

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650228

研究課題名（和文） 膜型増殖因子のER/核膜オートトランスロケーション分子機構解明とがん特性診断応用

研究課題名（英文） Molecular mechanism of auto-translocation of membrane anchored EGFR ligand into the nuclear membrane and its diagnostic application of cancer

研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授

研究者番号：60202272

研究成果の概要（和文）：

膜型細胞増殖因子proHB-EGFやproAREGは、正常細胞では細胞膜に局在するが、悪性度の高いがん細胞には、直接ER/核膜に移行する（これをオートトランスロケーションと呼ぶ）例があり、有意な抗がん剤抵抗性を示す。本研究では、proAREGのER/核膜オートトランスロケーションと抗がん剤抵抗性獲得を*in vivo*解析により、実証した。また、その分子機構の一端として、C-末端ペプチドの切断を提唱し、責任プロテアーゼの探索を行った。本研究は、抗がん剤感受性診断法開発に向けて、有用性とその意義を示した。

研究成果の概要（英文）：

HB-EGF and AREG are synthesized as a membrane-anchored growth factor and expressed at the plasma membrane as pro-forms in normal cells. In some malignant tumor cells in culture, however, proHB-EGF and proAREG trans-locate at the ER/nuclear membrane, which endows resistance for anti-cancer drugs. In this study, we established mouse models bearing tumor expressing proAREG auto-translocation mutant, and showed that the tumor acquired resistance for chemotherapy *in vivo*. We also tried to identify C-terminal processing proteases of proHB-EGF and proAREG.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん細胞の特性

## 1. 研究開始当初の背景

上皮増殖因子(epidermal growth factor; EGF)ファミリー分子（これまでに13分子が同定済み）は、細胞膜貫通型蛋白質前駆体（pro型）として細胞膜表面に発現した後、膜

表面で shedding を受け、遊離型増殖因子となると考えられている。しかし、最近の私どもの研究から、一部が shedding を受けずに細胞内に取り込まれた後、ER/核膜に局在変化し、核膜内膜にまで到達することを、EGF

ファミリー分子の pro-heparin-binding EGF-like growth factor (proHB-EGF)ならびに pro-amphiregulin (proAREG) を用いて明らかにしてきた。この核膜内膜局在化は、転写抑制因子や核マトリックス蛋白質と相互作用を引き起こし、遺伝子発現を大きく制御することを突き止めてきた。その過程で、proHB-EGF ならびに proAREG の C-末端アミノ酸の切断反応により、C-端領域に内在する K-(x)-K-x-x 配列が、末端側に露出することが ER/核膜への局在変化に必須であることを突き止め、この切断プロテアーゼが ER/核膜への局在化に極めて重要な鍵となることを示唆した。

一方、培養がん細胞株で proAREG の免疫染色を行ったところ、shedding 誘導無しに ER/核膜へ局在化する（これをオートトランスロケーションと呼ぶ）がん細胞株を見出し、この細胞株が抗がん剤抵抗性を持つ事を示した。

## 2. 研究の目的

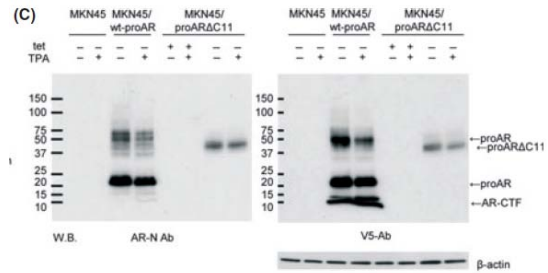
proHB-EGF と proAREG は、正常細胞では適切な制御下において、その細胞内局在を細胞膜から ER/核膜へと逆行的に変えるが、悪性度の高いがん細胞では、直接、ER/核膜にオートトランスロケーションする例があり、こうした例においては、有意な抗がん剤抵抗性を示す。以上の私どもの研究成果に基づき、本研究では、proAREG の ER/核膜オートトランスロケーションと抗がん剤耐性との関連を *in vivo* で検証する。さらに、これらの ER/核膜オートトランスロケーションの制御分子と考えられる C-末端切断プロテアーゼの探索・同定を目的とし、抗がん剤抵抗性診断への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

