

学位論文 博士（理学）

ヒトがん細胞の血管擬態における
細胞表面受容体の役割解析

2021 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

川 原 遼 太

目次

第1章 序論	1
第1節 がんの発生とがん遺伝子	1
第2節 腫瘍血管と悪性化	2
第3節 血管擬態	4
第4節 Integrin β 1	7
第5節 ErbB4	11
第6節 本研究の目的	14
第2章 Integrin β 1 が血管擬態形成に与える影響の解析	15
第1節 血管擬態形成における integrin の関与	15
第2節 Integrin β 1 ノックアウトによる血管擬態形成への影響	17
第3節 Integrin β 1 の再発現による血管擬態形成への影響	26
第4節 Integrin β 1-FAK シグナルの評価	28
第5節 中和抗体およびペプチド処理による血管擬態形成の阻害効果	31
第6節 まとめ	34
第2章の実験方法	35
第3章 ErbB4 がヒト乳がん細胞の血管擬態形成に与える影響の解析	39
第1節 ヒト乳がん細胞株における ErbB4 発現量と血管擬態形成能	39
第2節 ErbB4 の発現と血管擬態形成	42
第3節 ErbB4 と細胞内シグナル伝達	48
第4節 ホルモン受容体と血管擬態形成	53
第5節 Neuregulin 1 による ErbB4 の活性化と血管擬態形成	57
第6節 Afatinib 処理と血管擬態形成	77
第7節 ErbB4 変異とがん細胞の腫瘍形成能	83
第8節 まとめ	86
第3章の実験方法	88

第4章 総括	92
参考文献.....	100

第1章 序論

第1節 がんの発生とがん遺伝子

生体を構成する細胞は通常、各組織の部位や機能、状況に応じて自身の増殖を調節している。このような「正常」細胞の DNA が損傷し、遺伝子に異常が生じることで細胞はがん化する。生体内においてがん化した異常な細胞は頻繁に生じているが、それらの多くは免疫反応やアポトーシスにより除去される。しかし、これらの生体防御機構により排除されない異常な細胞が体内に残り、徐々に遺伝子の変異が蓄積することで、悪性度の高い「がん」細胞になる。がん細胞は増殖能や転移能が高く、無秩序に拡大していくことで正常な組織の機能を損なわせる。

Rous は 1911 年、ニワトリに腫瘍を形成させるウイルスを発見した[1]。また、山極らはウサギの耳にコールタールを塗り続けることで人工的にがんを作り出した[2,3]。このように、がん研究の黎明期はウイルスや化学物質などが発がんの原因として認識されていたが、1960 年代から 1970 年代にかけて正常な細胞の中に発がんの原因となる遺伝子が存在することが明らかとなった。それを皮切りにがん研究は目覚ましい発展を遂げ、1980 年代以降、数多の成長因子受容体やチロシンキナーゼなどのがん遺伝子が見つかってきた。それらの研究により、細胞増殖に関わる遺伝子の異常活性化や、p53 のようながん抑制遺伝子の機能欠失[4]が発がんの主な原因であると理解されてきたが、がんの研究はそれだけに留まっていない。例えば、がん細胞が **programmed death ligand-1 (PD-L1)** の発現を介して免疫細胞による認識を回避することや、腫瘍組織周辺でがん関連線維芽細胞やマクロファージ、血管などで構成される微小環境が形成されることは、近年ようやく明らかになった[5,6]。すなわち、冒頭の発がん機構の理解は不完全であり、がんの全容理解にはまだ時間を要すると考えられる。

近年のがん研究では、RNA シーケンスやプロテオミクスを用いた網羅的な発現解析により、腫瘍ごとのプロファイルを調べるのが主流となっている。この方法により、遺伝子発現の特徴を捉えることは容易になったが、一つのタンパク質が複数の機能を持つことは珍しくなく、がん遺伝子の発現を評価するだけでは不十分である。そのため、腫瘍が持つ特徴を理解し、そこに各遺伝子がどのように関与するかを詳細に調べていくことは、これからのがん研究においても必要である。

第2節 腫瘍血管と悪性化

がん細胞は増殖を繰り返して成長する際、酸素や栄養分が供給される経路の存在が必要不可欠である。血管新生はその主たる酸素/栄養供給メカニズムとなっており、正常組織では見られない異常な血管形成が腫瘍組織において見られることがある。Figure 1-1A は、ヒト腫瘍を移植したマウスの腫瘍組織を走査型電子顕微鏡により撮影した像である[7]。腫瘍組織周辺では血管が枝分かれを繰り返し、全体に満遍なく血管を張り巡らせている。このように、正常組織では見られない異常な血管形成はがんの悪性化を促す原因の一つであり、予後不良を指し示す現象として認識されている。

血管新生の機構は、低酸素誘導因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1: HIF-1 α) を中心とした低酸素応答によって説明される (Figure 1-1B)。がん細胞は増殖に伴って多くの酸素を消費するため、腫瘍周辺は局所的な低酸素圧状態に陥る。HIF-1 α は通常の酸素圧条件下では不安定であり、ユビキチン-プロテアソーム系により合成後直ちに分解される[8]。しかし、低酸素圧状態では分解されずに安定化し、HIF-1 β とヘテロ二量体を形成した後に核内で転写因子として働く[9]。HIF-1 複合体は、エリスロポエチンや血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor: PDGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) 等の遺伝子の転写を誘導する[10-13]。これらの遺伝子は、赤血球の産生や血管内皮細胞の増殖を促進させることが知られている。また、HIF-1 α は matrix metalloproteinases (MMPs) の発現増加とも相関があることが報告されている[14]。MMPs は、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) を分解する活性を持つため、増殖した血管内皮細胞が腫瘍へと伸長するのを促進させると考えられる。これら HIF-1 α が調節する因子ががん細胞から分泌され、腫瘍血管新生が行われるのである。これらの低酸素環境における細胞の適応や HIF 活性化メカニズムの発見は、2019年のノーベル医学・生理学賞の対象となっており、生物学的に非常に重要な機構であるといえる。

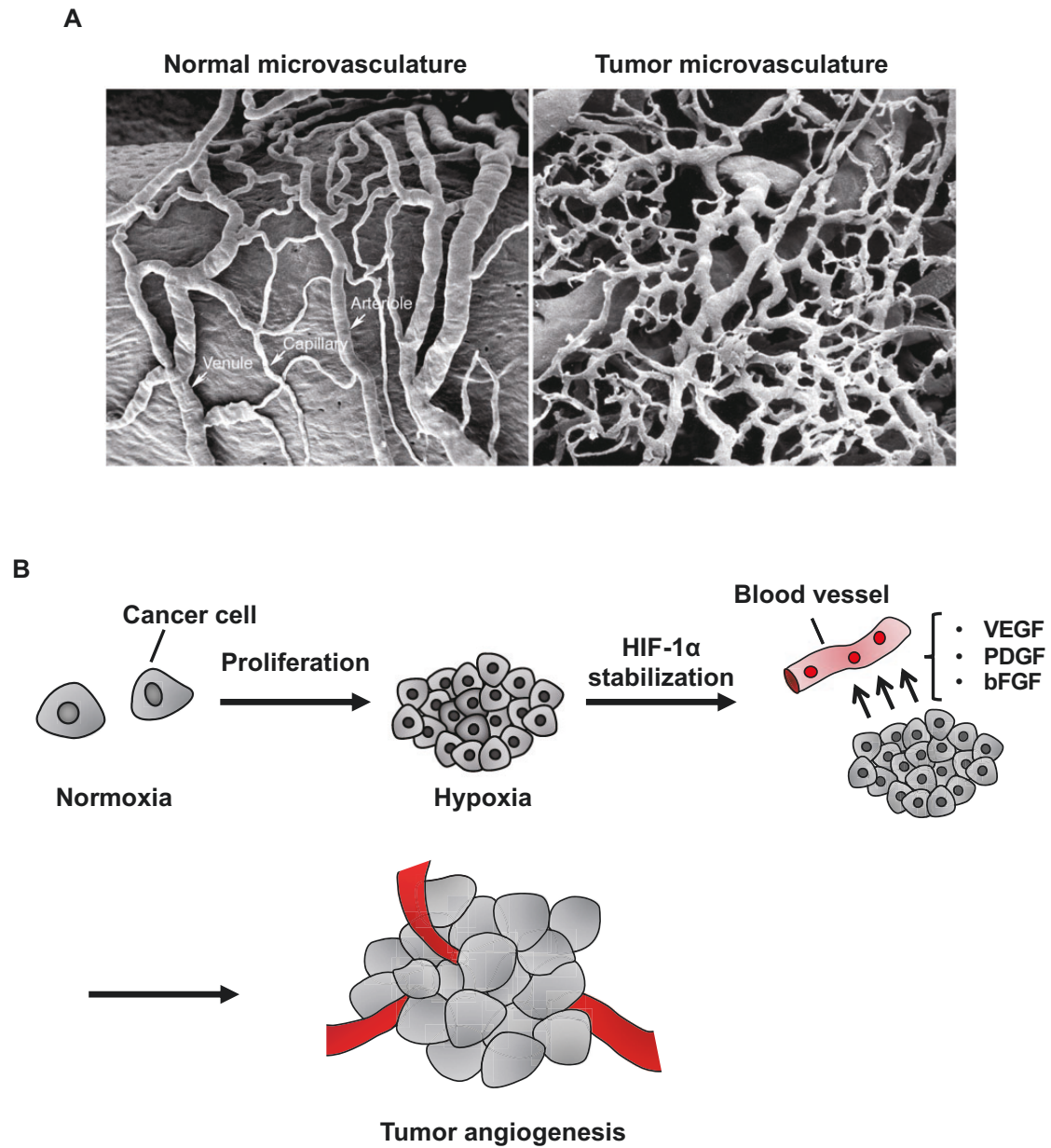


Figure 1-1. Tumor growth and angiogenesis.

(A) Scanning electron microscopic (SEM) imaging of normal microvasculature (left) and tumor microvasculature (right) [7]. White arrows indicate arteriole, capillary, and venule, respectively. (B) The mechanism of tumor growth through HIF-1 α -mediated angiogenesis.

