

## 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 5 月 1 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791265

研究課題名（和文）ErbB ファミリー輸送分解分子群による乳がん悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Breast cancer regulation by traffic and degradation of ErbB family

研究代表者

桜井 遊 (SAKURAI YU)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・共同研究員

研究者番号：80451574

研究成果の概要（和文）：予後不良乳癌では ErbB2 および ErbB3 からなるヘテロダイマーの発現が頻繁に認められ、乳がん悪性化形質発現に機能している。ヘテロダイマーを分解しシグナル停止する受容体輸送・分解系の不活性化が乳がんの悪性化に関与する可能性を調べた。ヘテロダイマー発現細胞を構築し、定常状態および NRG1 $\beta$  刺激下における ErbB3 の分解経路について、プロテアソーム系またはリソソーム系のいずれかによって分解されるか検討した。ErbB3 の分解は、定常状態ではプロテアソーム系およびリソソーム系の双方が、NRG1 $\beta$  刺激ではプロテアソーム系で分解をうけた。分解酵素候補遺伝子について、多数のユビキチン化酵素（E3）の関与を検討した。Nrdp1 に加えて、さらに 2 種の E3 の関与が判明した。一方、ErbB3 の各種変異体を多数作成したところ、細胞質内でチロシンキナーゼ部位より C 末側の約 100 アミノ酸が分解に必要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：ErbB2/ErbB3 heterodimer is expressed on many breast cancers, and the signals derived from the dimer plays significant roles on malignant phenotypes. In the present study, I analyzed how the heterodimer is degraded. Whereas ErbB2 was relatively stable, ErbB3 was continuously degraded by the proteasome and lysosomes. NRG1 $\beta$  stimulation induced proteasome-dependent degradation. Among several E3s tested, I identified Nrdp1 and two additional E3s that ubiquitinated ErbB3. Further, intracellular portion of ErbB3 comprising of 100 aminoacids was required for the degradation, suggesting the possible ubiquitination target of ErbB3.

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	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科、がん

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんは我が国においても増加しており、比較的若年者に頻繁に発生する。したがって単に生命予後のみならず、Quality of Life の観点からも乳がんの克服が急務となっている。浸潤・転移を早期から惹起する乳がんは治療抵抗性が高く、臨床的に問題となる。予後不良の乳がんでは、ErbB2 および ErbB3 からなる 2 量体（ヘテロダイマー）の発現が頻繁に認められ、乳がん悪性化形質発現に機能していると考えられる。ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマー由来のシグナルは悪性化誘導能が非常に高い。一方、このヘテロダイマーを分解しシグナル停止する「受容体輸送・分解系」の不活性化が、乳がんの悪性化に関与する可能性が想定されるが、その詳細はほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では ErbB2 および ErbB3 を不活化するユビキチン化制御、ユビキチン化を認識して輸送・分解する小胞輸送系と発がん・悪性化形質の関わりを明らかにする。乳がん制御の新たな分子基盤を解明することで、新しい分子標的の同定と特異的治療薬開発に道筋をつけることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーの制御機構を明らかにするために、MCF7 乳がん細胞株等に ErbB2, ErbB3 を遺伝子導入する。このため、C 末側にタグを付加した発現ベクターを新たに構築した。作成した細胞は、ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーを安定発現し、さらに ErbB2/ErbB3 分解酵素としての候補遺伝子、あるいは「ErbB2, ErbB3 輸送・分解系候補遺伝子 (Hrs, VPS4B 等) の ESCRT 蛋白」の発現ベクターを安定に組み込むことができる。本細胞を活用し下記の実験を行う。

(1) MCF7 乳がん細胞を用いた ErbB2/ErbB3 分解酵素の同定：MCF7/ErbB2/ErbB3 細胞に HECT 型、RING 型の E3 ユビキチン化酵素 (E3: 乳がんを発現する分子) を導入する。候補遺伝子として、C-cbl, Cbl-b, Hakai, Nedd4-1, Nedd4-2, Itch, MARCH 1, 3, 8, Nrdp1, Triad3 を使う。E3 によって分解が誘導され、増殖シグナル・増殖能に変化が起こるか検討する。

