

平成 31 年 3 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860190

研究課題名(和文) ネクチン様分子によるErbBファミリーシグナルの制御機構

研究課題名(英文) Regulation by Nectin-like molecules of ErbB family receptor signaling

研究代表者

水谷 清人 (Mizutani, Kiyohito)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50559177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：種々の細胞膜受容体は、リガンドが結合することでホモあるいはヘテロ二量体を形成し、その結果受容体の細胞内領域でのチロシンリン酸化反応が促進される。チロシンリン酸化された受容体の細胞内領域はSH2ドメインを有するアダプタータンパク質やシグナル伝達分子と結合し、細胞内にシグナルを伝達する。しかし、これらの受容体に結合して活性を制御する分子とその制御機構については不明な点が多い。本研究において(1) Nectin-4によるErbB3の活性制御機構と、(2)ネクチンによるプロラクチン受容体の活性制御機構とその生理的意義を解明した。

研究成果の概要(英文)：Cell surface transmembrane receptors form homo- or hetero-dimer upon binding of their ligands, resulting in an enhanced activation of their tyrosine phosphorylation activity. Cytoplasmic region of the tyrosine-phosphorylated receptor further binds to SH2 domain containing adaptor proteins or signaling molecules, and transduce their signals. However, regulatory molecules that bind cell surface receptor and its regulatory mechanisms still remain elusive. In this study, we found that (1) Nectin-4 interacts with ErbB3 and regulates its downstream signaling and (2) nectin-1 and nectin-4 interact with the prolactin receptor and regulates prolactin receptor signaling for mammary gland development.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達 ErbB ネクチン様分子 Nectin

## 1. 研究開始当初の背景

種々の細胞膜受容体の中で、上皮成長因子 (EGF) の受容体の活性制御機構が 1987 年に米国の Schlessinger によって最初に解明された。EGF 受容体は ErbB1、-2、-3、-4 の 4 つのメンバーからなるファミリーを形成しており、正常組織では組織の形成や維持を制御しており、がん細胞では増殖や浸潤・転移に関与している。ErbB3 以外のすべてのメンバーはその細胞内領域にチロシンリン酸化酵素活性を有している。EGF やヘレグリン (HRG) などのリガンドが細胞膜受容体に結合すると、受容体はホモあるいはヘテロ二量体を形成し、その結果受容体の細胞内領域でのチロシンリン酸化反応が促進される。チロシンリン酸化された受容体の細胞内領域は SH2 ドメインを有するアダプタータンパク質やシグナル伝達分子と結合し、細胞内にシグナルを伝達する。ErbB ファミリー以外の細胞膜受容体の中でも、細胞膜を一回貫通している受容体は基本的には同じ様式で活性化されて、シグナルを細胞内に伝達する。しかし、これらの受容体に結合して活性を制御する分子とその制御機構については不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

ネクチンおよびネクチン様分子 (Nec1) はファミリーを形成しており、本研究ではネクチンや Nec1 に結合する受容体の同定と、結合による活性制御機構、および、正常細胞やがん化した細胞での生理的機能の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) Nec1-4 による ErbB ファミリー活性制御機構

研究代表者らは、ErbB3 と結合しその活性を制御する分子として Nec1-4 を同定した。Nec1-4 はヒトがん細胞では発現が低下していることが多く、がん抑制因子として機能していることが知られていたが、その作用機構は不明であった。そこで、Nec1-4 に存在するどのドメインががん抑制因子としての機能に重要であるかを検討した。

### (2) ネクチンによるプロラクチン受容体活性制御機構と生理的意義

研究代表者の所属する研究室で見出された細胞間接着分子ネクチンは 4 つのメンバーからなるファミリーを形成しており、細胞間接着分子として機能するだけでなく、細胞膜

受容体やインテグリンと相互作用することでその活性を制御し、細胞の極性形成、生存、増殖、運動、分化を制御している。ネクチン-1 遺伝子を欠損した雌マウスは、出産後の育児能に障害があり、生まれた仔マウスは生後 1 日以内に死亡する。その原因と詳細な分子機構を検討した。