第3節 血管擬態

腫瘍成長を助ける血管新生はがんの有効な標的とされ、実際に血管新生を阻害する薬剤ががん治療に用いられてきた。しかし、その治療効果は充分ではなく、がんの進行を止められないケースも報告された[15]。そのため、がんは血管新生とは異なる血液供給経路を有することが示唆されていた。血管擬態 (vasculogenic mimicry: VM) は、ECM に富んだ腫瘍組織中でがん細胞が血管様の構造を形成する現象であり、1999 年に Maniotis らにより初めて報告された[16]。Figure 1-2A に示すように、腫瘍組織内部にがん細胞から作られた管腔構造が生じ、腫瘍に届けられた血液がその疑似血管内を流れることで酸素や栄養分が効率的に供給される。そのため VM は、がんの成長戦略の一つであるとされている。

実際のヒトのがん組織において、VM は periodic acid-Schiff (PAS) 染色が陽性で、かつ内皮細胞マーカー (CD31 もしくは CD34) が陰性の管腔構造として検出される[16]。すなわち、VM では血管内皮細胞に依存せずがん細胞が腫瘍内管腔構造を作る。血管新生においては、PAS 染色陽性かつ内皮細胞マーカー陽性であることから、VM は血管新生とは明確に異なる現象として区別されている。また、VM を起こすがん細胞は、ECM 成分を豊富に含むマトリゲル上に播種し、一定時間培養すると細胞がマトリゲル中を移動して特徴的な血管様ネットワーク構造を形成する (Figure 1-2B)。マトリゲル中の ECM 成分やがん細胞の種類によって差はあるが、VM 形成能が高い場合には細胞播種後 3 時間程度でネットワーク形成が起こる。その一方で、VM 形成能を有していない細胞は、マトリゲル上で数日間培養してもほとんど変化しない。このような実験系を用いることで、*in vitro* においてがん細胞の VM 形成能を評価できる[17]。これまでにメラノーマ、乳がん、肺がんをはじめとする数多くのがんで VM が報告されており、腫瘍の成長や転移など、がんの悪性化を促進させることが指摘されている[18]。実際、メタ解析によって VM ががん患者の予後不良と密接に関わることが示されており[19]、がんの悪性化を司る新規メカニズムとして注目されている。

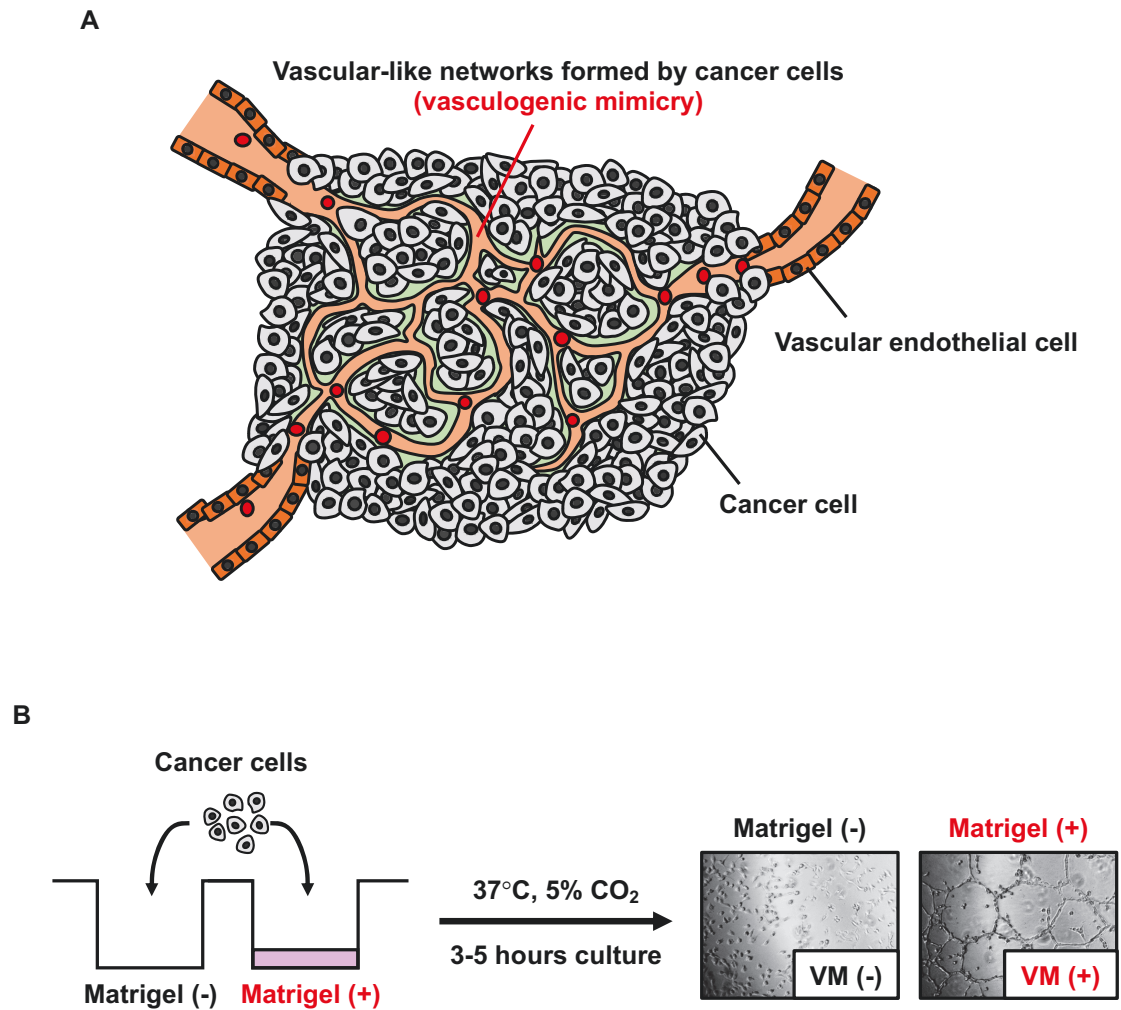


Figure 1-2. Structure of vasculogenic mimicry of cancer cells.

(A) Image of vasculogenic mimicry (VM) in a malignant tumor. (B) *In vitro* VM formation of cancer cells. Red arrows indicate vascular-like tubes. Bar, 100 μ m.

VM形成の詳細なメカニズムは未解明な点が多いが、低酸素圧条件下でHIF-1 α の安定化によりVMが起こることが報告されている[20,21]。HIF-1 α の転写活性によりtwist1発現量が上昇し[22]、twist1が上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を誘導する[23,24]。EMTに伴い、E-cadherinの活性が抑制されることで細胞の遊走能や浸潤能が高められ、VM形成が促進する[25]。また、VM形成時にがん細胞はvascular endothelial (VE)-cadherinの発現量が上昇することが報告されている[26-28]。通常、VE-cadherinは内皮細胞特異的に発現するタンパク質であるため、がん細胞がVE-cadherinを発現させることで内皮細胞様に形態を変え、VM形成を起こすことが予想されている[29]。また、細胞表面の受容体型チロシンキナーゼであるerythropoietin-producing human hepatocellular receptor A2 (EphA2)は、VE-cadherinの働きにより細胞表面に局在化する[30]。それにより、EphA2はPI3Kシグナルやfocal adhesion kinase (FAK)シグナルの活性化を通じてMMPsの発現を誘導し、VM形成に寄与すると考えられている。[31,32]。このように、VM形成は非常に複雑であり、様々な分子機構が報告されているが、その機構を紐解くと普遍的な形成メカニズムが考えられる。それは、細胞外の刺激を受け取ったがん細胞が細胞内シグナルを活性化させ、細胞の形態や遊走能を変化させた後に、組織化されて疑似血管構造を作り出す、というものである (Figure 1-3)。それぞれのがん細胞によってこのVM形成機構に関与する遺伝子は異なるが、いずれにせよ、細胞外刺激を受け取る受容体の存在がVM形成においては必要不可欠であると考えられる。

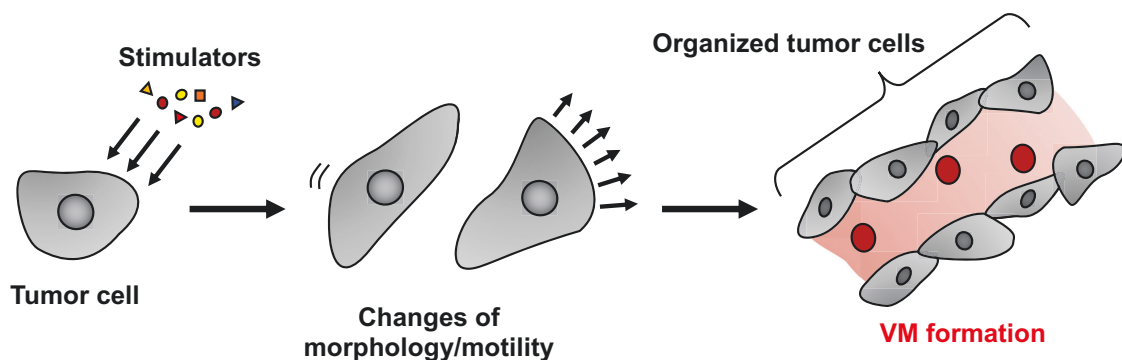


Figure 1-3. Predicted mechanism of VM formation.