(2) Her2/ErbB3 の分解機序に関する基礎的検討：ErbB3 の分解について詳細に調べ

るため、細胞内部位の各種欠損変異体および点突然変異体発現ベクターを作成し、分解責任部位を同定する。

(3) Her2/ErbB3 の輸送機序に関する基礎的検討：ErbB2/ErbB3 輸送酵素の同定を行うため、MCF7 に ESCRT 輸送系分子を導入し、ErbB2/3 の局在の変化、細胞形態の変化等を調べる。

(4) 超免疫不全マウス移植系を用いた乳がん癌細胞の in vivo 解析：ヒト乳がん細胞を超免疫不全マウス (NOG) に移植し、がんの定着、腫瘍塊形成、浸潤、転移に与える ErbB2/3 関連シグナルの影響を in vivo において検証する。

(5) 臨床乳がん検体での Her2/ErbB3 制御遺伝子の発現検証：ヒト乳がん臨床検体について同定した乳がん制御分子の発現を調べる。免疫組織染色、ウエスタンブロット法、real time PCR 法を用いて、宮城県立がんセンター乳腺がん検体 (インフォームドコンセント有のみに限る) を対象に、Her2/ErbB3 を輸送・分解する候補遺伝子の発現を調べる。

### 4. 研究成果

① 293T 細胞を用いて ErbB2/ErbB3 細胞および HECT 型、RING 型の E3 ユビキチン化酵素 (E3: 乳がんを発現する分子) を導入したところ、Nrdp1、Nedd4-1、Itch によって ErbB3 のユビキチン化が認められた。ユビキチン化は Nrdp1 が最も顕著であったが、Nedd4-1、Itch によるユビキチン化も有意であった。

② Cycloheximide 存在下でタンパク質合成を停止させた条件下において、タンパク質分解阻害剤を用い、ErbB3 分解の詳細な検討を行った。定常状態での ErbB3 分解はプロテアソームとライソソームの両者依存性であった、また、リガンドである NRGβ 刺激による ErbB3 分解 () は、プロテアソーム依存性であった。分解が誘導された。ErbB3 の細胞内部位の各種欠損変異体を用いた検討では、①Grb2 結合ドメイン (Y1199, Y1262) は分解と関係ないこと、②細胞質内領域でチロシンキナーゼより C 末側の 100 酸が分解に必要であること、が明らかとなった。

③ 誘導性癌細胞を用いた in vitro 悪性化解析：乳がん細胞株 MCF7 を対象として

ESCRT 系を阻害する実験系を構築した。レトロウイルスベクター (pRetroX) によって不活性型 Vps4 をドキシサイクリン依存性に発現する細胞株 MCF-7/Tet-onVPS4dn の樹立に成功し、増殖能を調べた。明らかな差異はなかった。そこで EMT、形態変化、運動性の亢進、の変化を検討した。EMT に関する遺伝子として twist1, snail, slug の mRNA を検討したが有意な差はなかった。Hrs のノックダウンによっても細胞増殖等に大きな影響は認められなかった。したがって、ErbB3 の輸送に関する限り、ESCRT 輸送系の関与はほとんどないものと考えられた。

- ④ 超免疫不全マウス移植系を用いた乳がん癌細胞の *in vivo* 解析：ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A を不死化し、ErbB2/ErbB3 関連シグナルを活性化した後、超免疫不全マウス (NOG) に移植した。がんの定着、腫瘍塊形成においては、MAPK および PI3K 系を同時に活性化することで顕著な腫瘍形成が認められた。これまでのところ浸潤、転移を惹起するには至っていない。ErbB2/3 を分解する機構の異常は、MAPK および PI3K を同時に活性化する可能性が高いことから、Nrdp1, Nedd4-1 の発現/機能異常と発がんの関連性が高い。今後、鋭意検討を継続することが必要と考えられる。
- ⑤ 乳癌検体と用いた検討では、ErbB3 を発現する症例においても、これまでのところユビキチン化酵素 Nrdp1, Nedd4-1 のタンパク質発現に異常を来した症例はない。今後、症例をさらに増やして検討を継続する必要がある。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桜井 遊 (SAKURAI YU)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・共同研究員

研究者番号：80451574