## 4. 研究成果

(1) Nec1-4 による ErbB ファミリー活性制御機構  
ErbB ファミリーの過剰シグナルはがんの発症・進展に関与しており、ErbB2 の過剰シグナルを阻害する抗体はヒト乳がんなどの抗がん剤として使用されている。最近では、ErbB2 以外の ErbB ファミリーメンバーも抗がん剤の重要な標的として注目されている。

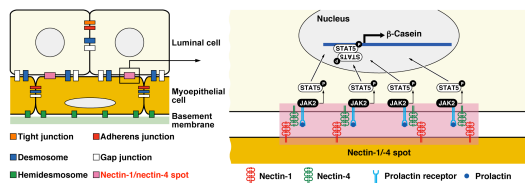
Nec1-4 に存在するどのドメインががん抑制因子としての機能に重要なかを検討を行ったところ、下流シグナリングの抑制に Nec1-4 の細胞外領域の 3 番目の免疫グロブリン様ドメイン (Ig3 ドメイン) が関与することを明らかにした。さらにその詳細な解析を行い、Ig3 ドメインによってリガンド刺激依存的ながん細胞の運動が抑制されることを明らかにした。さらに、Nec1-4 の Ig3 ドメインが作用する ErbB3 側のドメインの同定を行い、ErbB3 のドメイン III に Nec1-4 の Ig3 ドメインが結合することで、その抑制機能が発揮されることを明らかにした。

### (2) ネクチンによるプロラクチン受容体活性制御機構と生理的意義

生体を構成する上皮組織では、同種あるいは異種の上皮細胞同士が一層のシート状構造になっていて、これらの細胞は様々な細胞間接着装置によって接着していることが分かっている。これらの接着装置を構成する分子としてネクチンなどがあり、上皮組織の形成と維持の機構は分子レベルでかなり理解されている。一方、乳腺などの外分泌腺の上皮組織では、一層のシート状の管腔上皮細胞とそれらを取り囲む筋上皮細胞の二層構造になっていて、このような二層上皮組織の形成と維持の分子機構は十分に理解されていなかった。また、二層上皮組織の発達過程における細胞間接着装置の機能や、ホルモンや増殖因子によるシグナル伝達の制御機構はほとんど分かっていなかった。

ネクチン-1 遺伝子を欠損したマウスの妊娠時乳腺の発達を解析したところ、乳葉の発達と乳汁の産生が障害されていた。この障害によって、ネクチン-1 遺伝子欠損マウスか

らは十分量の乳が出ず、仔マウスが死亡することが分かった。さらに、乳腺上皮細胞に発現しているネクチン-4が、妊娠時乳腺の発達に重要なホルモンであるプロラクチンの受容体と結合して、そのシグナル伝達を制御していることを解明した。プロラクチン受容体は、プロラクチン刺激に応じてタンパク質リン酸化酵素 JAK2 によってリン酸化され、STAT5 と結合する。プロラクチン受容体に結合した STAT5 は JAK2 によってリン酸化され、リン酸化された STAT5 は二量体を形成して核内に移行する。核内に移行した STAT5 は転写因子として機能し、 $\beta$ カゼイン遺伝子などの転写を促進する。野生型マウスの妊娠時乳腺では、乳腺上皮細胞と筋上皮細胞との接着部位にネクチン-1 とネクチン-4 が局在しており、妊娠時の乳腺においてはこの接着装置がプロラクチンのシグナル伝達の間を提供していると考えられた (図)。したがって、ネクチン-1 遺伝子欠損マウスではこのシグナル伝達の間が形成されないため、乳腺の発達障害が認められると考えられた。