第4節 Integrin β 1

1) Integrin の構造と働き

Integrin は細胞表面に発現し、細胞-細胞間や細胞-ECM 間の接着を担う膜貫通型受容体である。Integrin は、 α -サブユニットおよび β -サブユニットからなるヘテロ二量体を形成しており、下記の二種類のルートで活性化状態と不活性化状態を切り替え ECM と細胞の接着を調節している[33,34]。

Inside-out activation では、integrin 以外の受容体が細胞外刺激に応答して細胞内シグナルを活性化させ、talin や FAK を β -integrin の細胞内ドメインにリクルートする。その後、integrin が曲がった状態 (bent closed form) から伸長した状態へと構造変化を起こし、integrin の細胞外リガンドとの結合親和性を高める。一方で outside-in activation では、細胞外のリガンドが integrin ヘテロ二量体に結合することで、膜貫通領域および細胞内の構造が "closed" な状態から "opened" な状態へと変化し、talin や FAK が integrin にリクルートされる。いずれの活性化状態でも、 β -integrin の細胞内ドメインに talin が結合し、FAK を中心とする巨大なタンパク質複合体が作られる (Figure 1-4) [35-41]。これを焦点接着斑 (focal adhesion: FA) といい、細胞と ECM の結合様式として知られている。FA は、細胞内でアクチンと結合しており、ECM 接着に応じた細胞骨格の変化、運動能の変化において中心的な役割を担っている[40]。

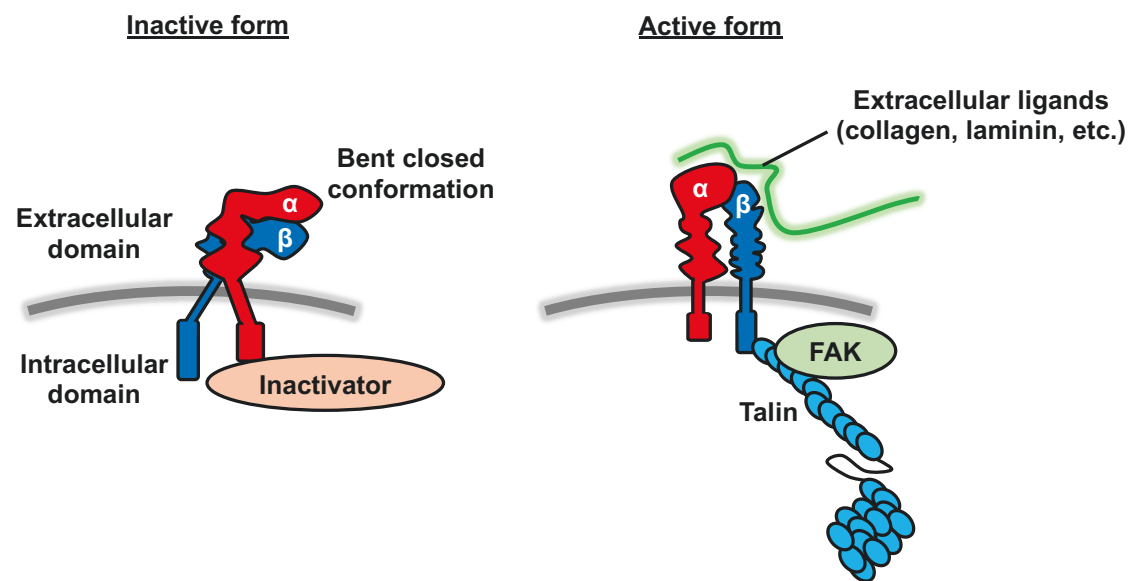


Figure 1-4. Structures of inactive- or active-integrin dimers.

2) がん と integrin $\beta 1$

Integrin のヘテロ二量体は 24 種類の組み合わせが報告されている[43]。Figure 1-5 に示したそれぞれの組み合わせは、結合特性や組織分布が異なり、生命活動に大きく関与するものから、欠損により軽度の障害を引き起こすものやほとんど影響がでないものまで様々である。例えば、integrin $\beta 1$ (ITGB1) を欠損したマウスは内部細胞隙が崩壊して着床前に死に至るが[44]、integrin $\beta 5$ 欠損マウスでは表現型に変化はなく、生命活動を維持することができる[45]。これらの違いは、ヘテロ二量体の組み合わせの数が関係しており、多くのヘテロ二量体形成に関わるアイソフォームほど、生存に必須であると考えられる。

ITGB1 は、12 種類もの α -integrin とヘテロ二量体を形成する integrin の代表的なアイソフォームである (Figure 1-5)。他の integrin アイソフォームに比べて多くの組み合わせが存在するため、細胞の多くの機能に重要である。また、ITGB1 はがん細胞の増殖や遊走を促進することが知られており[46,47]、実際に乳がんや小細胞肺がんにおいて、integrin $\beta 1$ の高発現が予後不良と相関することが報告されている[48,49]。

ECM が豊富な領域で VM が起こることから、代表的な ECM 受容体である ITGB1 は VM 形成に関与することが予想される。実際、integrin と VM に関して研究例は複数報告されており、integrin $\alpha v \beta 3$ や integrin $\alpha v \beta 5$ のヘテロ二量体が VM を促進させることが明らかになっている[50,51]。ITGB1 に関しては、中和抗体による阻害が VM 形成に影響を与えなかったことが報告されているが[50]、この報告においては中和抗体の使用濃度における阻害効果が示されていない。そのため、ITGB1 が本当に VM 形成に寄与しないかは検討の余地がある。

本論文第 2 章では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムにより *ITGB1* 遺伝子をノックアウト (KO) し、直接的に VM 形成における役割を評価した。それによって ECM 受容体と VM 形成の関係をより明白にすることができ、根本的な VM 形成機構の解明につながることを期待される。

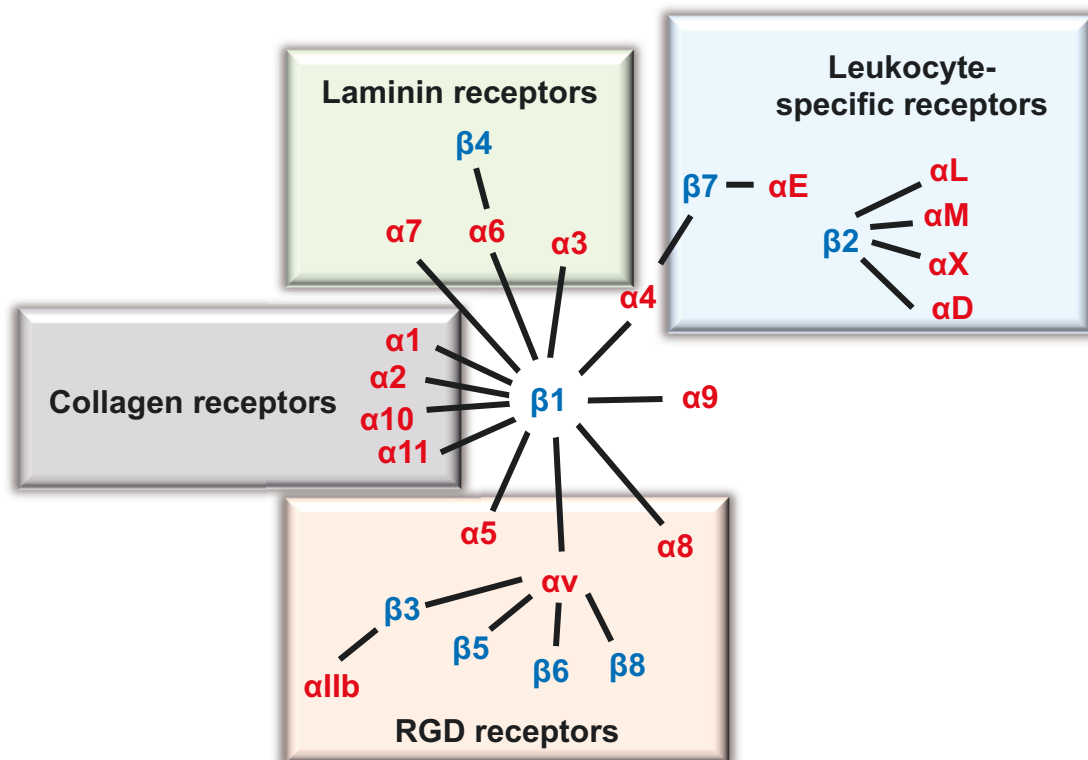


Figure 1-5. Variety of integrin heterodimers [43].

第 5 節 ErbB4

1) ErbB 受容体の機能

ErbB 遺伝子は鳥に赤芽球症 (erythroblastosis) を発症させるウイルスの原因遺伝子 (*v-erbB*) として見つかり、その後に細胞内にもその遺伝子ホモログが存在することが報告された (*c-erbB*) [52]。ErbB ファミリーは細胞表面に発現する典型的な受容体型チロシンキナーゼであり、4 種類の受容体 (ErbB1/HER1/EGFR、ErbB2/HER2/Neu、ErbB3/HER3、ErbB4/HER4) から構成される。細胞外ドメインがリガンドと結合することで、ErbB ファミリーはホモ/ヘテロ二量体を形成し、細胞内のチロシン残基を自己リン酸化する (Figure 1-6)。その後、細胞内の多様なシグナル伝達を活性化させることで、細胞増殖や細胞生存などを促進させる。

ErbB 受容体の過剰発現や異常な活性化はがんにおいて高頻度に見られる[53-55]。そのため、EGFR や HER2、ErbB3 を標的としたキナーゼ阻害剤は、がん治療においてよく用いられている[56,57]。これら 3 種類の ErbB 受容体とがんとの関わりがよく研究されているのに対して、がんにおける ErbB4 の働きは複雑であり、明確な役割が明らかになっていないのが現状である。

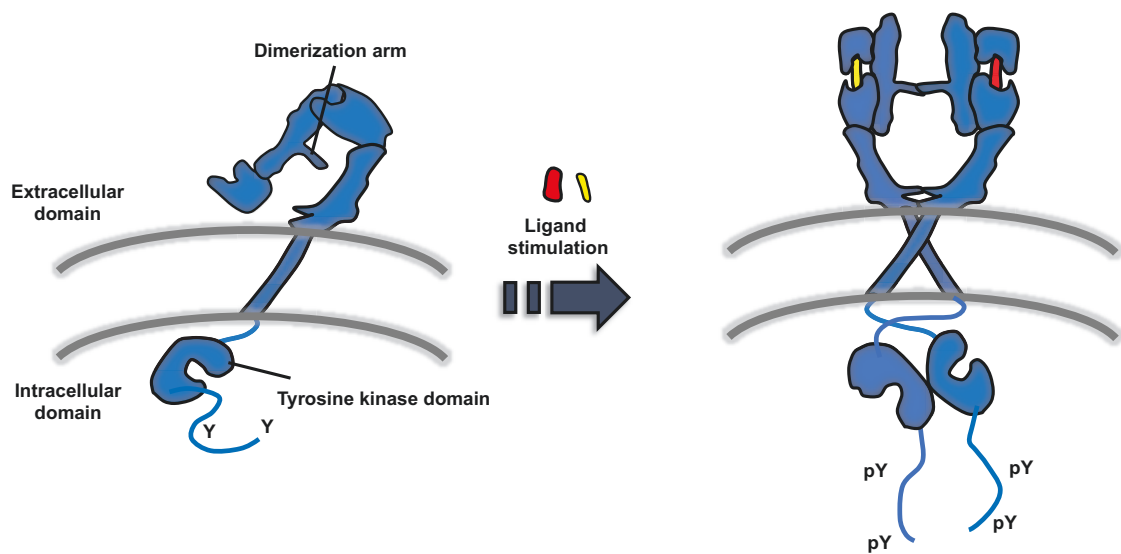


Figure 1-6. Ligand-dependent dimerization and phosphorylation of ErbB receptors.

