

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25870760
研究課題名(和文) 転移性肺がんにおける ephrin-A1 の機能解析

研究課題名(英文) Role of ephrin-A1 in lung metastasis

研究代表者

家口 勝昭 (Ieguchi, Katsuaki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90586348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)： ephrin-A1 の高発現とがん患者の予後不良と正の相関を示すことが明らかとなってきたがその詳細な分子機構は解明されていない。本研究は予後不良の一因となる転移に焦点をおき ephrin-A1 の機能解析を行った。その結果、原発巣で発現が亢進した ADAM12 が ephrin-A1 を切断することで循環血液中の分泌型 ephrin-A1 濃度を上昇させる。分泌型 ephrin-A1 は肺血管内皮細胞の EphA2 を刺激することで肺血管透過性を亢進させ、肺転移を促進することが考えられる。分泌型 ephrin-A1 に対する中和抗体が顕著に肺転移を抑制したことから分泌型 ephrin-A1 に対する薬剤の開発を目指したい。

研究成果の概要(英文)： It has been reported that overexpression of ephrin-A1 is positively correlated with prognosis in various cancers such as hepatocellular carcinoma. However, the detailed function remains unclear. Therefore, I focused on metastasis that get worse their prognosis in cancer patients and analyzed functions of ephrin-A1 in lung metastasis. I found that ADAM12 identified as a proteinase against ephrin-A1, cleaved ephrin-A1 in primary tumors, and the the serum level is increased. Activated EphA2 by cleaved ephrin-A1 is immediately endocytosed and undergone proteolysis and thereby localization of VE-cadherin at the plasma membrane is lost. As a result of destabilization of EphA2 and VE-cadherin at the plasma membrane in lung vascular endothelial cells leads to hyper-permeability and enhances lung metastasis. A neutralizing antibody against ephrin-A1 is effective for lung metastasis. I would like to develop anti-ephrin-A1 therapeutic drugs.

研究分野：分子生物学

キーワード：転移 Eph ephrin ADAM

1. 研究開始当初の背景

(1) ephrin-A1 は GPI アンカー型の細胞膜に局在する膜タンパク質で、多くのがん細胞において高発現が確認されており、腫瘍の悪性度と強い相関がある一方、ephrin-A1 の受容体である EphA1 および EphA2 は受容体型チロシンキナーゼの 1 つで、細胞内では ephrin-A1 によって活性化され、神経や血管の発生などの生理機能を調節している。また、EphA1 および EphA2 は生理機能の調節だけでなく、腫瘍形成や血管新生においても重要な役割を果たしていることが知られており、抗がん剤開発の有力候補とされ開発がなされている。

(2) これまでの予備実験の結果から以下のことが明らかとなった。Eph/ephrin が肺血管内皮細胞で接着分子として機能すること、Eph/ephrin は肺血管の透過性を調節していること、EphA1 および EphA2 の遺伝子欠損マウスにおいて肺転移が亢進していること、担がんマウスにおいて分泌型 ephrin-A1 の血中濃度が亢進していること、

ADAM12 は細胞膜結型 ephrin-A1 を切断し分泌型 ephrin-A1 を産生すること、分泌型 ephrin-A1 は肺転移を促進すること。EphA1 および EphA2 の遺伝子欠損マウスの解析から、Eph/ephrin が肺において接着分子として機能し、肺血管の透過性を調節していることが考えられるがその詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

進行性の悪性腫瘍患者の約 30%に見られる転移性肺がんは進行が早く、また、5 年生存率が 20-30%と非常に低く予後不良である。そのため、転移前診断の確立と転移の予防はがん患者の予後を改善する最良の近道である。これまでに行われた腫瘍サンプルの病理学的な解析から ephrin-A1 の高発現は腫瘍の悪性度と予後不良に強い相関があることが報告されてきた。しかしながら、治験中のものを含めて ephrin-A1 を標的とした薬剤の開発は成功していない。よって、本研究ではがん細胞の肺転移機構を解明し、将来的に転移を抑制する薬剤の開発につなげることを目的とする。また、肺転移特異的血清マーカーの探索を行い、転移前診断の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ADAM12 による ephrin-A1 の切断機構の解明

N 末端領域に GST タグおよび C 末端領域に FLAG タグで標識した ephrin-A1 を大腸菌で作成、精製し、In vitro で ADAM12 による ephrin-A1 の切断システムを再構築する。切断された FLAG タグを含む断片を質量分析計で測定し ADAM12 による ephrin-A1 の認識配列の特定を行う。さらに、質量分析によって得られた情報を元にして、切断部位のアミノ酸変異体 ephrin-A1 を作成し認識部位

