

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462125

研究課題名(和文) 肺癌におけるErbBfamily受容体からのEMT活性化シグナル標的分子の同定

研究課題名(英文) The identification of targeting molecules for EMT-activating signals from ErbB family receptor in lung cancer

研究代表者

毛受 暁史 (MENJU, Toshi)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：30527081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：活性化EGFRとGEP100結合によるArf6経路の活性化をさらに亢進する機序の解明を行った。Grb2過剰発現により、EGFRとGEP100の結合が増強、その下流であるArf6活性化がみられた。これにより、実際に肺癌細胞株において、EMT活性化(E-cadherin発現減少)やin vitro浸潤能の亢進が示された。EGFRと結合しない変異型Grb2では、Arf6経路の活性化は増強しなかった。EGFRとGrb2の結合が癌の浸潤能に重要であり、浸潤能の抑制に、EGFR-Grb2、Grb2-GEP100、EGFR-GEP100結合部位の阻害が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We revealed the enhancing mechanisms of Arf6 pathway via the binding between activated EGFR and GEP100. Grb2 overexpression induces the promotion of the binding of these molecules and its downstream molecule, Arf6 invasion pathway, leading the activation of EMT and in vitro invasive activity in lung cancer cells. Furthermore, mutant Grb2 overexpression which does not bind EGFR did not show the enhancement of Arf6 pathway. These results possibly showed the inhibition of the binding among these molecular complex is the promising targets to suppress the invasive activity in lung cancer cells

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 EMT 浸潤転移 Arf6 GEP100 EGFR Grb2

1. 研究開始当初の背景

ErbB family に属する EGFR および Her2 は、その異常活性化により、様々な癌種において予後不良となることは臨床的によく知られている。

我々は、佐邊らと共に ErbB family 受容体からの刺激が、Arf6 活性化を介して、invadopodia 形成を促進し、その結果、乳癌や肺癌の浸潤転移能獲得へと向かうメカニズムが、浸潤転移抑制の新たな標的となる妥当性を報告してきた。その中で、Arf6 活性化 GTP 交換因子 (GEF) である GEP100 が EGFR や Her2 の細胞内ドメインの特定の自己リン酸化チロシンと結合することで、浸潤転移能獲得に特異的な Arf6 活性化を促進することを見出した。 さらに、

ErbB family に属する EGFR および Her2 は、肺癌や乳癌を含む様々な癌種において、その異常活性化により、遠隔転移を促進し、予後不良となることは臨床的によく知られている。

ErbB family 受容体からの刺激が、癌の浸潤転移能獲得の際に起こる上皮間葉転換 (Epithelio-Mesenchymal Transition、EMT) の中で、Arf6 活性化 GTP 交換因子 (GEF) である GEP100 や Arf6 活性化を介して、invadopodia 形成を促進し、その結果、乳癌や肺癌が浸潤転移能獲得へと向かうメカニズムが、浸潤転移抑制の新たな標的となる妥当性がこれまでに報告されてきた。

その後の研究で、GEP100 単独の発現量の多寡が、肺癌の予後予測因子としても重要であることを見出している。そして、この GEP100 から Arf6 活性化を介した腫瘍細胞浸潤能亢進のメカニズムは、他の癌種においても報告されており (Hu et al, PLoS One 2012) (Xie et al, PLoS One 2012)、腫瘍浸潤および転移のメカニズムとして重要かつ普遍的である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究は、EGF 刺激に応じて GEP100-Arf6(ADP-ribosylation factor6)経路を活性化する詳細なメカニズムや EGFR と GEP100

との結合を促進する細胞内分子・微小環境因子を見出すこと、構成分子による EGFR と GEP100 結合促進の詳細なメカニズムの解明、それらの分子・因子が肺癌の浸潤転移能に与える影響の臨床的意義を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1)GEP100 と ErbB family、特に EGFR との結合を補助する分子候補の網羅的探索 (H26 年度)
- (2)Grb2 や膜リン脂質や腫瘍細胞微小環境の EGFR と GEP100 結合に及ぼす影響の解析 (H26 年度)
- (3)蛋白複合体構成分子の肺癌臨床検体における発現量とその臨床的重要性を検討 (H26 年度)
- (4)結合能変化による in vitro もしくは in vivo 浸潤転移能の変化解析 (H27,28 年度)
- (5)補助的な分子も含めた EGFR と GEP100 蛋白複合体の構造解析 (H27,28 年度)

4. 研究成果

GF 刺激による GEP100-Arf6 活性化を介した癌の浸潤転移能促進経路の詳細なメカニズムを解明する上で、重要な構成分子メカニズムの発見を目標に以下の成果を得ることができた。