2) がんにおける ErbB4 の役割

他の ErbB 受容体とは対照的に、ErbB4 は乳がん患者の予後良好マーカーとなることが示唆されている[58,59]。その理由としては、リガンドによる刺激後、ErbB4 の細胞内ドメインが切断されてミトコンドリアに移行し、アポトーシスを引き起こすからである[60,61]。他方で、ErbB4 はがん化に寄与する PI3K/Akt 経路や mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を活性化し、大腸がんにおいては ErbB4 の高発現が報告されている[62,63]。

乳がん、メラノーマ、非小細胞肺癌において、*ErbB4* の遺伝子変異が報告されている[64-66]。特に、Prickett らは転移性メラノーマ患者のチロシンキナーゼ変異を網羅的に調べており、20箇所もの *ErbB4* 変異を同定した (Figure 1-7) [65]。これらの変異の中には、ErbB4 のキナーゼ活性を強めるものがあり、ErbB4 の変異ががんの悪性化を促すことが示唆された。

このように、がんの種類によって ErbB4 は役割を変える可能性があることから、がんの治療標的としては認識されていなかった。しかし、浸潤性の乳がんや転移性メラノーマで ErbB4 変異が見つかることから、「がん遺伝子」として ErbB4 が振る舞う可能性が大いに考えられる。そこで本論文第 4 章では、ErbB4 の発現や活性化状態と VM 形成の関係を評価した。この解析により、がんにおける ErbB4 の複雑な働きを、VM によって説明できる可能性がある。

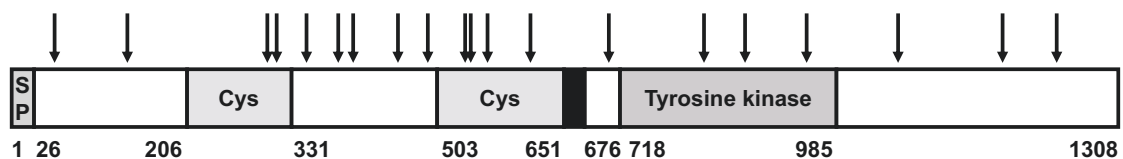


Figure 1-7. *ErbB4* mutations in melanoma [65].

Black arrows are missense mutation sites. SP and Cys indicate signal peptide and cysteine-rich domain, respectively. Black box expresses transmembrane domain.

第 6 節 本研究の目的

効率的かつ効果が高いがん治療は、世界中で求められている。これまでに数多くの抗がん剤が開発され、多くの人類の命を救ってきたが、まだ人類はがんを克服できたわけではない。すなわち、血管新生や細胞増殖因子の阻害という概念だけでは、がんの全容理解には至らないのである。著者が注目した血管擬態 (VM) は、様々な種類のがんで見られ、腫瘍の成長や転移を促進させることが報告されている。そのため、VM を研究することにより、がんの複雑かつしたたかな悪性化機構の解明に貢献できると考えられる。しかし、VM は見つかって日が浅いため、根本的なメカニズムに不明瞭な点がある。そこで本論文では、2 種類の全く異なる特徴を持った細胞表面受容体である integrin $\beta 1$ と ErbB4 について、VM 形成に関与するか否かを評価した。いずれのタンパク質もよく研究されてきた有名なものであるが、VM との関係は知られていない。そのため、これらのタンパク質が VM に与える影響を調べることで、細胞表面受容体がどのように VM 形成を制御しているのか、という大きな枠組みを説明する重要な知見となる。また、将来的に VM 陽性がんのマーカーや治療標的として、本研究成果が利用されることが期待される。

第2章 Integrin β 1 が血管擬態形成に与える影響の解析

生体内において、悪性腫瘍の血管擬態 (VM) は細胞外マトリックス (ECM) 成分が豊富な環境下で起こることが示唆されている。そのため、がん細胞表面の受容体と ECM を構成するタンパク質との相互作用が、VM 形成に重要であると考えられる。ECM の主たる受容体として integrin ファミリーが知られているが、integrin と VM 形成との直接的な関係を示した例はこれまでにない。そこで第2章では、integrin の中で最も多くの機能に関与するサブユニットである integrin β 1 (ITGB1) に着目し、ITGB1 が VM 形成に与える影響を調べた。

第1節 血管擬態形成における integrin の関与

Integrin は基質と相互作用する際、2 価の陽イオンによりその活性が制御される。特に、マグネシウムイオンやカルシウムイオンは integrin と結合することでその立体構造を安定化させ、リガンドの認識や結合に寄与する[67-69]。そこで、ヒト線維肉腫由来の HT1080 細胞にカルシウムイオンキレート剤である EGTA を処理し、マトリゲル上に播種することで VM 形成能を評価した。その結果、EGTA を処理することで、VM 形成能が著しく低下し、EGTA と CaCl_2 を共処理することでこの形成阻害効果が弱められた (Figure 2-1A,B)。また、マトリゲル上における生細胞の数を WST assay により測定したところ、EGTA の単剤処理および EGTA と CaCl_2 の共処理において生細胞数の違いは認められなかったことから (Figure 2-1C)、カルシウムイオンを介した integrin の活性が VM 形成に重要であることが示唆された。

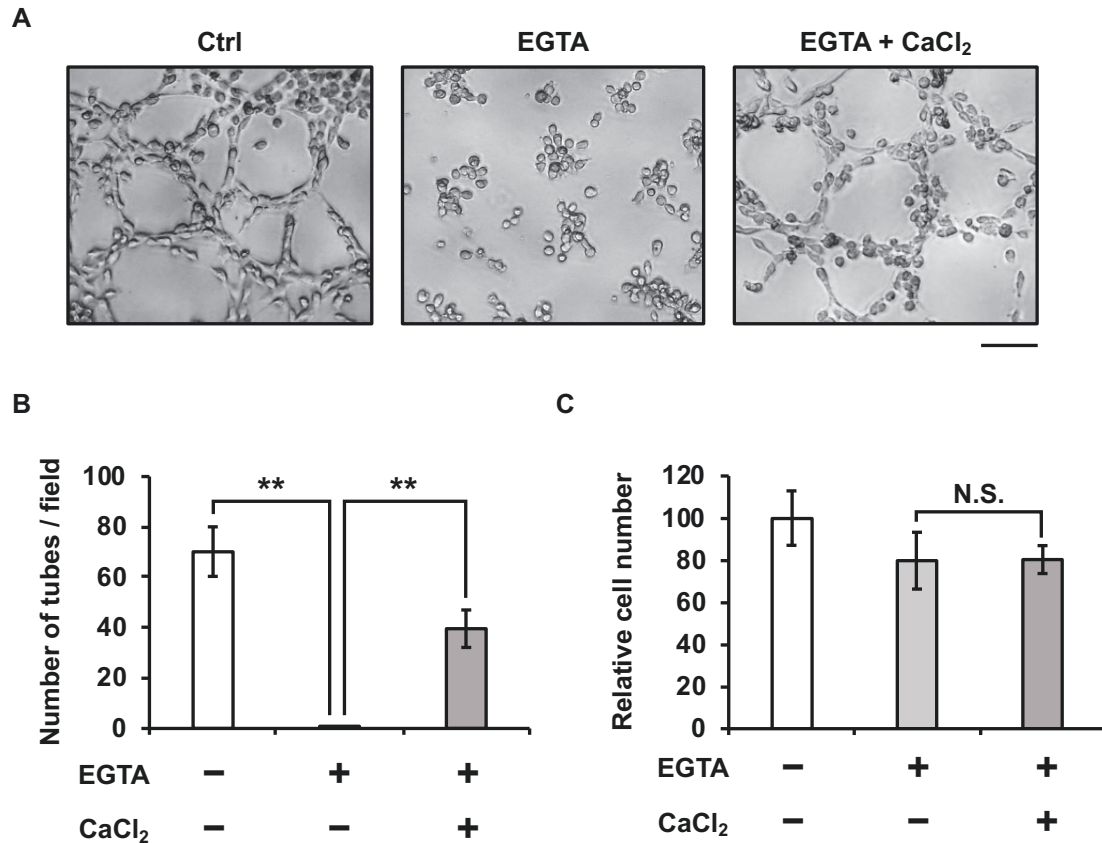


Figure 2-1. Chelation of calcium ion suppresses VM formation in HT1080 cells.

(A and B) HT1080 cells were suspended and treated with 3 mM EGTA with or without 3 mM CaCl₂, and seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Then the cells were cultured for 3 hours and photographs were taken under a microscope (A). The number of tubes were counted in randomly selected 5 independent fields (B). (C) HT1080 cells were suspended and treated with 3 mM EGTA with or without 3 mM CaCl₂, and seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Cell Counting Kit-8 was added into each well at 1 hour after cell seeding, and then cell culture was continued for an additional 2 hours. Subsequently, absorbance at 450 nm was measured and living cell numbers were normalized to the control cells. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. *P* value < 0.01 is indicated by **. N.S., not significant.

第2節 Integrin β 1 ノックアウトによる血管擬態形成への影響

1) CRISPR/Cas9 システムによる integrin β 1 のノックアウト

EGTA の処理により integrin 等が VM 形成を制御することが示唆されたため、より詳細に ITGB1 と VM の関係を調べることにした。ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを利用し、*ITGB1* 遺伝子をノックアウト (KO) した HT1080 細胞を樹立した (Figure 2-2)。この ITGB1-KO HT1080 細胞のゲノム DNA を抽出して塩基配列を解析した結果、3 パターンの変異 (61、31、19 塩基の欠損) が確認できた (Figure 2-3)。これらの変異はいずれも $3n+1$ の塩基欠損であり、結果として本来の終止コドンよりかはるか N 末端側で終止コドンを発生させるフレームシフト変異であった。以上の実験により、HT1080 細胞における完全な ITGB1 の KO を確認し、その細胞を樹立した。

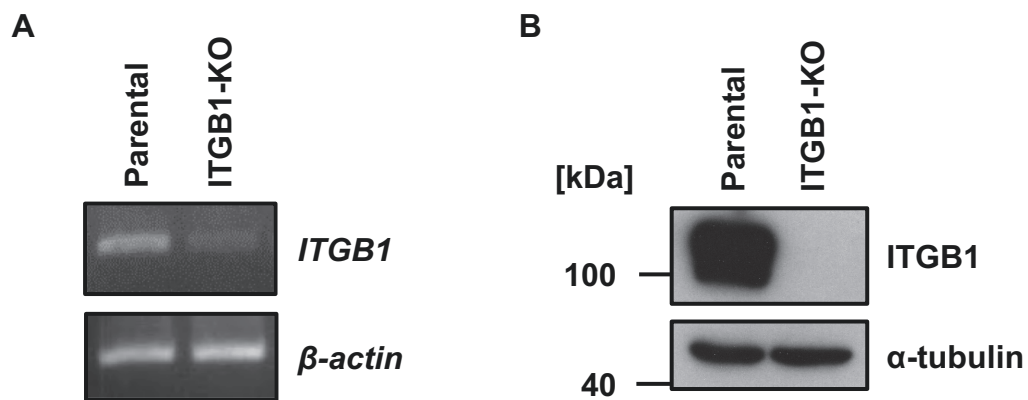


Figure 2-2. Establishment of ITGB1-KO HT1080 cells.