の特定を行う。ephrin-A1 の構造解析の結果より想定される ADAM12 による ephrin-A1 の切断部位は C 末端領域と考えられる。FLAG タグを含む C 末端領域が質量分析の測定限界を超えることも想定される。その場合は GST タグを含む N 末端領域の同位体ラベル法を用いた LC-MS/MS により C 末端からアミノ酸配列を解析し切断部位の特定を行う。

(2) 分泌型 ephrin-A1 の肺転移における機能の解明

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を分泌型 ephrin-A1 で刺激する。血管の透過性が最大となる刺激後 30 分で HUVEC をパラホルムアルデヒドで固定し、EphA 受容体と相互作用することが報告されている接着分子群に着目し、特に VE-cadherin、Claudin-4、FAK、Integrin β 1、 β 3 などの免疫染色を行い、それらの細胞内局在パターンを非刺激細胞と比較し、ephrin-A1 依存性の血管の透過性に関与する分子の同定を行う。細胞膜上の細胞接着構成分子は細胞の脱接着すなわち血管の透過性の亢進によりユビキチン化、リン酸化、分解を受ける。よって、免疫染色での同定が困難な場合は分泌型 ephrin-A1 刺激の存在、非存在下で得られた HUVEC の細胞溶解液を用いてのウェスタンブロットと EphA2 受容体免疫沈降物のウェスタンブロットによる解析を行う。

4. 研究成果

(1) ADAM12 による ephrin-A1 の切断機構の解明

ADAM12 の精製

分泌型 ADAM12 (ADAM12-S) を発現させた CHO 細胞の培養上清から陽イオンカラムおよび Concanavalin A カラムを用いて精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE により純度を確認したが、推定サイズ 260、160、90、70、27kDa の 5 つのバンドが確認され単一のバンドが得られなかった (図 1)。

70kDa 付近のバンドはウェスタンブロットの結果から ADAM12 であることが明らかとなった。それ以外のバンドについては質量分析によりタンパク質の同定を試みた。その結果、260kDa 付近にみられたバンドはフィブロネクチンであり、フィブロネクチンは ADAM12 の基質であることからアッセイには問題ないと考えられる。160kDa および 27kDa 付近のバンドはそれぞれフィブロネクチン結合タンパク質、ADAM12 の N 末端領域であり、いずれも ADAM12 による ephrin-A1 の切断実験には影響を与えないものと考えられる。一方、90kDa 付近に見られたバンドは ADAM12 以外のプロテアーゼであったが活性型ではない未成熟体であるため ephrin-A1 の切断実験には影響を及ぼさないと考えられる。よって、CHO 細胞の培養

上清から精製した ADAM12 を In vitro における ephrin-A1 の切断実験に用いた。

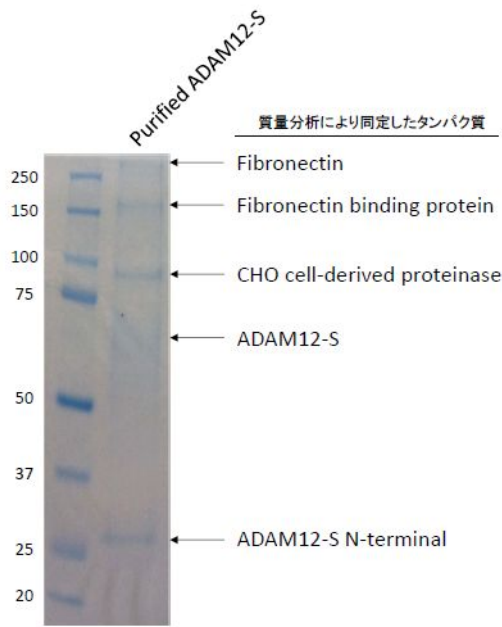
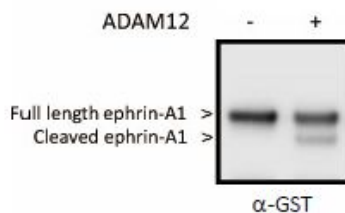


図1 精製したADAM12-SのSDS-PAGE結果

ADAM12 による ephrin-A1 の切断

ADAM12-S を発現させた CHO 細胞の培養上清から精製した ADAM12 を In vitro において ephrin-A1 切断できるかどうかは不明であったため、まずはじめに精製した ADAM12 の酵素活性を検討した。その結果、大腸菌で精製した GST 融合 ephrin-A1 (図 2A) および HEK293 細胞で発現させたアルカリフォスファターゼ標識 ephrin-A1 を切断した。ADAM12 の阻害剤および ADAM12 の酵素活性を欠いた変異体は ephrin-A1 を切断しないことから、ephrin-A1 の切断は ADAM12 依存的な酵素活性によるものと考えられる (図 2B)。

