

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16326

研究課題名（和文）がん微小環境におけるVEGFR3非定型的活性化機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of non-canonical activation of VEGFR3 in cancer microenvironment

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：受容体型チロシンキナーゼ（RTK）は、様々ながん細胞において発現しているタンパク質であり、そのチロシンリン酸化を介した活性化ががんの悪性を誘導することが知られている。これまでに、我々はRTKに属するEGFRやEphA2について解析を行っており、そのセリン・スレオニンリン酸化がこれまでに知られてきたチロシンリン酸化とは異なる機能を持つことを報告してきた。本研究では、がんの転移に関わるRTKのVEGFR3に注目し、VEGFR3のセリン・スレオニンリン酸化の重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VEGFR3はがん転移の促進因子であるが、その制御機構や機能については未解明な部分が多い。本研究により、VEGFR3の新しい制御機構が明らかとなった。これは、VEGFR3の研究に新展開をもたらすだけでなく、がんの病態理解やがん分子標的治療への応用に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Receptor tyrosine kinases (RTKs) are expressed in various cancer cells. It has been reported that their tyrosine phosphorylation-mediated activation induces cancer malignancy. We have been analyzing RTKs, including EGFR and EphA2. Interestingly, we found that their Ser/Thr phosphorylation has different functions from their tyrosine phosphorylation. In the present study, we focused on VEGFR3 of RTKs, which is involved in cancer metastasis and demonstrated the importance of Ser/Thr phosphorylation in VEGFR3.

研究分野：分子生物学

キーワード：VEGFR3 リン酸化 がん

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、その多くが活性化変異や過剰発現により、がんの増殖や転移を誘導する。RTK の活性化はチロシンキナーゼ (TK) に基づくため、Tyr 残基の機能解析が研究の中心であった。しかし、タンパク質修飾リソースから、RTK の全リン酸化部位のうち半数以上が Ser/Thr 残基であることが分かった。我々はこれまでに RTK の EGFR と EphA2 における Ser/Thr リン酸化を解析し、それらの機能は Tyr リン酸化とは異なるため、これを非定型的活性化と呼んでいる。

VEGFR3 は RTK の一種であり、リンパ管内皮細胞 (LECs) に発現し、リンパ管新生やリンパ管内皮の維持に関わる。一方、がん微小環境において、VEGFR3 はがんの悪性進展を促す。微小環境下に存在する間質細胞やがん細胞において、炎症性サイトカインや低酸素シグナルによって VEGFR3 リガンドが誘導され、分泌される。リガンドは LECs 上の VEGFR3 と結合し、腫瘍組織へのリンパ管新生を誘導し、腫瘍の遠隔転移を促す。そのため、がん転移抑制には VEGFR3 に対する標的治療が有効だと考えられる。また、近年、VEGFR3 ががん細胞にも発現し、細胞増殖を促すことが示され、注目が集まっている。微小環境でがんの悪性化を誘導する VEGFR3 だが、その詳細な制御機構や機能はわかっておらず、解析が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では VEGFR3 への Ser/Thr リン酸化に注目した。がん微小環境では様々な細胞からサイトカインが分泌され、これらはセリン・スレオニンキナーゼを活性化させ、VEGFR3 の Ser/Thr リン酸化を誘導する可能性がある。実際、タンパク質修飾リソース PhosphoSitePlus から、VEGFR3 の細胞内ドメイン内には計 7 つの Ser/Thr 残基がリン酸化制御を受けることが分かった。それらがこれまでに知られていない TK 活性とは異なる機能、つまり非定型的活性化依存的な機能を介してがんの悪性進展を促す可能性がある。そこで、本研究では VEGFR3 の非定型的活性化について解析を行った。

3. 研究の方法

VEGFR3 のリン酸化はウエスタンブロットリングおよび Phos-tag ウエスタンブロットリングを用いて検出した。リン酸化部位の同定は現慶應義塾大学増田豪先生の協力を得て行った。非リン酸化模倣型 VEGFR3 は VEGFR3 の発現プラスミド DNA をテンプレートとしてリン酸化部位をアラニンに置換するよう部位特異的変異導入キットを用いて作製した。野生型および非リン酸化模倣型 VEGFR3 を Lipofectamine 2000 または Lipofectamine 3000 を用いて細胞に導入した。ノックダウン実験は Lipofectamine RNAiMAX を用いて siRNA を細胞に導入した。安定発現株は、野生型および非リン酸化模倣型 VEGFR3 を細胞に発現させたのち、ハイグロマイシン B に対して耐性を持つ細胞株を限界希釈法にて得た。抗がん剤を作用させた際の細胞生存率は WST-8 を用いて評価した。細胞内局在は免疫染色を用いて検出した。