活性化 EGFR と GEP100 が結合することによる Arf6 経路の活性化が癌の浸潤転移能の亢進経路であることを受けて、さらにこの経路の活性化が亢進する機序の解明をすすめた。GEP100 の PH ドメインが結合する、活性化 EGFR の C 末端付近のリン酸化チロシン部位に結合することが知られている分子を発現させたところ、Grb2 アダプター分子過剰発現により、EGFR と GEP100 の結合が増強、その下流である Arf6 活性化がみられた。この経路の活性化により、肺癌細胞株において、EMT 活性化 (E-cadherin 発現減少) や in vitro 浸潤能の亢進が示された。

再構成系による結合部位の同定を行い、免疫沈降実験により、GEP100 の PH ドメインおよび Grb2 の SH2 ドメイン、SH3N ドメインが両分子の

結合部位であることが判明した。

さらに変異型 Grb2-R86K を作成、発現させたところ、変異 Grb2 は活性化 EGFR との結合能が消失した。この変異型 Grb2 を肺癌細胞株に過剰発現させたところ、活性化 EGFR と GEP100 との結合および Arf6 活性化が抑制され、EGFR と Grb2 との結合能が GEP100-Arf6 経路の活性化に重要な役割を果たすことが示され、本経路の抑制には、EGFR-Grb2、Grb2-GEP100、EGFR-GEP100 結合部位の阻害が有用である可能性が示唆された。

また、これらの分子の臨床的意義を確認するため、我々の施設で外科的切除を行った肺腺癌 239 例について、TissueMicroArray を作成し、免疫染色を行い、その発現強度に応じたグループ分類を行ったところリン酸化 EGFR 発現例においては、Grb2、GEP100 の共発現群では、有意に E-cadherin 減少、Vimentin 増加がみられ、またリンパ節転移頻度の増加や無再発生存期間の短縮がみられた。

SILAC 法を用いた mass spectromy による解析を行った。A549、MDA-MB-231 細胞を安定同位体アミノ酸を含むもしくは含まない培養液で 2 週間培養し、EGF 刺激を行ったものとスターブしたものを別々に細胞溶解液とし、混合して抗 GEP100 抗体で免疫沈降を行った。EGF 刺激に応じた GEP100 結合分子のみがより特異的に検出されると考えた。複数回の解析を行った結果、全てで検出された分子が Hsp90beta と ABCF1 transporter であった。Hsp90beta は、再構成系による免疫沈降実験で GEP100 の PH ドメインと結合する可能性が高いことが分かった。

これらの結合による影響や細胞内環境による結合能の変化については、今後の検討課題である。

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 17 件)

1: Neri S, Miyashita T, Hashimoto H, Suda Y, Ishibashi M, Kii H, Watanabe H, Kuwata T, Tsuboi M, Goto K, Menju T, Sonobe M, Date H, Ochiai A, Ishii G.

Cancer Lett. 2017 Jun 1;395:20-30. doi: 10.1016/j.canlet.2017.02.026.

2: Miyoshi R, Menju T, Yoshizawa A, Date H. Pathol Int. 2017 Jun;67(6):306-310. doi: 10.1111/pin.12531.

3: Cho H, Matsumoto S, Fujita Y, Kuroda A, Menju T, Sonobe M, Kondo N, Torii I, Nakano T, Lara PN, Gandara DR, Date H, Hasegawa S. J Thorac Oncol. 2017 Mar;12(3):477-490. doi: 10.1016/j.jtho.2016.10.023. PubMed PMID: 27867002.

4: Muranishi Y, Sonobe M, Menju T, Aoyama A, Chen-Yoshikawa TF, Sato T, Date H. Surg Today. 2017 Feb;47(2):252-258. doi: 10.1007/s00595-016-1380-y. PubMed PMID: 27382978.

5: Sowa T, Menju T, Chen-Yoshikawa TF, Takahashi K, Nishikawa S, Nakanishi T, Shikuma K, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Sato T, Sonobe M, Harada H, Date H. Cancer Med. 2017 Jan;6(1):288-297. doi: 10.1002/cam4.991. PubMed PMID: 28028936; PubMed Central PMCID: PMC5269694.

6: Fujimoto M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Menju T, Hirata M, Momose M, Date H, Haga H. Histopathology. 2017 Jan;70(2):232-241. doi: 10.1111/his.13048.

Epub 2016 Sep 27. PubMed PMID: 27467545.

7: Rokutan-Kurata M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Menju T, Momose M, Koyama M, Shigeto S, Fujimoto M, Zhang M, Morita S, Date H, Haga H. Lung

Clin Lung Cancer. 2016 Dec 2. pii: S1525-7304(16)30367-9. doi:

10.1016/j.clcc.2016.11.013. PubMed PMID: 28065467.

