖抑制誘導前後での網羅的遺伝子発現解析による、増殖抑制に関与する ErbB4 下流因子候補の探索。

1-4) 上記候補因子の KO による増殖抑制における ErbB4-ICD 誘導性必須因子群の決定とシグナル伝達の解析。

2) HSPG導入によるHB-EGF-ErbB4受容体結合選択性転換とその分子機構の解析

EGFR と ErbB4 を共発現する細胞で HB-EGF を ErbB4 特異的に作用させるためには、そのリガンド選択性を決定する因子の助けが必要である。これについて、HB-EGF と ErbB4 の特異的結合に HSPG が関与するということが過去に複数報告され、さらに申請者らの研究からも心臓弁間質細胞の増殖抑制に HB-EGF と HSPG の相互作用が必須であることから、この因子の役割を HSPG に求め、HB-EGF の ErbB4 特異的結合における HSPG の関与について検討し、その機構を解析する。

2-1) 野生型あるいは HSPG 欠失 CH0(677)細胞への EGFR, ErbB4 あるいは両者の導入発現細胞株を樹立し、HB-EGF 結合性比較実験により、HB-EGF の EGFR あるいは ErbB4 に対する結合選択性における HSPG の貢献度を検討する。

2-2) 677 細胞への各種 HSPG 遺伝子導入発現により、HB-EGF-ErbB4 結合性の回復を調べ、HB-EGF-ErbB4 結合選択性を決定する HSPG 種を同定する。

2-3) 増殖抑制転換能と HS 糖鎖構造(長さ・硫酸化度など)の相関性を検討し、細胞への HS 糖鎖添加のみでの HB-EGF-ErbB4 結合性昂進の可能性を検討する。

4. 研究成果

1) ErbB4導入による細胞増殖抑制系の確立とその分子機構の解析

種々のヒトあるいはマウスの正常あるいは癌細胞株への CYT-1 型あるいは CYT-2 型 ErbB4-ICD の誘導発現による細胞増殖抑制系の検討：

乳腺分化や管腔形成誘導において ErbB4 の関与が報告されているマウス正常乳腺上皮由来細胞株 HC11 を親細胞として用い、これに Tet-On system によって誘導的に、CYT-1 あるいは CYT-2 タイプ ErbB4-ICD を発現させる実験系を構築することで、CYT-1 と CYT-2 の細胞増殖・生存に対する作用について比較検討を行った。

通常培養時の細胞増殖に対する ICD 発現の効果に関しては、CYT-1 タイプの発現により細胞増殖は有意に抑制されたが、CYT-2 タイプでは顕著な効果は認められなかった。一方、血清飢餓時

の細胞増殖・生存性に対する ICD 発現の効果に関しては、CYT-1 タイプ、CYT-2 タイプともに発現による細胞死の促進が観察された。特に、その効果は CYT2 タイプで顕著であった。以上の結果から、ErbB4-ICD による細胞増殖抑制が、本実験系でも CYT-1 タイプで確認でき、CYT2 タイプに関しては細胞死の促進に関与している可能性が示唆された。

今後は次の段階として、以下の検討を行っていく予定である。

- CYT2 型/細胞株での全長 JM-a 型 ErbB4 の導入発現と HB-EGF 添加による細胞増殖抑制系の検討・確立。
- 上記増殖抑制誘導前後での網羅的遺伝子発現解析による、増殖抑制に関与する ErbB4 下流因子候補の探索。
- 上記候補因子の KO による増殖抑制における ErbB4-ICD 誘導性必須因子群の決定とシグナル伝達の解析。

2) HSPG 導入による HB-EGF-ErbB4 受容体結合選択性転換とその分子機構の解析

野生型あるいは HSPG 欠損 CHO(677)細胞への ErbB4 の各 サブタイプあるいは EGFR の導入発現細胞を用いて、HB-EGF 結合性比較実験により、HB-EGF の ErbB1 あるいは ErbB4 に対する結合選択性における HSPG の貢献度を検討する予定であったが、HB-EGF 結合性を評価する実験系に修正を要する問題が発生し、この問題に取り組んだ。その結果、HB-EGF とその受容体ペアとの結合を直接評価するのではなく、受容体及びその直下のシグナルの活性化状態を IP-WB で間接的且つ定量的に評価する計を再構築した。そして今年度において、この評価系を用いて実験を行ったが、残念ながら明確な結果は得られなかった。今後は、以下の検討を行っていく予定である。

- HB-EGF とその受容体ペアとの結合についての別の評価系の再検討
- 野生型あるいは HSPG 欠損 CHO(677)細胞への EGFR, ErbB4 あるいは両者の導入発現細胞株を樹立し、HB-EGF 結合性比較実験により、HB-EGF の EGFR あるいは ErbB4 の対する結合選択性における HSPG の貢献度を検討する。
- 677 細胞への各種 HSPG 遺伝子導入発現により、HB-EGF-ErbB4 結合性の回復を調べ、HB-EGF-ErbB4 結合選択性を決定する HSPG 種を同定する。
- 増殖抑制転換能と HS 糖鎖構造(長さ・硫酸化度など)の相関性を検討し、細胞への HS 糖鎖添加のみでの HB-EGF-ErbB4 結合性昂進の可能性を検討する。

3) HB-EGF 依存性増殖がん細胞に対する HB-EGF-HSPG-ErbB4 を介した増殖抑制転換系の確立

本研究では残念ながら、最終目標である、HB-EGF の細胞増殖促進から抑制への活性転換という方法論をがん細胞増殖抑制とその治療に応用する所までは到達しなかったが、本研究をさらに進めることによって、標的分子を封じるのではなく、活性転換という形で「標的を生かして使う」という新たなコンセプトによるがん治療法の開発を目指していきたい。

[引用文献]

- [1] Miyamoto, S., et al. **Cancer Sci.** 97: 341-347, 2006
- [2] Mekada, E. and Iwamoto, R. **UCSD-Nature Molecule Pages** doi: 10.1038/mp.a002932.01, 2008
- [3] Minami, S., Iwamoto, R. and Mekada, E. **Dev. Dyn.** 237: 248-258, 2008
- [4] Iwamoto, R., et al. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100: 3221-3226, 2003
- [5] Yamazaki, S., Iwamoto, R., et al. **J. Cell Biol.** 163: 469-475, 2003
- [6] Iwamoto, R., et al. **Development** 137: 2205-2214, 2010

[7] Iwamoto, R., et al. **J. Cell Sci.** 130: 1321-1332, 2017

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shuhao Lin, Daiki Hirayama, Gembu Maryu, Kimiya Matsuda, Naoya Hino, Eriko Deguchi, Kazuhiro Aoki, Ryo Iwamoto, Kenta Terai, Michiyuki Matsuda	4. 巻 5
2. 論文標題 Redundant roles of EGFR ligands in the ERK activation waves during collective cell migration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101206	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------