**proAREG の C-末端欠損変異体の作成と ER/核膜オートトランスロケーション細胞株の樹立:** proAREG の ER/核膜オートトランスロケーションには C-端領域に内在する K-(x)-K-x-x 配列が末端側に露出する事が必要である。そこで、proAREG の C-末端 11 残基を欠損させた変異体の発現をテトラサイクリン添加で抑制する Tet-OFF/proAREG ΔC11 を作成した。コントロールとして、野生型 proAREG を発現する Tet-OFF/proAREG を作製し、各々の実験に用いた。

一方、AREG 遺伝子の内在性発現が最も少ない胃がん細胞株を選択するために MKN45 をはじめとする 7 種のヒト胃癌細胞株での両者の遺伝子発現量を定量 PCR により解析し、MKN45 と MKN28 細胞株を選んだ。さらに、MKN45 と MKN28 細胞株に、

Tet-OFF/proAREG ΔC11 遺伝子を導入し、安



定発現する細胞株を樹立した (図 1)。

図 1 : proAREG ΔC11 の Tet-ON/OFF による蛋白質産生誘導。パネル左は proAREG の細胞外ドメインに対する抗体で検出、パネル右は proAREG の細胞内ドメインに挿入した V5-tag に対する抗体で検出した。TPA は shedding 誘導剤として用いた。(図中の AR は AREG を示す)

**Tet-OFF/proAREG ΔC11 遺伝子発現 MKN45 と MKN28 細胞株のマウス移植モデルによる腫瘍増殖と抗がん剤耐性特性の解析:** 4 週令のヌードマウスの脇腹に  $3.0 \times 10^6$  個の細胞を移植した。遺伝子発現抑制群では、テトラサイクリンアナログであるドキシサイクリンを 1mg/ml 濃度で含む水で給水し、遺伝子発現抑制群では、ドキシサイクリンを含まない水で給水した。また、細胞移植 28 日後にマウスを剖検した。抗がん剤はシスプラチン(CDDP)、パクリタキセル(PTX)、5-フルオロウラシル(5-FU)を、それぞれ 12 mg/kg, 2 mg/kg, 60 mg/kg で、図中に記載した計画で尾静脈投与した。proAREG ΔC11 の発現は、V5-tag 抗体による免疫染色により評価した。

**ヒト生検試料を用いた、proAREG 免疫染色による発現解析:** ヒト胃がん生検試料 41 例を用いて、proAREG 蛋白質の発現を組織免疫染色法により解析した。

## 4. 研究の成果

**Tet-OFF/proAREGΔC11 遺伝子発現 MKN45 のマウス移植モデルによる腫瘍増殖と抗がん剤耐性特性の解析:** マウス個体に移植したがん細胞でのテトラサイクリン(-/+)による proAREG ΔC11 の産生誘導を V5-tag 抗体による組織免疫染色により確認した (図 2A)。また、proAREG ΔC11 の細胞内局在は、核膜周辺の膜画分であったのに対し (図 2A-a)、野生型 proAREG は細胞膜への局在を示した (図 2A-e)。

図 2A : MKN45 細胞に発現した proAREGΔC11 の組織免疫染色像。

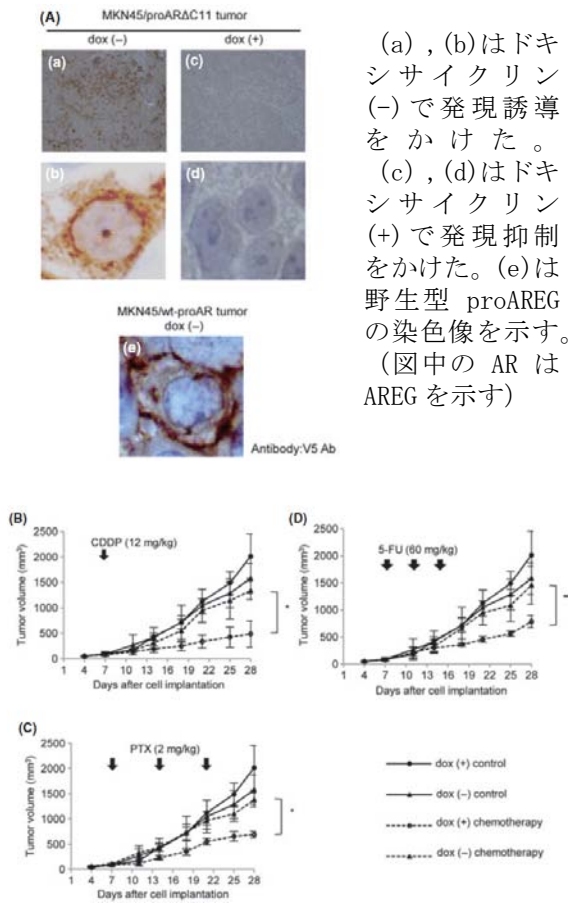


図 2 B-D : ノードマウスに移植した proAREGΔC11/MKN45 のドキシサイクリン (-/+) および抗がん剤投与 (-/+ )での腫瘍増殖能。(B) : シスプラチン(CDDP)、(C) : パクリタキセル(PTX)、(D) : 5-フルオロウラシル(5-FU) \*p<0.05