A



B

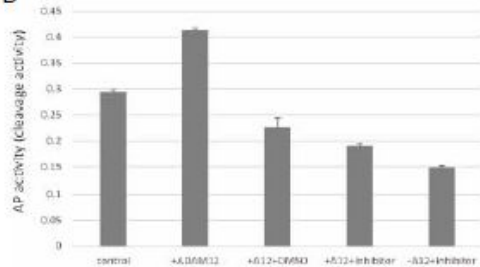


図2 In vitroにおけるADAM12によるephrin-A1の切断

ADAM12 による ephrin-A1 切断部位の決定

N 末端に GST、C 末端に FLAG 標識を付加した ephrin-A1 を ADAM12 により切断し、グルタチオンビーズおよび抗 FLAG 抗体ビーズを用いて切断された ephrin-A1 を N 末端断片と C 末端断片に分けた。C 末端断片を MALDI-TOF/MS によってアミノ酸配列の同定を試みたがサンプルの量が少なかったのか ephrin-A1 特異的な配列データは得られなかった。次に Lys-C エンドペプチダーゼを用いて N 末端断片を消化し、ADAM12 によって切断されたペプチドと区別するために Lys-C で消化されたペプチド断片を ^{18}O で標識し、MALDI-TOF/MS 解析を行った。その結果、ephrin-A1 のグリコシルフォスファチジルイノシトールが付加される領域の付近で ADAM12 特異的に切断されたペプチドが見つかった。切断部位付近のアミノ酸をアラニンに置換した ephrin-A1 の変異体を作成し In vitro の切断実験を行ったところ、ADAM12 による切断が阻害されたことから今回決定したアミノ酸が ADAM12 による ephrin-A1 の切断に重要であることが示唆された。

(2) 分泌型 ephrin-A1 の肺転移における機能の解明

免疫蛍光染色による ephrin-A1 依存性血管透過性亢進の分子機構の解明

HUVEC 細胞を分泌型 ephrin-A1 で 30 分間刺激し、EphA2、ephrin-A1、VE-cadherin の細胞内局在の変化を検討した。その結果、刺激前の HUVEC では EphA2、ephrin-A1、VE-cadherin の 3 者が細胞膜上で共局在しているのに対して、ephrin-A1 刺激後では EphA2 および ephrin-A1 の細胞膜局在はみられず、細胞質内へとエンドサイトーシスされていることが明らかとなった。ephrin-A1 刺激後 30 分では VE-cadherin の細胞内局在は大きく変化していなかったが、特有の敷石状の組織構築が崩れ細胞間隙に穴が多数見られるようになった (図 3)。

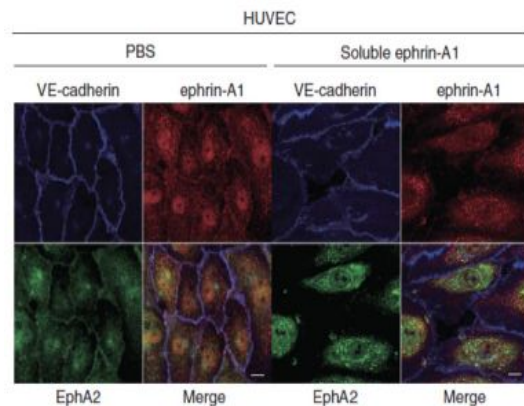


図3 分泌型ephrin-A1刺激によるEphA2、ephrin-A1、VE-cadherinの細胞内局在の変化

EphA2 および ephrin-A1 の細胞膜局在が失

われことにより HUVEC の細胞接着に緩みが生じたことから血管内皮細胞において EphA2、ephrin-A1 の細胞膜局在が細胞接着に重要であることが示唆された。

ウェスタンブロットによる ephrin-A1 依存性血管透過性亢進の分子機構の解明

HUVEC を分泌型 ephrin-A1 で刺激し、経時的な EphA2 および VE-cadherin の量的変化を検討した。その結果、EphA2 は ephrin-A1 刺激後 30 分ですでにコントロールの 30%程度の量となり、ephrin-A1 刺激により EphA2 の分解を誘導していることが明らかとなった。一方、VE-cadherin は EphA2 のように顕著ではないが EphA2 の分解に伴って緩徐に分解され、刺激後 3 時間ではコントロールと比較して量が 20%程度となった(図4)。