4 . 研究成果

(1) VEGFR3 の非定型的活性化を担うリン酸化部位同定

VEGFR3 の非定型的リン酸化の有無の検討するため、HEK293 細胞に VEGFR3 を過剰発現させ、様々な刺激を行った後、リン酸化をシフトバンドとして検出する Phos- tag ウエスタンブロッティングを行った。12-0-テトラデカノイルホルボール 13-アセタート (TPA) の刺激で VEGFR3 のバンドシフトが認められた。また、VEGFR3 のキナーゼ欠損体を発現するプラスミド DNA 作製し、細胞に発現させたところ、野生型と同様に TPA でバンドシフトが認められた。これらの結果により、チロシンキナーゼ活性に依存しない VEGFR3 のリン酸化の存在が明らかになった。

次に、このリン酸化部位の同定を行った。TPA 刺激を行った VEGFR3 過剰発現 HEK293 細胞から VEGFR3 を免疫沈降したのち、タンパク質を消化し、VEGFR3 のリン酸化を含むペプチドを LC-MS/MS で分析した。その結果、データベースには登録されていない VEGFR3 のリン酸化部位が見つかった。そこで、目的のリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作製して、実験に用いた。TPA 刺激を行ったところ、目的のリン酸化が検出できた。また、そのリン酸化部位をアラニンに置換した変異体 VEGFR3 発現プラスミド DNA を作製し、細胞に導入し、TPA を作用させたところ、野生型とは異なり、Phos- tag ウエスタンブロッティングで VEGFR3 のバンドシフトが認められなかった。以上のことから、VEGFR3 の非定型的活性化が存在することを見だし、そのリン酸化部位を同定できた。

(2) VEGFR3 の非定型的活性化を担うリン酸化の制御機構

VEGFR3 の非定型的活性化を担うリン酸化の制御機構を調べるため、様々なキナーゼ阻害剤を作用させたのちに TPA で細胞を刺激し、VEGFR3 のバンドシフトおよびリン酸化を検出した。その結果、キナーゼ X の阻害剤の処理によって、VEGFR3 のバンドシフトおよびリン酸化が抑制された。また、恒常的活性化型のキナーゼ X を VEGFR3 過剰発現 HEK293 に導入したところ、VEGFR3 のバンドシフトおよびリン酸化が誘導された。以上の結果により、VEGFR3 の非定型的活性化はキナーゼ X によって制御されることがわかった。

(3) 抗がん剤への耐性化への VEGFR3 の非定型的活性化の寄与

卵巣がんにおいて、VEGFR3 は抗がん剤への抵抗性に関わることが報告されている。そこで、卵巣がん細胞において、VEGFR3 の非定型的活性化と抗がん剤抵抗性の関係について検討した。卵巣がん細胞 OVCAR-8 に対して、野生型 VEGFR3 およびそのリン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化模倣体を安定発現させた細胞株を樹立し、実験に用いた。まず、TPA 刺激で野生型 VEGFR3 導入細胞においてのみ VEGFR3 の非定型的活性化が誘導されることを確認した。このリン酸化は責任キナーゼに対する阻害剤や siRNA で抑制された。機能解析を行うために、それぞれの細胞株間での細胞増殖能の違いを検討したが、変化は認められなかった。抗がん剤を作用させたところ、野生型 VEGFR3 導入細胞のほうが非リン酸化模倣型 VEGFR3 導入細胞と比べて生存率が上がった。この 2 つの細胞株の細胞抽出液を比べたところ、細胞増殖に関わるシグナルが異なり、VEGFR3 の細胞内局在も異なっていた。これらの結果により、非定型的リン酸化の有無により、VEGFR3 の細胞内局在が変化することで抗がん剤への耐性化に関わることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高島惇誌、周越、山根正也、山田あかね、増田豪、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 卵巣がん細胞におけるVEGFR-3の非定型的リン酸化
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島惇誌、周越、山根正也、山田 あかね、増田豪、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 VEGFR-3の非定型的リン酸化の同定およびその機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	増田 豪 (Masuda Takeshi)		

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
---------	---------