(A) Total RNAs of parental and ITGB1-KO HT1080 cells were isolated and semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction was performed. (B) Parental and ITGB1-KO HT1080 cells were lysed and western blot was performed.

2) Integrin $\beta 1$ の KO が血管擬態形成に与える影響の評価

樹立した ITGB1-KO HT1080 細胞をマトリゲル上に播種し、ネットワーク形成能を評価した。その結果、細胞播種後 3 時間の時点で、ITGB1 の KO によってマトリゲル上でのネットワーク形成が完全に抑制された (Figure 2-4A,B)。また、この細胞を培養し続けた結果、親株では細胞播種後 24 時間の時点でもネットワーク構造の形成は維持されたままであったが、ITGB1-KO 細胞ではその形成が確認できなかった (Figure 2-4C)。したがって、HT1080 細胞において ITGB1 を欠損させると、VM 形成能が完全に失われることが示唆された。

この ITGB1 による効果を、他の種類のがん細胞株においても検証した。ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞およびヒトメラノーマ由来 CHL-1 細胞において、CRISPR/Cas9 システムにより *ITGB1* 遺伝子をノックアウトした結果、いずれの細胞においても親株でみられるネットワーク形成が完全に抑制された (Figure 2-5)。以上の結果から、ITGB1 はヒトがん細胞株の VM 形成において必須の因子であることが示された。

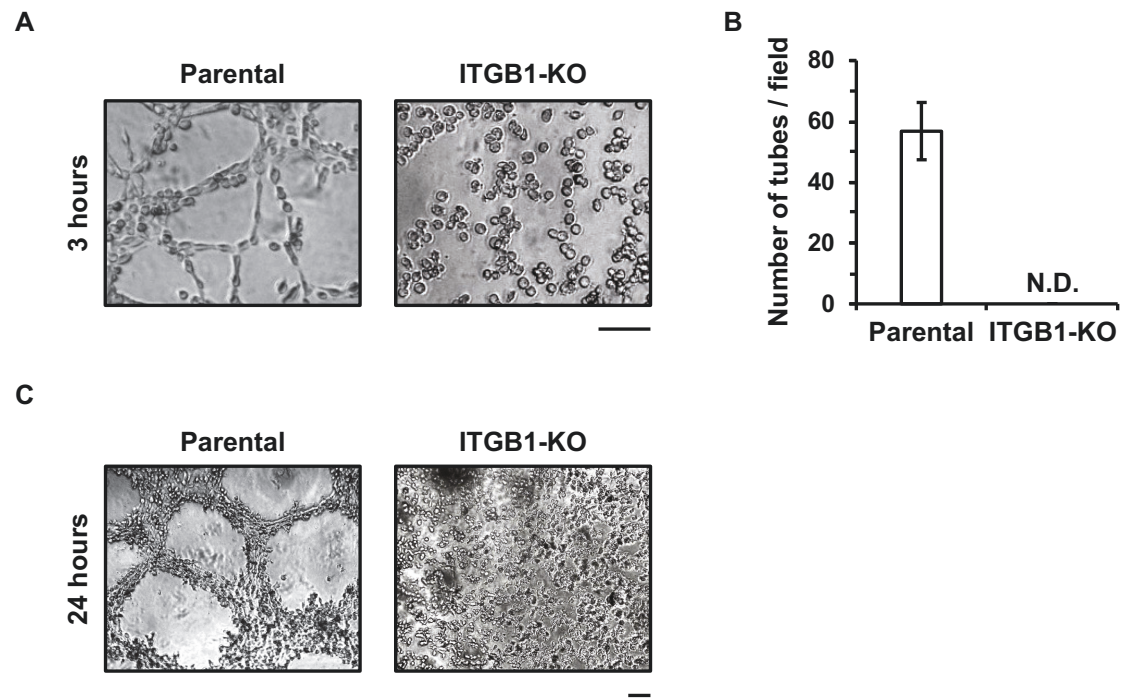


Figure 2-4. KO of ITGB1 completely abolishes VM formation in HT1080 cells.

(A-C) Parental and ITGB1-KO HT1080 cells were suspended and seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well), and photographs were taken at 3 hours after seeding (A) and the number of tubes was counted in 5 randomly selected independent fields (B). These cells were also photographed at 24 hours after seeding (C). Bars, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.D., not detected.

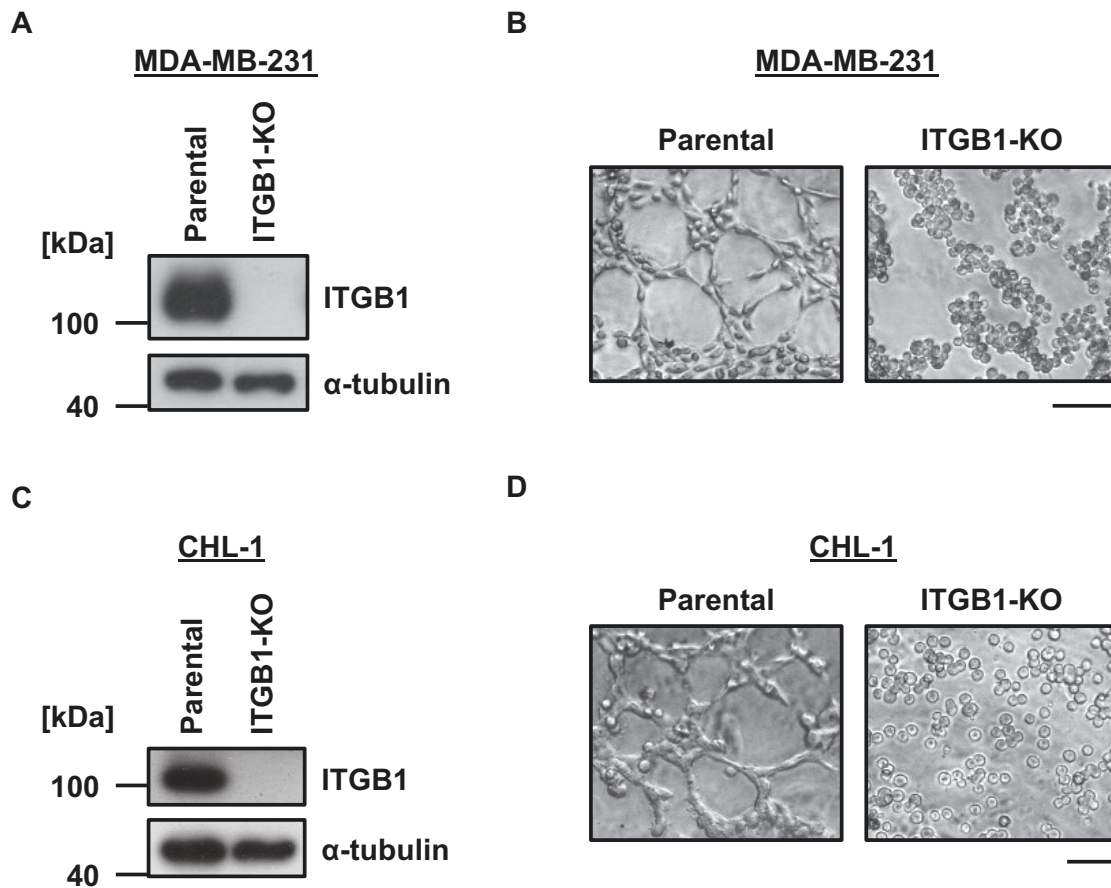


Figure 2-5. Deletion of ITGB1 suppresses VM formation in MDA-MB-231 and CHL-1 cells.

(A and C) Parental and ITGB1-KO cells (A, MDA-MB-231; C, CHL-1) were lysed and western blot was performed. (B and D) Cells (B, MDA-MB-231; D, CHL-1) were suspended and seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well), and photographs were taken at 3 hours after seeding. Bars, 100 μ m.

3) Integrin $\beta 1$ の KO が細胞の特性に与える影響の解析

ITGB1 は増殖能や遊走能など、細胞の様々な機能を調節している。そこで HT1080 細胞において、ITGB1 の KO が細胞に与える影響を評価した。WST assay により細胞増殖能を評価した結果、親株と比べて ITGB1-KO 細胞では有意に増殖能が上昇した (Figure 2-6A)。また、poly hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) をコートしたウェル上で細胞を培養した結果、ITGB1 の KO により足場非依存性の細胞増殖が著しく抑制された (Figure 2-6B)。さらに、真円度を算出することにより細胞形態を評価した結果、ITGB1-KO 細胞では真円度が有意に低下していた (Figure 2-7)。以上のように、ITGB1 は VM 形成に寄与するだけでなく、細胞の増殖や形態などにも影響を与えることが示された。

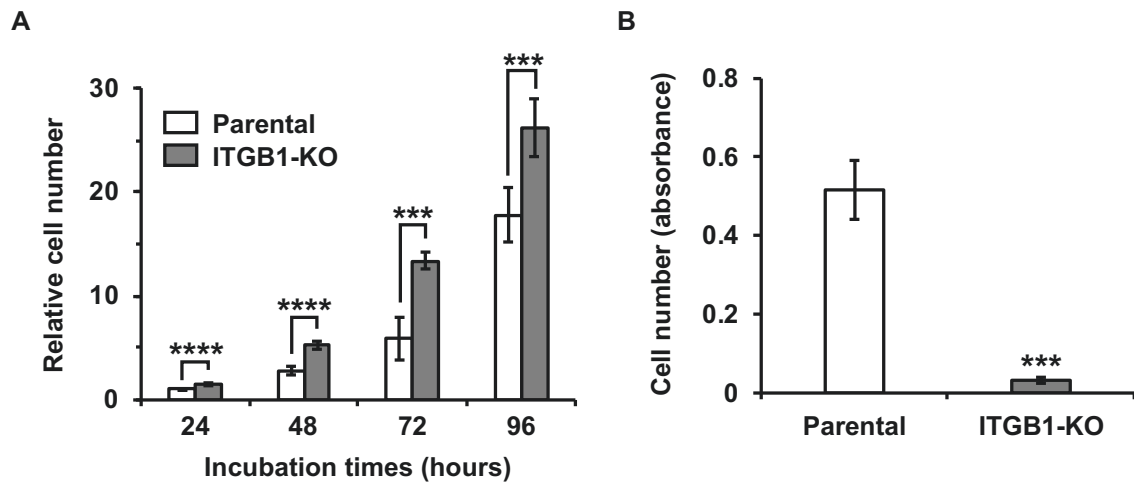


Figure 2-6. KO of ITGB1 affects cell growth in HT1080 cells.