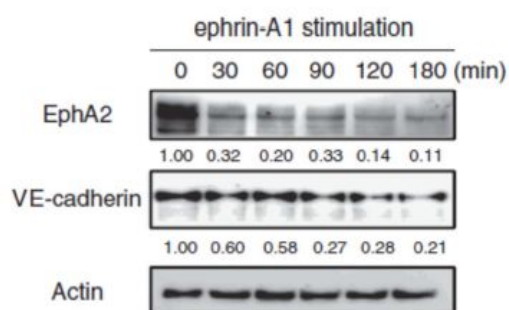


図4 分泌型ephrin-A1刺激によるEphA2とVE-cadherinの経時的量変化

以上の結果から、EphA2 と ephrin-A1 は血管内皮細胞において細胞膜に局在しており VE-cadherin と共に細胞接着を正に著切していることが考えられる。また、分泌型 ephrin-A1 は細胞膜にアンカリングされた ephrin-A1 に対して競合的に作用し、EphA2 のエンドサイトーシスと分解を促進する。細胞膜における EphA2 と細胞膜にアンカリングされた ephrin-A1 の複合体が崩壊することで VE-cadherin が不安定となり分解されることで細胞接着が崩れ、細胞間隙に穴が多数見られ、血管透過性が亢進すると考えられる。

本研究の進捗により分泌型 ephrin-A1 による血管透過性の分子機構および ADAM12 による ephrin-A1 の切断部位が明らかとなった。ADAM12 による ephrin-A1 の認識配列に対するモノクローナル抗体、EphA2 のチロシナーゼ阻害剤の開発によって ADAM12 による ephrin-A1 切断の阻害および分泌型 ephrin-A1 依存性血管透過性の亢進を阻害できることが想定でき肺転移の阻害薬候補となり得る。今後これらの薬剤の開発を目指していく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Ieguchi K. Eph as a target in inflammation, *Endocr Metab Immune*

Disord Drug Targets in press, 査読有, 2015, <http://benthamscience.com/journal/abstracts.php?journalID=emiddt&articleID=129527>

Tomita T, Ieguchi K, Sawamura T, Maru Y. Human serum amyloid A3 (SAA3) protein, expressed as a fusion protein with SAA2, binds the oxidized low density lipoprotein receptor. *PLoS One*. 査読有, 2015, 10(3):e0118835. doi: 10.1371/journal.pone.0118835.

Meabon JS, De Laat R, Ieguchi K, Wiley JC, Hudson MP, Bothwell M. LINGO-1 Protein Interacts with the p75 Neurotrophin Receptor in Intracellular Membrane Compartments. *J Biol Chem*. 2015, 査読有, 290(15):9511-20.

Tomita T, Ieguchi K, Coin F, Kato Y, Kikuchi H, Oshima Y, Kurata S, Maru Y. ZFC3H1, a zinc finger protein, modulates IL-8 transcription by binding with celestramycin A, a potential immune suppressor. *PLoS One*. 2014, 査読有, 9(9):e108957.doi: 10.1371/journal.pone.0108957.

家口勝昭, 丸義朗. がん転移における炎症と血管新生, *血液内科*, 査読なし, 69 巻, 2014, 349-355.

Ieguchi K, Tomita T, Omori T, Komatsu A, Deguchi A, Masuda J, Duffy SL, Coulthard MG, Boyd A, Maru Y. ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. *Oncogene*. 2014, 査読有, 33(17):2179-90.

Ieguchi K, Omori T, Komatsu A, Tomita T, Deguchi A, Maru Y. Ephrin-A1 expression induced by S100A8 is mediated by the toll-like receptor 4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013, 査読有, 440(4):623-9.

Fujita M, Ieguchi K, Takada Y. An integrin binding-defective mutant of insulin-like growth factor-1 (R36E/R37E IGF1) acts as a dominant-negative antagonist of the IGF1 receptor (IGF1R) and suppresses tumorigenesis but still binds to IGF1R. *J Biol Chem*. 2013, 査読有, 288(27):19593-603.

[学会発表](計4件)

Ieguchi K, Maru Y. Role of the sympathetic nervous system in lung metastasis. 2nd International symposium

2015 “Neuro-Vascular Wiring”, 2015 年 1 月
18 日, 関西セミナーハウス(京都府・京都市)

Ieguchi K, Tomita T, Maru Y. Breakdown
of the Eph/ephrin system in vascular
endothelial cells causes lung metastasis.
The International Vascular Biology
Meeting, 2014 年 4 月 16 日, 京都市観業会館
みやこめっせ (京都府・京都市)

家口勝昭, 丸義朗, 血管内皮細胞における
Eph/ephrin システムの機能とその破綻によ
る肺転移, 第 4 回グローバル COE 公開シン
ポジウム, 2014 年 1 月 11 日, 東京女子医科大
学, (東京都・新宿区)

Ieguchi K, Tomita T, Maru
Y. ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes
to lung metastasis. 第 72 回日本癌学会学術
総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜,
(神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.twmu.ac.jp/Basic/yakuri/index.
html](http://www.twmu.ac.jp/Basic/yakuri/index.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

家口 勝昭 (Ieguchi, Katsuaki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90586348