

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570227

研究課題名(和文) 増殖因子シグナルと接着シグナルの統合制御機構

研究課題名(英文) Integration and regulatory mechanism for growth factor and cell adhesion signals

研究代表者

水島 寛人 (Mizushima, Hiroto)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30379094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：増殖因子シグナルと細胞接着シグナルの統合制御機構を解明するため、細胞増殖におけるEGFRとインテグリンに共通したシグナル伝達分子であるFAKの役割とその調節機構の解析を行った。その結果、FAKはEGFRシグナル依存的細胞増殖に必要であることが明らかになった。また、FAKのFERMドメインの疑似リン酸化変異体が、シャペロンを介して微小管に結合することにより、細胞増殖を抑制することも明らかになった。以上の結果より、FAKはFERMドメインのリン酸化状態により、細胞増殖を正、負のいずれにも制御することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate regulatory mechanism for integration of growth factor signal and cell adhesion signal, role of FAK, which is a common downstream signaling molecule of EGFR and integrin, and its regulatory mechanisms were examined. As a result, FAK was found out to be required for EGFR-dependent cell growth. Furthermore, a FAK mutant carrying phosphorylation-mimic mutation at FERM domain inhibited cell growth by interacting with microtubules through chaperones. Taken together these results, it was suggested that FAK could positively and negatively regulate cell growth depending on phosphorylation states of FERM domain.

研究分野：細胞生物学

キーワード：増殖因子 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (EGFR, epidermal growth factor receptor) などの増殖因子受容体と細胞接着因子 (細胞外マトリックス受容体) であるインテグリンは、相互の機能を調節しながら共通のシグナル伝達経路を活性化することが知られている。しかしながら、これらの異なる受容体から伝達されるシグナルがどのように統合され、細胞の増殖を制御するかについては、不明な点が多い。

本研究の実施者は、増殖因子がプラスチックディッシュを用いた二次元培養系では顕著な増殖亢進作用を示さないのに対し、生体内やコラーゲンゲルなどを用いた三次元培養系において、細胞増殖を顕著に亢進する現象に着目し、それがインテグリンシグナルの強度の差に起因することを見出した。インテグリンシグナルが強く惹起される二次元培養系においては、インテグリンシグナルが主な増殖シグナルとなるため、増殖因子の作用はマスクされる。それに対し、インテグリンシグナルが減弱する三次元培養系においては、インテグリンシグナルと増殖因子シグナルが協調的に細胞増殖を亢進する。

生体内における癌細胞の三次元的な増殖を支持する分子機構を理解するためには、三次元培養系を用いた増殖因子シグナルと細胞接着シグナルが統合される分子機構を明らかにすることが必要不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、増殖因子シグナルと細胞接着シグナルが協調的に細胞増殖を支持する機構を明らかにすることにある。三次元培養系を用いることにより、二次元培養系では明らかにすることが不可能であった、新たな細胞増殖制御機構を明らかにすることが可能であると考えられた。

本研究を行うにあたり、EGFR とインテグリンに共通したシグナル伝達分子である、focal adhesion kinase (FAK) の役割に着目した。FAK は EGFR とインテグリンのシグナルを統合することにより、細胞運動促進に関与することが報告されている。そのため、細胞増殖においても、FAK は EGFR とインテグリンのシグナルを統合し、細胞増殖を促進している可能性が考えられた。

3. 研究の方法

FAK が EGFR シグナルとインテグリンシグナルの統合に関与する可能性の検証と、それを支持する分子機能を明らかにするため、以下の解析を行った。

(1) EGFR 依存的細胞増殖にインテグリンと FAK が関与することを調べるため、インテグリン阻害抗体、FAK ドミナント・ネガティブ変異体、FAK 阻害剤の影響を調べた。

(2) FAK ノックアウト細胞に FAK、EGFR、ならびに EGFR のリガンドの一つである

heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) を様々な組み合わせにより発現し、主に三次元コラーゲンゲルにおける増殖能を評価する事により、FAK の EGFR 依存的な細胞増殖への関与を解析した。