(A) Parental and ITGB1-KO HT1080 cells were seeded into 96 well plates (600 cells/well) and cultured for 96 hours. Then, WST assay was performed at every 24 hours. Cell numbers were normalized by the number of parental cells at 24 hours. (B) Parental and ITGB1-KO HT1080 cells were seeded onto poly-HEMA-precoated 96 well plates (4000 cells/well) and cultured for 2 weeks. Then, WST assay was performed. Data shown are means \pm SD. *P* values < 0.001 and < 0.0001 are indicated by *** and ****, respectively.

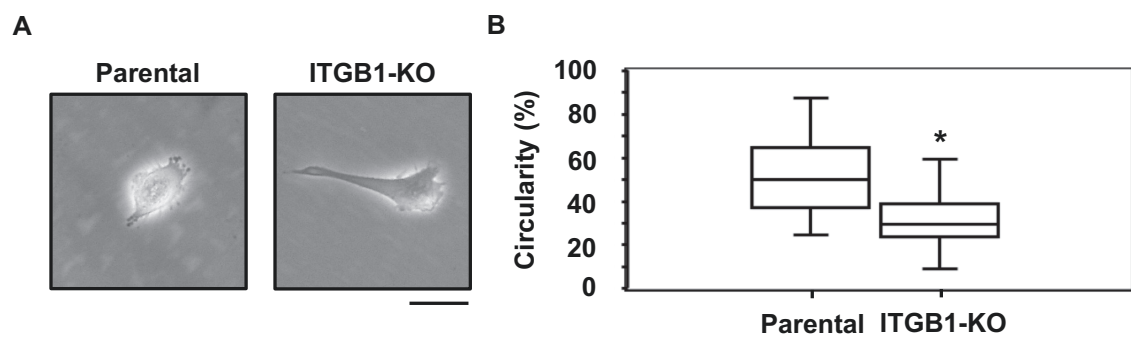


Figure 2-7. KO of ITGB1 affects cell morphology in HT1080 cells.

(A and B) Parental and ITGB1-KO HT1080 cells were cultured for 48 hours, and photographs were taken under a microscopy (A). Cell circularity was determined by the calculating formula: $\text{Circularity (\%)} = 100 \times (4\pi \times \text{area}) / (\text{perimeter})^2$, using ImageJ software (B). In each cell line, 100 cells were calculated. Bar, 50 μm . Data shown are means \pm SD. *P* value < 0.05 is indicated by *.

第3節 Integrin β 1 の再発現による血管擬態形成への影響

HT1080、MDA-MB-231、CHL-1 という由来が異なる 3 種類のがん細胞において、ITGB1 を欠損させると VM 形成能が失われた。しかし、CRISPR/Cas9 システムにはオフターゲットのリスクがある。そこで、ITGB1 タンパク質を KO した細胞に ITGB1 を再発現させることで、これらの VM 抑制効果が本当に ITGB1 の欠損によるものかを確認した。ITGB1 の発現ベクターを作製するにあたり、CRISPR/Cas9 の標的とした配列に塩基置換を導入することで、Cas9 耐性の *ITGB1* 遺伝子となるようにした。レンチウイルスベクターを用いて、ITGB1-KO 細胞において ITGB1 を再発現させた結果、VM 形成が回復した (Figure 2-8)。この結果から、ITGB1-KO HT1080 細胞における VM 形成の抑制は、確かに ITGB1 の欠損によるものであることが示された。

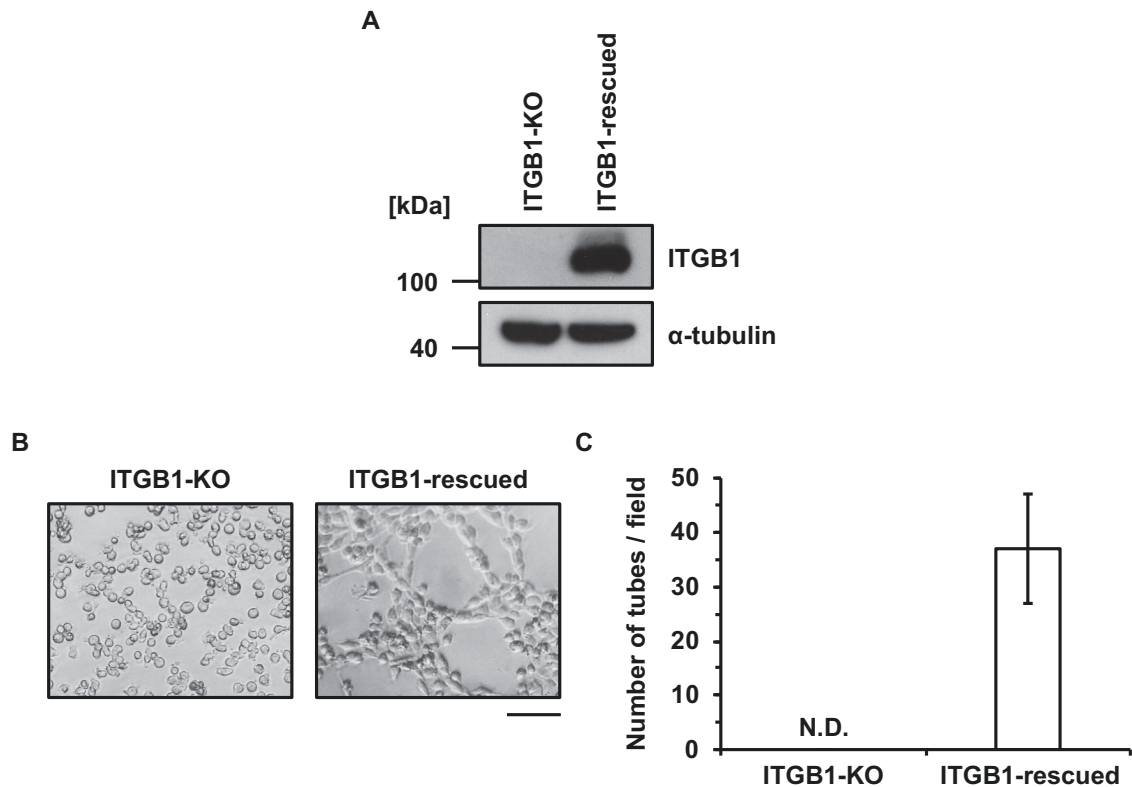


Figure 2-8. Reexpression of ITGB1 recovers VM formation in ITGB1-KO HT1080 cells.

(A) ITGB1-KO and ITGB1-rescued HT1080 cells were lysed and immunoblotted with the indicated antibodies. (B and C) Cells were suspended and seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well), and photographs were taken at 3 hours after seeding (B) and the number of tubes was counted in 5 randomly selected independent fields (C). Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.D., not detected.

第4節 Integrin β 1-FAK シグナルの評価

ITGB1 の代表的な下流シグナルとして、focal adhesion kinase (FAK) が知られている。Integrin を介した接着により、FAK の Y397 が自己リン酸化して活性化する[38]。そこで、ITGB1 の発現によって FAK の活性化状態を確かめた。その結果、ITGB1 を KO することで FAK Y397 のリン酸化は弱められ、ITGB1 の発現をレスキューさせることで FAK Y397 のリン酸化レベルが回復した (Figure 2-9)。しかし、FAK の阻害剤である PF-573228 を処理しても VM 形成に影響はなかったことから (Figure 2-10)、FAK のリン酸化は VM 形成と相関しているが、その活性化は VM 形成に必須ではないことが示唆された。

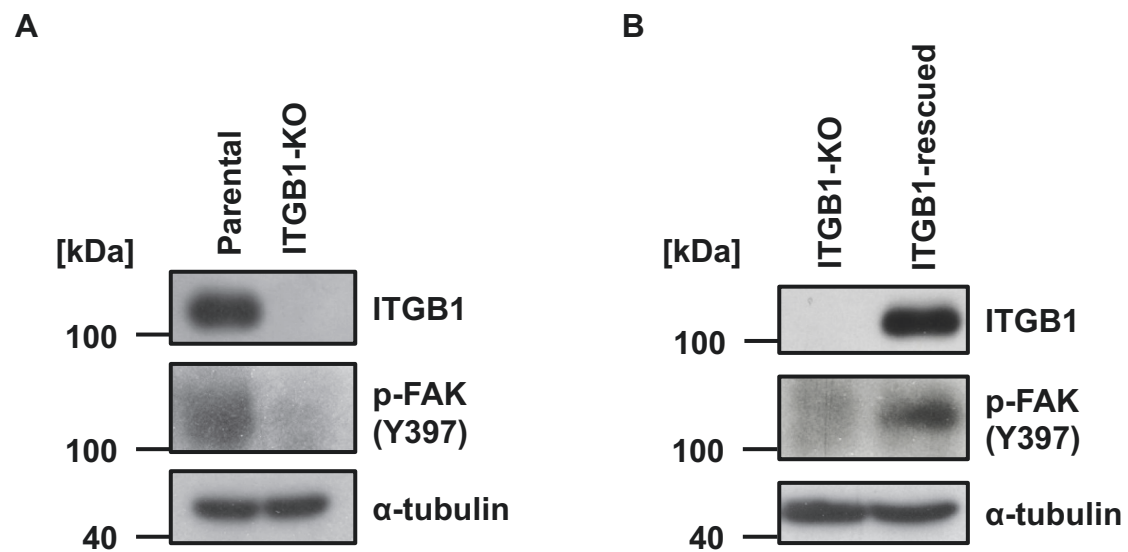


Figure 2-9. ITGB1 expression correlates with FAK activation.

