

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23795

研究課題名(和文)非定型的活性型EphA2による上皮間葉転換およびがん幹細胞化の制御機構

研究課題名(英文)Regulation of epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness by the non-canonical activation of EphA2.

研究代表者

周越(Zhou, Yue)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：10733339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが以前に報告した非定型的活性型EphA2は、がんの悪性進展に関わり、がん病態制御における次なる標的となりうる。しかし、その機能については依然として未解明な部分が多いため、機能解析が急務となっている。本研究では、がん悪性転化に重要な上皮間葉転換やがん幹細胞性、さらには応用研究として薬剤耐性における非定型的活性型EphA2の役割を解析した。その結果、非定型的活性型EphA2はがん幹細胞性や白金製剤シスプラチンへの耐性に関わることがわかった。一方で、非定型的活性型EphA2は上皮間葉転換を制御しなかったが、間葉系細胞において、その局在は細胞運動を制御することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、チロシンキナーゼ型受容体を標的としたさまざまながん分子標的薬が開発されており、臨床で使用されている。EphA2はがんの悪性化に関わるが、その詳細な機能解析はなされていない。本研究で得られた研究成果は新たな分子標的治療の基盤となり、臨床研究に向けて革新的な情報を提供できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Our group has reported that the non-canonical activation of EphA2 is involved in cancer malignancy and can be one of target molecules for the development of anti-cancer agents. However, the function of this non-canonical activation of EphA2 is not fully understood. Here, I tried to elucidate whether the non-canonical activation of EphA2 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT), cancer stemness and cisplatin-resistance in cancer cells. I found that the non-canonical activation of EphA2 regulates cancer stemness and drug-resistance. Although it does not control EMT, it promotes cell migration by regulating the localization of non-canonical activated EphA2 in mesenchymal cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：EphA2 上皮間葉転換 がん幹細胞 薬剤耐性

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(RTK)は、がん分子標的治療で中心的な役割を果たす。EphA2 は正常細胞でチロシンキナーゼ活性依存的に細胞間接着を強固に保つ。申請者らは、がん細胞で EphA2 Ser-897 リン酸化がキナーゼ RSK によって誘導され、がん細胞の運動能を亢進させることを発見した (Zhou Y, Nat Commun, 2015)。Ser-897 リン酸化は定型的なチロシンキナーゼ活性に依存せず、従来の EphA2 と異なる機能を持ち、がんの悪性を誘導する。つまり“非定型的活性化”状態にある EphA2 は、がん悪性化シグナルを伝達する。この非定型的活性化型 EphA2 は、がん病態制御における次なる標的となりうるが、その機能の全貌は不明であり、機能解析が課題となっている。

がん細胞の悪性転化には上皮間葉転換(EMT)が関与する。EMT はがん転移時に起こり、細胞の運動能を亢進させる。また、EMT によって、がん細胞ががん幹細胞へと形質転換する。がん幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、抗がん剤や放射線に対する強い抵抗性を持ち、がんの転移や再発、薬剤耐性に関わる。EphA2 の発現は EMT やがん幹細胞性、薬剤耐性に関わるが、非定型的活性化型 EphA2 の関与についてはほとんど解析されていない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らの先駆的な研究を発展させる形で、がん悪性転化に重要な上皮間葉転換やがん幹細胞性、さらには応用研究として薬剤耐性における非定型的活性化型 EphA2 の役割を解析する。また、派生研究として、非定型的活性化型 EphA2 を介した間葉系細胞の遊走制御機構を解析する。

3. 研究の方法

課題 1—非定型的活性化型 EphA2 による上皮間葉転換の制御機構

ヒト肺がん細胞 A549 に対し、siRNA を用いて EphA2 をノックダウンしたのち、EMT の誘導因子 TGF- β を作用させ、EMT 化マーカーの発現を Western blotting で検討した。また、CRISPR-Cas9 システムを用いて、EphA2 ノックアウト細胞株を樹立して、同様に EMT 化マーカーの発現を検討した。さらに、機能解析として細胞の遊走能を評価した。