(3) FAK の機能はリン酸化により制御されていることから、データベース上に登録されたリン酸化部位のうち、種間で保存された部位に変異を導入した FAK 変異体を FAK ノックアウト細胞に導入し、EGFR 依存的細胞増殖に対する影響を調べた。

(4) EGFR 依存的細胞増殖に影響が認められた FAK 変異体の性状 (細胞における局在、キナーゼ活性、活性化に関与するリン酸化レベル) を、野生型 FAK と比較解析した。

(5) タグを付加した野生型ならびに変異型 FAK を細胞に発現し、細胞溶解液からタグ抗体カラムを用いて精製した。サンプルを電気泳動した後、銀染色により両者に結合の差が認められる分子を、質量分析により同定した。

(6) FAK と (5) で同定された FAK 結合タンパク質の細胞における局在を、免疫蛍光染色法ならびに蛍光タンパク質融合体を用いて解析した。

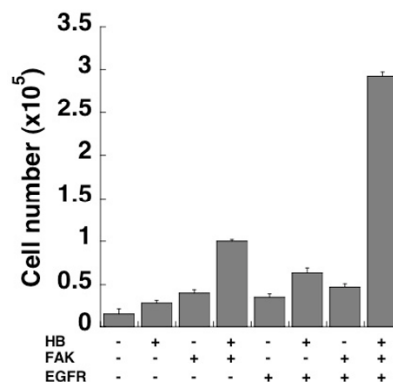
(7) FAK のリン酸化を検出するため、動物を用いた特異的抗体の作製と、抗体の可変領域のみから構成される single chain Fv (scFv) を発現する人工的なファージディスプレイライブラリーを用いて、リン酸化ペプチドに特異的に結合する scFv のスクリーニングを行った。

(8) 様々な条件で細胞培養し、質量分析ならびに scFv を用いてリン酸化が生じる条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 内在性 FAK を発現する細胞の三次元培養系における EGFR 依存的な増殖は、インテグリン阻害抗体、FAK ドミナント・ネガティブ変異体、FAK 阻害剤のいずれによっても抑制されたことから、インテグリンと FAK は必要であることが分かった。

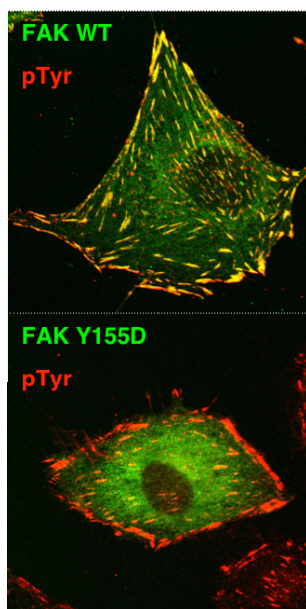
(2) FAK ノックアウト細胞に EGFR と HB-EGF を発現しても、高い増殖能を示さなかったのに対し、EGFR、HB-EGF、FAK を同時に発現することにより、高い増殖能を獲得することが分かった (下図参照)。



HB-EGF に応答した Erk の活性化を FAK ノックアウト細胞と FAK を再導入したリバタント細胞で比較したところ、プラスチックディッシュで培養した際には顕著な差は認められなかったが、コラーゲンゲルで培養した際には、リバタント細胞で有意に高い活性化を示した。これらの結果から、FAK は三次元培養系において Erk の活性化を亢進することにより、EGFR 依存的細胞増殖に寄与することが分かった。

(3)リン酸化部位に変異をもつ FAK を発現したところ、これまでに細胞運動に関与することが明らかになっていたリン酸化が、細胞増殖にも関与することが分かった。また、これまでに機能が明らかになっていなかった、FERM ドメインに存在する Y155 が、細胞増殖に関与することが明らかになった。

(4) Y155 の疑似リン酸化変異体 Y155D は、本来局在する接着斑には局在しないことが分かった (写真参照。接着斑は抗リン酸化チロシン抗体 pTyr で染色した)。