(A) Parental and ITGB1-KO HT1080 cells were cultured in Matrigel-precoated dishes, and the cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (B) ITGB1-KO and ITGB1-rescued HT1080 cells were cultured in Matrigel-precoated dishes. Then, the cells were lysed and western blot was performed.

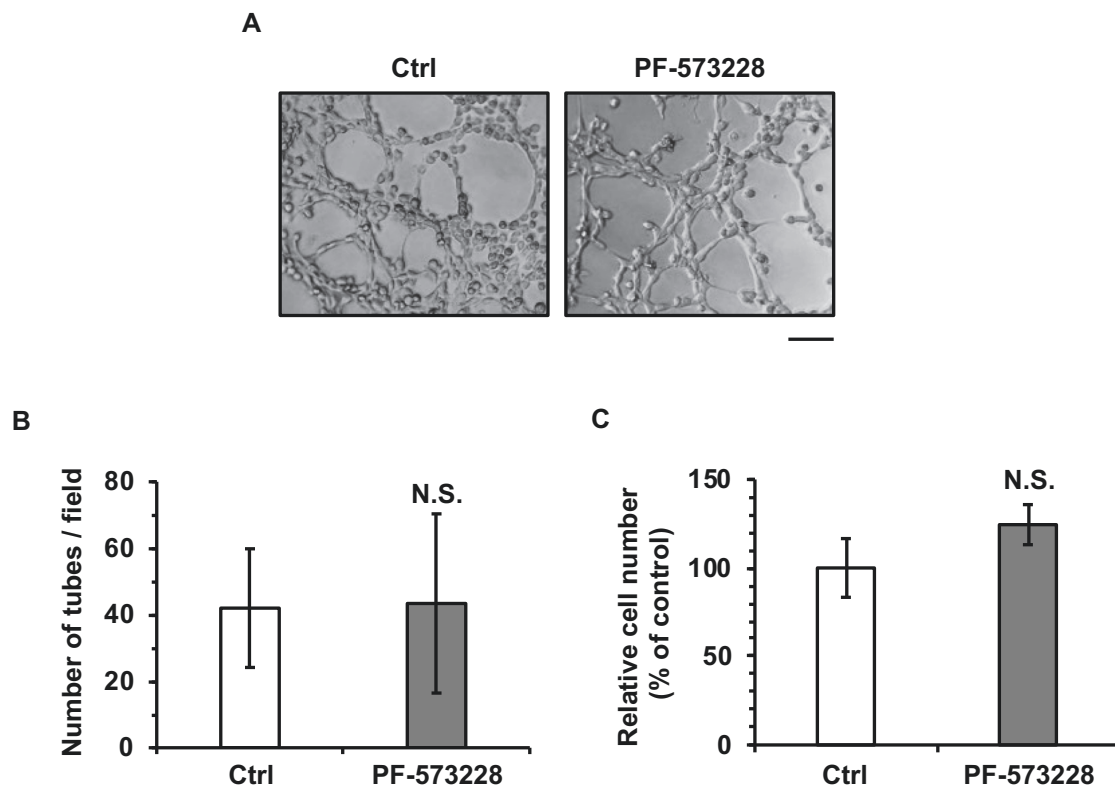


Figure 2-10. FAK inhibition does not suppress VM formation.

(A-C) HT1080 cells were pre-treated with 10 μ M PF-573228 in serum free medium for 1 hour, and subsequently seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). After 1 hour, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was added to each well, and culture was continued for an additional 2 hours. Three hours after seeding, photographs were taken under a microscope (A), and the number of tubes was counted in randomly selected 5 independent fields (B). Then, absorbance at 450 nm was measured. Living cell numbers were normalized to the control cells (C). Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.S., not significant.

第5節 中和抗体およびペプチド処理による血管擬態形成の阻害効果

Figure 2-1 でカルシウムイオンをキレートした際の VM 形成を評価したが、カルシウムイオンにより活性が制御されるタンパク質は ITGB1 の他にも多数存在する。そこで、カルシウムイオンにより活性を制御される細胞膜タンパク質である integrin α v (ITGAV) や E-cadherin の中和抗体を HT1080 細胞に処理し、その機能を阻害することで VM 形成に影響を与えるか否かを評価した。その結果、抗 ITGAV 抗体処理で VM 形成は阻害されなかったが、抗 E-cadherin 抗体処理は部分的に阻害し、抗 ITGB1 抗体は VM 形成を完全に抑制した (Figure 2-11A,B)。なお、各中和抗体処理による細胞毒性は認められなかった (Figure 2-11C)。また、これまでに VE-cadherin が VM 形成に寄与することが報告されてきたが、ITGB1 の KO によって VE-cadherin の mRNA 発現量は変化しなかったことから、ITGB1 を介した VM 形成経路には関与していないものであると考えられる。

ECM 構成タンパク質の多くは、3 つの連続したアミノ酸 (Arg-Gly-Asp: RGD 配列) を介して細胞に接着する[70,71]。すなわち、integrin による基質の認識に重要なアミノ酸である。そこで、HT1080 細胞に RGD ペプチドを処理することで、RGD 配列依存的な ECM-integrin 相互作用を阻害した結果、RGD ペプチドを処理しても VM 形成能は変化しなかった (Figure 2-12)。

以上の結果より、カルシウムイオンにより活性を制御されるタンパク質の中でも、E-cadherin や ITGB1 など、一部のタンパク質のみが血管擬態に寄与することが示唆された。また、RGD 配列との相互作用に重要な ITGAV 阻害が VM 形成を抑制しなかったことや、RGD ペプチド処理が VM 形成に影響を与えなかったことから、VM 形成において RGD 配列を介した ECM 成分とがん細胞の相互作用は必須ではないことが示唆された。

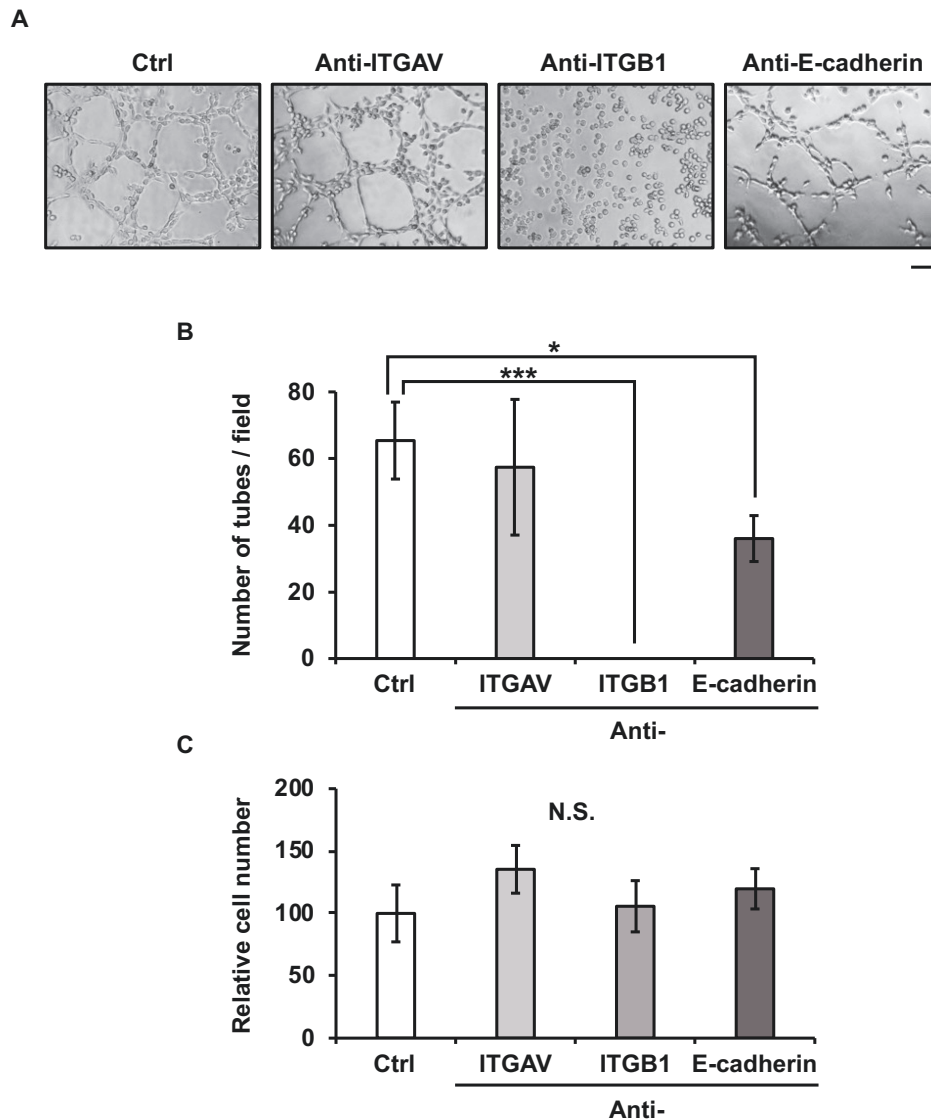


Figure 2-11. Effect of neutralizing antibodies treatment on the VM formation.

(A-C) HT1080 cells were suspended and treated with anti-integrin αv (ITGAV) antibody (10 $\mu\text{g/mL}$), anti-integrin $\beta 1$ (ITGB1) antibody (2 $\mu\text{g/mL}$), or anti-E-cadherin antibody (12 $\mu\text{g/mL}$). Then, the cells were seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). At 1 hour after cell seeding, CCK-8 was added to each well, and cell culture was continued for an additional 2 hours. Three hours after seeding, photographs were taken under a microscope (A), and the number of tubes was counted in randomly selected 5 independent fields (B). Then, absorbance at 450 nm was measured. Living cell numbers were normalized to the control cells (C). Bar, 100 μm . Data shown are means \pm SD. *P* values < 0.05 and < 0.001 are indicated by * and ***, respectively. N.S., not significant.