8: Tanaka S, Chen-Yoshikawa TF, Kajiwara M, Menju T, Ohata K, Takahashi M, Kondo T, Hijiya K, Motoyama H, Aoyama A, Masuda S, Date H. Ann Thorac Surg. 2016

Nov;102(5):1717-1724. doi:

10.1016/j.athoracsur.2016.05.037. PubMed PMID: 27460916.

9: Hamaji M, Chen F, Miyamoto E, Kondo T, Ohata K, Motoyama H, Hijiya K, Menju T, Aoyama A, Sato T, Sonobe M, Date H. S

Surg Today. 2016 Nov;46(11):1296-300. doi: 10.1007/s00595-016-1312-x. PubMed PMID: 26892332.

10: Shikuma K, Menju T, Chen F, Kubo T, Muro S, Sumiyoshi S, Ohata K, Sowa T,

Nakanishi T, Cho H, Neri S, Aoyama A, Sato T, Sonobe M, Date H. Interact Cardiovasc Thorac

Surg. 2016 Jun;22(6):831-8. doi:

10.1093/icvts/ivw037. PubMed PMID: 26920725; PubMed Central PMCID: PMC4986781.

11: Sowa T, Menju T, Sonobe M, Nakanishi T, Shikuma K, Imamura N, Motoyama H,

Hijiya K, Aoyama A, Chen F, Sato T, Kobayashi M, Yoshizawa A, Haga H, Sozu T,

Date H. Cancer Med. 2015 Dec;4(12):1853-62.

doi: 10.1002/cam4.556. PubMed

PMID:26471868; PubMed Central PMCID: PMC5123719.

12: Yokoyama Y, Sonobe M, Yamada T, Sato M, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F,

Omasa M, Date H. Int J Clin Oncol. 2015 Dec;20(6):1122-9.

doi:10.1007/s10147-015-0838-z. PubMed PMID: 25953679.

13: Ando T, Omasa M, Kondo T, Yamada T, Sato M, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen

F, Sonobe M, Date H. Eur J Cardiothorac Surg. 2015Nov;48(5):705-9; discussion 709. doi:

10.1093/ejcts/ezu530. PubMed PMID: 25618314.

14: Sato M, Yamada T, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, Date

H. Eur J Cardiothorac Surg. 2015 Apr;47(4):e131-9. doi:

10.1093/ejcts/ezu490. PubMed PMID: 25539649.

15: Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota

K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya

H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. Nat Commun. 2015 Jan 23;6:6153.

doi: 10.1038/ncomms7153. PubMed PMID: 25615526; PubMed Central PMCID: PMC4317501.

16: Lin SH, Wang J, Saintigny P, Wu CC, Giri U, Zhang J, Menju T, Diao L, Byers L, Weinstein

JN, Coombes KR, Girard L, Komaki R, Wistuba II, Date H, Minna JD,

Heymach JV. BMC Genomics. 2014

Dec 8;15:1079. doi:
10.1186/1471-2164-15-1079. PubMed PMID:
25486910; PubMed Central PMCID:
PMC4298954.

17: Sonobe M, Yamada T, Sato M, Menju T,
Aoyama A, Sato T, Chen F, Omasa M, Bando
T, Date H. Ann Surg Oncol.2014
Aug;21(8):2546-54. doi:
10.1245/s10434-014-3630-9. PubMed PMID:
24633668.

[学会発表] (計 3 件)

・国際学会

発表者:毛受 暁史

発表表題:GEP100-Arf6 pathway enhanced by
Grb2 expression plays important roles for
node-metastasis of lung cancer

学会:アメリカ癌学会

発表年月日:2016年4月18日

場所:アメリカ、ニューオーリンズ

発表者:毛受 暁史

発表表題:GEP100-Arf6 pathway enhanced by
Grb2 expression plays important roles for
node-metastasis and EMT activation of lung
cancer

学会:ヨーロッパ癌学会

発表年月日:2016年7月11日

場所:イギリス、マンチェスター

・国内学会

発表者:毛受 暁史

発表表題:GEP100-Arf6 経路における Grb2 ア
ダプター分子の意義

学会:第33回呼吸器外科学会総会

発表年月日:2016年5月13日

場所:日本、京都市

6. 研究組織

(1)研究代表者

毛受 暁史(MENJU, Toshi)

京都大学・医学研究科・呼吸器外科・助教

研究者番号:30527081

(2)研究分担者

伊達 洋至(DATE, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・呼吸器外科・教授

研究者番号:60252962

園部 誠(SONOBE, Makoto)

京都大学・医学研究科・呼吸器外科・准教授

研究者番号:00432378

(3)連携研究者

(4)研究協力者

佐邊 壽孝(SABE, Hisataka)

北海道大学大学院・医学研究科・分子生物学

教室・教授