また、Y155D 変異体では FAK の活性化に必要な Y397 の自己リン酸化や、Src 依存的リン酸化が顕著に低下しており、それに伴いキナーゼ活性も低下していることが明らかになった。

(5)野生型と比較して、Y155D 変異体に選択的に結合するタンパク質を質量分析により同定したところ、シャペロンとして機能する Hsp90 と Hsc70、また Hsp90 と結合することが知られる微小管の主要な構成分子であるチューブリンであることが分かった。

(6)蛍光抗体を用いた免疫染色により、Y155D 変異体は、内在性の Hsp90b、Hsc70、チューブリンと共局在した。また、外来性の蛍光タンパク質融合 Hsp90b、Hsc70、チューブリンも、Y155D 変異体と共局在することが分かった。Hsp90b、Hsc70、チューブリンの局在は、野生型ならびに変異型 FAK を発現した場合でも大きく影響を受けなかったことから、チュ

ーブリンと結合したシャペロンに Y155D 変異体が選択的に結合した結果、接着斑への局在が抑制されることが明らかになった。

(7)ウサギとモルモットに Y155 リン酸化ペプチドを免疫して、ポリクローナル抗体の作製を行った。得られた抗血清からリン酸化ペプチドカラムを用いて、アフィニティー精製を行ったが、FAK 以外の分子のリン酸化を認識する抗体が多く含まれていたため、特異的な抗体を得ることが出来なかった。そこで、人工的な scFv をコードするファージディスプレイライブラリーを用いて、Y155 リン酸化ペプチドに特異的に結合する scFv のスクリーニングを行った。その結果、非リン酸化ペプチドには反応しない、14 の scFv クローンを得ることが出来た。

(8)様々な培養条件におけるリン酸化の検出を試みたが、質量分析と scFv のいずれを用いても、Y155 のリン酸化は検出されなかった。

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 2 件)

(1) Keisuke Suzuki, Hiroto Mizushima, Hiroyuki Abe, Ryo Iwamoto, Haruki Nakamura, Eisuke Mekada. Identification of diphtheria toxin R domain mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF. *Journal of Biochemistry* 157 (5): 331-343 (2015) (査読有)

DOI: 10.1093/jb/mvu079

(2) Takuya Murata, Hiroto Mizushima, Ichino Chinen, Hiroki Moribe, Shigeo Yagi, Robert M Hoffman, Tadashi Kimura, Kiyoshi Yoshino, Yutaka Ueda, Takayuki Enomoto, Eisuke Mekada. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. *Cancer Research* 71 (21): 6633-6642 (2011) (査読有)

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0034

[学会発表] (計 5 件)

①村田卓也、水島寛人、且加田英輔 子宮頸癌の癌関連線維芽細胞は子宮頸癌細胞とヌードマウス皮下に共移植することにより癌細胞の皮下リンパ節への転移を誘発する 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜

②水島寛人、且加田英輔 HB-EGF 依存的細胞増殖制御 第65回日本細胞生物学会大会、2014年6月11日~13日、奈良県公会堂、東大寺総合文化センター

③ Hiroto Mizushima, Eisuke Mekada. Sequestration of FAK on microtubules negatively regulates HB-EGF-dependent cell growth. 第65回日本細胞生物学会大

会、2013年6月19日～21日、ウインチあいち（愛知県産業労働センター）

④ Hiroto Mizushima, Eisuke Mekada. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. 第45回日本発生物学会、63回日本細胞生物学会合同大会、2012年5月28日～31日、神戸国際会議場、神戸商工会議所

⑤ Hiroto Mizushima, Eisuke Mekada. Regulation of HB-EGF-dependent cell growth by phosphorylation of FERM domain of FAK. 第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月27～29日、北海道大学クラーク会館、学術交流会館

〔その他〕

ホームページ等

<http://cell-biology.biken.osaka-u.ac.jp/MekadaLabHP/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 寛人 (MIZUSHIMA HIROTO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：30379094

(2) 連携研究者

目加田 英輔 (MEKADA EISUKE)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：20135742