これらのマウスに CDDP、PTX、5-FU を投与し、腫瘍サイズを測定した結果を図 2 B-D に示した。

上記の図 2 B-D に示す様に、腫瘍はドキシサイクリン(-)による proAREG ΔC11 蛋白質産生誘導により、3 種のそれぞれの抗がん剤投与に対して、統計的有意差を持って抵抗性を示した。

Tet-OFF/proAREG ΔC11 遺伝子発現 MKN28 細胞株を用いた実験でもほぼ同等の結果を得た。

**ヒト生検試料を用いた、proAREG 免疫染色による発現解析** : ヒト胃癌生検試料 41 例を用いて、proAREG 蛋白質の発現を組織免疫染色法により解析した。

図 3 A に示す様に、ヒト胃癌生検試料 46 例中、AREG 陽性であったものは 16 例、陰性であったものは 30 例であった。

また、図 3 B に示す様に、患者の生存期間中央値は AREG 陽性群では 311 日であったの

(a), (b) はドキシサイクリン (-) で発現誘導をかけた。(c), (d) はドキシサイクリン (+) で発現抑制をかけた。(e) は野生型 proAREG の染色像を示す。(図中の AR は AREG を示す)

に対し、陰性群間では 387 日と、統計的有意差 (p=0.046) が示された。

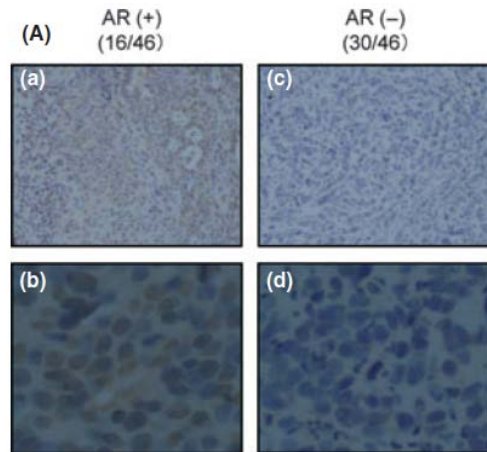


図 3 A : ヒト胃癌生検試料での proAREG 組織免疫染色。proAREG の細胞外ドメインを認識する抗体を用いて染色した。(図中の AR は AREG を示す)

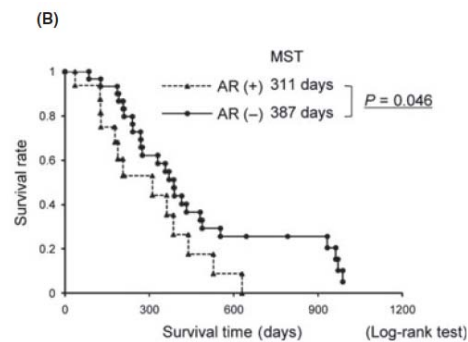


図 3 B : 胃癌患者の生存率。生存期間中央値は AREG 陽性群では 311 日、陰性群間では 387 日。p=0.046 (図中の AR は AREG を示す)

**proHB-EGF と proAREG の C-末端切断プロテアーゼの探索** : 当大学無細胞生命科学工学センター構築した、コムギ胚芽インビトロ膜蛋白質再構成システムを用いて、ヒトゲノム情報より抽出した約 100 種の膜型プロテアーゼのリコンビナント蛋白質を合成し、proHB-EGF と proAREG のそれぞれの C-末端切断活性測定に供した。

HB-EGF および AREG の C-末端ドメイン切断活性測定は、切断部位の特定が極めて重要である事から、質量分析系を用いて測定するマルチプルリアクションモニタリングシステムを構築し、このシステムを用いて活性測定を開始した。