図：乳腺におけるネクチン依存性の接着装置による細胞内シグナル制御機構

## 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 6 件)

1. Mizutani, K. and Takai, Y. Nectin spot: a novel type of nectin-mediated cell adhesion apparatus. *Biochem. J.*, in press. 査読有り
2. Kitayama, M., Mizutani, K., Maruoka, M., Mandai, K., Sakakibara, S., Ueda, Y., Shimono, Y., Komori, T., and Takai, Y. A novel nectin-mediated cell adhesion apparatus that is implicated in prolactin receptor signaling for mammary gland development. *J. Biol. Chem.*, 291: 5817-5831 (2016), 査読有り, DOI: 10.1074/kbc.M115.685917

3. Nobutani, K., Shimono, Y., Mizutani, K., Ueda, Y., Suzuki, T., Kitayama, M., Minami, A., Momose, K., Miyawaki, K., Akashi, K., Azuma, T., and Takai, Y. Downregulation of CXCR4 in metastasized breast cancer cells and implication in their dormancy. *PLoS One*, 10: e0130032 (2015), 査読有り, DOI: 10.1371/journal.pone.0130032
4. Yamana, S., Tokiyama, A., Mizutani, K., Hirata, K., Takai, Y., and Rikitake, Y. The cell adhesion molecule Nectin-4/CADM4 serves as a novel regulator for contact inhibition of cell movement and proliferation. *PLoS One*, 10: e0124259 (2015), 査読有り, DOI: 10.1371/journal.pone.0124259
5. Tanaka-Okamoto, M., Itoh, Y., Miyoshi, J., Mizoguchi, A., Mizutani, K., Takai, Y., and Inoue, M. Genetic ablation of afadin causes mislocalization and deformation of Paneth cells in the mouse small intestinal epithelium. *PLoS One*, 9: e110549 (2015), 査読有り, DOI: 10.1371/journal.pone.0110549
6. Suzuki, T., Mizutani, K., Minami, A., Nobutani, K., Kurita, S., Nagino, M., Shimono, Y., and Takai, Y. Suppression of the TGF- $\beta$ 1-induced protein expression of SNAI1 and N-cadherin by miR-199a. *Genes Cells*, 19: 667-675 (2014), 査読有り, DOI: 10.1111/gtc.12166

[学会発表] (計 4 件)

1. 圓岡真宏, 北山美登里, 水谷清人, 高井義美 乳腺分化を制御する新規のネクチン依存性細胞間接着装置 (第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015.12.1、神戸ポートアイランド (兵庫県))
2. 上田悠貴, 信谷健太郎, 下野洋平, 水谷清人, 鈴木俊裕, 北山美登里, 南晶洋, 百瀬健次, 宮脇恒太, 赤司浩一, 東健, 高井義美 転移乳がん細胞における CXCR4 の発現低下とがん休眠との関連 (第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.9、名古屋国際会議場 (愛知県))

3. Mizutani, K., Nobutani, K., Ueda, Y., Shimono, Y., and Takai, Y. Regulation by CXCR4 of competition between active and dormant states of breast cancer cell. (1st International Symposium on Cell Competition, 2015.9.10, Shiran Kaikan (京都府))
4. 鈴木俊裕, 水谷清人, 南晶洋, 信谷健太郎, 棚野正人, 下野洋平, 高井義美 マイクロRNA-199a は TGFβ1 で誘導される SNAI1 と N-cadherin の発現を抑制する (第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.25、パシフィコ横浜 (神奈川県))

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ErbB3 活性化に伴うシグナルの伝達抑制物質及びそのスクリーニング方法

発明者: 高井義美、水谷清人、慶田城迅

権利者: 神戸大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-96427 号

出願年月日: 平成 28 年 5 月 12 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

神戸大学大学院 医学研究科

生化学・分子生物学講座シグナル統合学分野  
病態シグナル学部門

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/ps/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 清人 (MIZUTANI, Kiyohito)

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号: 50559177