課題 2—間葉系細胞における非定型的活性化型 EphA2 を介した細胞遊走の制御機構

TGF- β を用いて EMT を誘導した A549 細胞に対し、EphA2 に対する siRNA や RSK 阻害剤を作用させた際の細胞の遊走をタイムラプスイメージングシステムにて検討した。また、EphA2 の細胞内局在を調べるために A549 細胞に対して抗 EphA2 抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて局在を観察した。さらに、小胞輸送を阻害した際の細胞遊走能と EphA2 の細胞内局在を検討した。

課題 3—非定型的活性化型 EphA2 によるがん幹細胞性の制御機構

ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 に対し、EphA2 に対する siRNA や RSK 阻害剤を作用させたのち、スフェロイド培養し、細胞の形態を観察した。また、EphA2 Ser-897 残基を Ala に置換した変異体を持つ細胞株と親株をスフェロイド培養し、細胞の形態を観察した。

課題 4—非定型的活性型 EphA2 によるシスプラチン耐性化機構

シスプラチンへの耐性を持つ A549 細胞株 (ACR4) における Ser-897 のリン酸化機構を、RSK 阻害剤や RSK に対する siRNA を用いて調べた。また、機能解析として、EphA2 に対する siRNA を作用させた際の細胞生存・増殖能を WST-8 アッセイにて検討した。

4. 研究成果

課題 1—非定型的活性型 EphA2 による上皮間葉転換の制御機構

A549 細胞に対し、TGF- β を作用させると、EphA2 の発現および EphA2 の Ser-897 リン酸化が増強した。この時、細胞の遊走をタイムラプスイメージングで検討したところ、遊走能の亢進が認められた。また、EphA2 のノックダウンや RSK 阻害剤の作用により、遊走能が低下した。このことにより、非定型的活性型 EphA2 が EMT に関わることを示唆された。そこで、siRNA を用いて EphA2 をノックダウンし、そこへ TGF- β を作用させ、EMT マーカーである E-cadherin や V-cadherin、Vimentin、SNAIL、SLUG、ZO-1 の発現を検討した。しかし、予想とは反して EphA2 ノックダウンによる EMT マーカーの変化は認められなかった。A549 細胞に対し、EphA2 をノックアウトした細胞株を 4 種類樹立し、同様の実験を行ったが、結果は同様であった。以上のことから、非定型的活性型 EphA2 は肺がん細胞 A549 における TGF- β による上皮間葉転換を制御しないことがわかった。

課題 2—間葉系細胞における非定型的活性型 EphA2 を介した細胞遊走の制御機構

非定型的活性型 EphA2 は上皮間葉転換を制御しなかったが、間葉系細胞でその発現が増加していることから、間葉系細胞の機能を制御すると考え、細胞遊走に着目し、実験を行った。TGF- β を用いて EMT を誘導したヒト肺がん細胞 A549 に対し、EphA2 をノックダウンしたところ、細胞の遊走能の低下が認められた。また、RSK 阻害剤や RSK に対する siRNA を用いて RSK をノックダウンしても同様の結果となった。EphA2 の細胞内局在を検討したところ、細胞膜上に EphA2 が多く発現することがわかり、特に、細胞の浸潤先端に多く局在することが認められた。RSK 阻害剤や RSK ノックダウンにより、EphA2 の局在は変化し、主に細胞内に存在した。EphA2 は恒常的にエンドサイトーシスし、小胞輸送により細胞膜上にリサイクルされることが報告されている。このことから、EphA2 が浸潤先端に局在することで細胞の運動性を制御すると考えた。そこで、小胞輸送を阻害する薬剤モノネシンを細胞に作用させた。その結果、細胞膜上の EphA2 発現量が減少し、細胞遊走も抑制された。このことから、間葉系細胞において、非定型的活性化型 EphA2 は細胞膜上に局在することで、細胞の運動性を制御することがわかった。