以上の知見は、proAREG が胃癌の抗がん剤感受マーカーとして有用である事を強く示唆

するものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Yoshida M, Shimura T, Fukuda S, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Nakazawa T, Higashiyama S, Joh T. Nuclear translocation of pro-amphiregulin induces chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci.* 103:708-715, 2012. (査読 有)

2. Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M. A Disintegrin and Metalloenzyme (ADAM) 17 Activation Is Regulated by  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin in Kidney Mesangial Cells. *PLoS One* 7:e33350. 2012. (査読 有)

3. Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nakayama H, Inoue H, Higashiyama S. Monoubiquitination of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding. *Biochem Biophys Res Commun.* 420:315-320, 2012 (査読 有)

4. Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol. Biol. Cell.* 2012 in press (査読 有)

5. Tanaka H, Nishioka Y, Yokoyama Y, Higashiyama S, Matsuura N, Matsuura S, Hieda M. Nuclear envelope-localized EGF family protein amphiregulin activates breast cancer cell migration in an EGF growth factor domain independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012 in press (査読 有)

6. Yamamoto T, Suganami T, Kiso-Narita M, Scherle PA, Kamei Y, Isobe M, Higashiyama S, Ogawa Y. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes in vitro. *Obesity.* 18:1888-1894, 2010. (査読 有)

7. Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Kubota E, Hirata Y, Mizushima T, Mizoshita T, Tanaka M, Mabuchi M, Tsukamoto H, Tanida S, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T. TGF $\beta$  induces proHB-EGF shedding and EGFR transactivation through ADAM activation in gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1402:449-454, 2010. (査読 有)

8. Shiomi T, Boudreault F, Padem N, Higashiyama S, Drazen JM, Tschumperlin DJ. Lysophosphatidic acid stimulates epidermal growth factor-family ectodomain shedding and paracrine signaling from human lung fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 19:229-240, 2011. (査読 有)

9. Yoshioka R, Shiraishi A, Kobayashi T, Morita S, Hayashi Y, Higashiyama S, Ohashi Y. Corneal epithelial wound healing impaired in keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice in vivo and in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 630-639, 2011. (査読 有)

10. Higashiyama S, Nanba D, Nakayama H, Inoue H, Fukuda S. Ectodomain shedding and remnant peptide signalling of EGFRs and their ligands. *J. Biochem.* 150:15-22, 2011. (査読 有)

[学会発表] (計 6 件)

1. Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nakayama H, Inoue H, Higashiyama S. The role of monoubiquitination in the regulation of endocytosis and ectodomain shedding of a ligand of epidermal growth factor (EGF) receptor, amphiregulin. 第 34 回 日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 横浜

2. Shimura T, Yoshida M, Fukuda S, Mizoshita T, Kataoka H, Higashiyama S, Joh T. HB-EGF-CTF nuclear translocation induce gastric cancer invasion. 第 70 会 日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 5 日 名古屋

3. Yoshida M, Shimura T, Fukuda S, Higashiyama S, Mizoshita T, Kataoka H, Joh T.

Amphiregulin nuclear translocation might cause poor prognosis due to chemotherapeutic resistance in gastric cancer.

第70会 日本癌学会学術総会  
2011年10月4日 名古屋

4. 福田信治、中山寛尚、東山繁樹

Identification of novel molecules that regulate ectodomain shedding of EGF ligands

第33回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会 2010年12月9日 神戸

5. 東山繁樹、井上博文

C-terminal fragment signaling of proHB-EGF for protection of cardiac cell death

第18回 日本血管生物医学会学術集会 シンポジウム2：心不全・冠動脈 2010年12月1日 大阪

6. 東山繁樹

増殖因子による増殖の正と負のシグナル制御機構と癌微小環境制御

第48回日本癌治療学会 学術集会 JSCO-JCA joint symposium 1 「がんの微小環境（血管浸潤、がんの転移・浸潤）からのがん治療」 2010年9月29日 京都

[その他]

ホームページ等

[http://www.m.ehime-u.ac.jp/data/course/list\\_detail.php?id=201100000053](http://www.m.ehime-u.ac.jp/data/course/list_detail.php?id=201100000053)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・教授  
研究者番号：60202272

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

福田 信治 (FUKUDA SHINJI)

愛媛大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：70398238

澤崎 達也 (SAWASAKI TATSUYA)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・准教授

研究者番号：50314969

城 卓志 (JOH TAKASHI)

名古屋市立大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30231369