課題 3—非定型的活性型 EphA2 によるがん幹細胞性の制御機構

ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 に対し、siRNA を用いて EphA2 をノックダウンしたのちに、スフェロイド培養し、細胞の形態を観察した。がん幹細胞性を持つ細胞ではスフェロイドが形成される。MDA-MB-231 細胞ではスフェロイドが形成されたため、がん幹細胞性を有することがわかった。MDA-MB-231 細胞に対し EphA2 をノックダウンすると、スフェロイドが形成されなかった。また、RSK 阻害剤や siRNA を用いた RSK ノックダウン細胞においても同様にスフェロイドの形成が抑制された。以上のことから、非定型的活性型 EphA2 はがん幹細胞性を制御することが示唆された。そこで、EphA2 Ser-897 残基を

Ala に置換したノックイン細胞の樹立を目指した。しかし、2 アレルともに目的の変異を持ったノックイン細胞は樹立できなかつた。そのため、実験手法を変更し、EphA2 ノックアウト細胞を樹立したのちに EphA2 Ser-897 残基を Ala に置換した変異体を発現させることにした。目的の細胞は得られたものの、期待する結果は得られなかつた。EphA2 ノックアウト細胞を作製する過程でスフェロイド形成に関わるシグナルが変化したためだと考えられた。そこで、野生型もしくは変異型 EphA2 を過剰発現させた細胞株を樹立した。この細胞株をスフェロイド培養したところ、親株よりも野生型 EphA2 過剰発現株ではスフェロイドが速く、そして強固に形成された。一方、変異型 EphA2 過剰発現株ではスフェロイドが形成されなかつた。以上の結果により、非定型的活性型 EphA2 は乳がん細胞において、がん幹細胞性を制御することがわかつた。

課題 4—非定型的活性型 EphA2 によるシスプラチン耐性化機構

ヒト肺がん細胞 A549 にシスプラチンを作用させたところ、濃度依存的に細胞の生存率が抑制された。一方、EphA2 をノックダウンしても細胞生存率は抑制されなかつた。4 μ M のシスプラチンの作用により、A549 の細胞生存率は約 6 割であったが、EphA2 をノックダウンした A549 の細胞生存率は約 4 割にまで下がった。次に、A549 細胞に対してシスプラチン耐性をもった細胞株 A549-ACR4 を用いて検討を行った。親株と比べ、耐性株では EphA2 の発現が上昇し、それに伴い、EphA2 のリン酸化も増強した。このリン酸化は RSK 阻害剤によって抑制された。この耐性細胞に対し、EphA2 をノックダウンしたところ、親株とは異なり、細胞生存率は約 7 割にまで低下した。また、ノックダウン細胞にシスプラチンを作用させたところ、細胞生存率は約 4 割となった。以上のことから、非定型的活性化型 EphA2 は薬剤耐性に関わることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 周 越、櫻井 宏明	4. 巻 92
2. 論文標題 細胞内から受容体型チロシンキナーゼを活性化する仕組み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 420 ~ 430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920420	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 Song Leixin, Yang Fan, Wang Zhengtao, Yang Li, Zhou Yue	4. 巻 21
2. 論文標題 Ginsenoside Rg5 inhibits cancer cell migration by inhibiting the nuclear factor- κ B and erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2 signaling pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12713	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yue Zhou, Iori Yamahata, Tomohiro Yamamura, Satoru Yokoyama, Hiroaki Sakurai
2. 発表標題 The Rab11-dependent non-canonical EphA2 activation induces cell motility.
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 周越、山畑伊織、山村朋弘、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 RSK-EphA2経路によって誘導される細胞遊走はRab11とRab11-FIP1に依存する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 周越、山畑伊織、山村朋弘、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 Non-canonical activation of EphA2 induces cell migration via Rab11 and Rab11-FIP1
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会/総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zhou Y., Oki R., Yamahata I., Yokoyama S., Sakurai H.
2. 発表標題 Regulation of cancer cell malignancy via MK2-RSK-EphA2 axis
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周越、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼp38による RSK-EphA2経路の制御機構
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中章裕、大木良太、周越、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 p38-MK2-RSK経路を介したEphA2のリン酸化
3. 学会等名 富山薬学研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周越、大木良太、田中章裕、山畑伊織、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 Regulation of cancer cell motility via p38-MK2-RSK-EphA2 axis
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周越、大木良太、田中章裕、山畑伊織、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 p38-MK2-RSKを介したEphA2の非定型的活性化制御
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------	---------