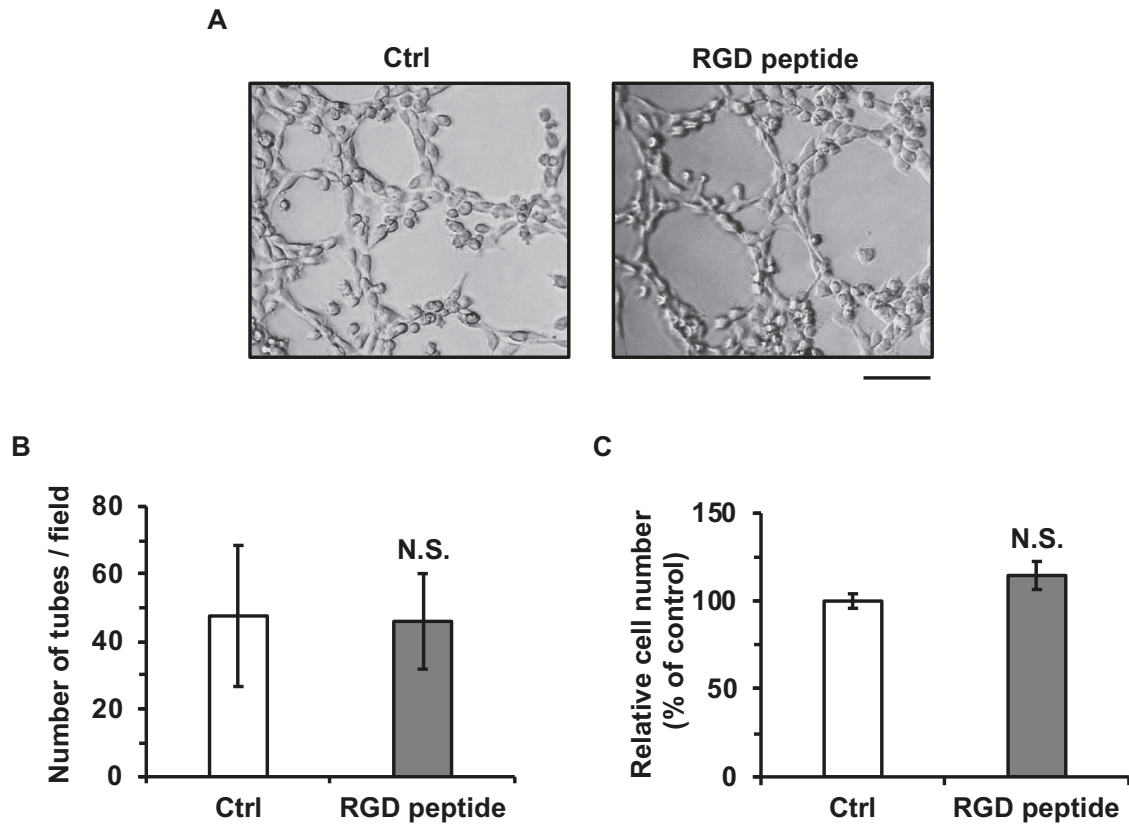


Figure 2-12. Treatment with RGD peptide does not affect the VM formation.

(A-C) HT1080 cells were pre-treated with 10 μ M RGD peptide in serum free medium for 1 hour, and subsequently seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). After 1 hour, CCK-8 was added to each well, and culture was continued for an additional 2 hours. Three hours after cell seeding, photographs were taken under a microscope (A), and the number of tubes was counted in randomly selected 5 independent fields (B). Then, absorbance at 450 nm was measured. Living cell numbers were normalized to the control cells (C). Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.S., not significant.

第 6 節 まとめ

第 2 章では、細胞と ECM との相互作用に重要な ITGB1 が、VM 形成に与える影響を評価した。ヒト線維肉腫由来の HT1080 細胞において、EGTA 処理により VM 形成が阻害されたことから、カルシウムイオンに依存した integrin の活性が VM 形成に関与することが示唆された。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて ITGB1-KO 細胞を樹立し、より直接的に ITGB1 が VM 形成に与える影響を評価した。その結果、ITGB1 の欠損により VM 形成は完全に抑制され、この結果はヒト乳がん、ヒトメラノーマという由来が異なる複数のがん細胞でも同様であった。また、ITGB1-KO HT1080 細胞に ITGB1 を再発現させると VM 形成が回復したことから、CRISPR/Cas9 のオフターゲット作用ではなく、ITGB1 が VM 形成に重要であることが強く示された。さらに、ITGB1 の発現および VM 形成と、リン酸化 FAK 発現量には正の相関があった。最後に、中和抗体を用いていくつかの細胞表面受容体を阻害した結果、ITGB1 を阻害した時に VM 形成は完全に抑制された。

以上の結果から、ヒトがん細胞の VM 形成における普遍的な必須因子として、ITGB1 が機能することが示された。

第2章の実験方法

1) 細胞培養

ヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞、ヒト胚性腎臓由来 HEK293T 細胞、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞は、DMEM 培地に 7% (v/v) fetal bovine serum (FBS)、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin、600 mg/L、2.25 g/L NaHCO₃ を添加した培地を利用し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。また、ヒトメラノーマ由来 CHL-1 細胞は、上記の培地の FBS 濃度を 10%に変えた培地を用いて、同様の方法で培養した。

2) *In vitro* VM formation assay

Matrigel® Growth Factor Reduced (Corning #354230 (以下、マトリゲル)) は氷上で融解し、無血清の DMEM 培地により 1.5 倍に希釈して用いた。氷上で 96 well plate に希釈済みマトリゲルを加え (40 µL/well)、振盪することでマトリゲルを均一にコーティングした。その後、37°C で 30 分以上静置することで、マトリゲルを完全にゲル化させた。ゲル化したマトリゲル上に、 1.6×10^4 cells/well となるように懸濁した細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。VM 形成の様子は顕微鏡 (Leica) で撮影し、細胞で囲まれた領域を "tube" としてカウントした。1 つのサンプルにつき 5 箇所の視野を撮影し、各々の tube 数をカウントし、平均化することで VM 形成の定量化を行った。

3) CRISPR/Cas9 システムを用いた ITGB1-KO 細胞の樹立

CRISPR/Cas9 システムを用いて ITGB1-KO 細胞を樹立した[72]。本研究ではオフターゲットのリスクを低減させるため、二箇所の標的配列を設計し、ニックアーゼ改変型 Cas9 (D10A 変異型) による遺伝子ノックアウトを試みた。Single guide RNA を作るためのオリゴ DNA の配列は、以下の通りである。

標的 1: forward, 5'-CACCGAATGTAACCAACCGTAGCAA-3'

reverse, 5'-AAACTTGCTACGGTTGGTTACATTC-3'

標的 2: forward, 5'-CACCGCTTTATATCTTTGGAGCCTC-3'

reverse, 5'-AAACGAGGCTCCAAAGATATAAAGC-3'

各々の forward と reverse のオリゴ DNA をアニーリングし、BbsI により制限酵素処理した pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0 plasmid に組み込んだ。これら 2 つのプラスミドを、LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて HT1080、MDA-MB-231、CHL-1 細胞に遺伝子導入し、2 µg/mL の puromycin dihydrochloride (Merck KGaA) でセレクションを行った。その後、限界希釈法によりクローン細胞株を樹立し、western blot により ITGB1 の KO を確認した。

4) Western blot

細胞表面を氷冷した PBS で洗浄した後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% [w/v] sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% [v/v] Triton X-100, 1% [w/v] sodium deoxycholate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えた。なお、リン酸化タンパク質を検出する際には、上記の組成に加えて PhosSTOPTM (Merck KGaA) を加えた lysis buffer を用いた。ラバーポリスマンを用いて細胞を掻き取ってマイクロテストチューブに溶液を移し、超音波処理することで細胞を破碎した。Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories) を用いて細胞溶解液のタンパク質濃度を定量し、各サンプルの濃度を揃えた。各サンプルに loading buffer (350 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% [w/v] glycerol, 0.012% [w/v] bromophenol blue, 6% [w/v] SDS, and 30% [v/v] 2-mercaptoethanol) を加え、98°C で 3 分間熱処理した後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。泳動後のゲルを PVDF 膜に転写し、抗原抗体反応により各タンパク質を検出した。1 次抗体は、抗 integrin β1 抗体 (Abcam #ab52971)、抗 p-FAK (Y397) 抗体 (Abcam #ab81298)、抗-α-tubulin 抗体 (Merck KGaA #T5168) を用いた。また、発色には、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) と Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrates (Merck KGaA) を用いた。

5) ITGB1-KO HT1080 細胞における ITGB1 の再発現

ヒト *ITGB1* の cDNA は、HT1080 細胞の cDNA ライブラリーから PCR により増幅した。PCR に用いたプライマーの配列は、以下の通りである。

Forward, 5'-TTTTCTCGAGATGAATTTACAACCAATTTTCTGG-3'

Reverse, 5'-TTTTGCGGCCGCTCATTTTCCCTCATACTTCGG-3'

また、導入した ITGB1 が再び CRISPR/Cas9 により編集されるのを防ぐため、アミノ酸置換を起こさないように、増幅した *ITGB1* の塩基を置換した。塩基置換に用いたプライマーの配列は以下の通りである。

Forward, 5'-GGGAAGTAAGGACATCAAGAAAAATAAAAACGTTACGAATAG
GTCTAAAGGAACAGCAGAG-3'

Reverse, 5'-AGACCTATTCGTAACGTTTTTATTTTCTTGATGTCCTTACTTCCC
CTGGGATTTTCTATG-3'

上記のプライマーを用いて、オーバーラップ PCR により増幅した。増幅した Cas9 耐性の *ITGB1* を、XhoI および NotI により制限酵素処理した CSII-CMV-MCS plasmid (RIKEN BioResource Center) に組み込んだ。このプラスミドと Lentivirus High Titer Packaging Mix (Takara Bio) を、Polyethylenimine “MAX” (PEI) (Polysciences) を用いて HEK293T 細胞に遺伝子導入し、6 時間培養して培地交換を行った。その後 48 時間細胞を培養し、培養上清を回収してフィルター滅菌することで細胞を除去した。ウイルス粒子を含んだ培養上清を回収し、ITGB1-KO HT1080 細胞に加えることで、レンチウイルスを感染させた。その後、western blot により ITGB1 の再発現を確認した。

6) WST assay

Cell Counting Kit-8 (CCK-8; FUJIFILM Wako) を細胞に添加し (培地の 1/10 量)、37°C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートし、450 nm の吸光度を測定した。

7) 96 well plate における poly-HEMA のコーティング

95%エタノール溶液中に、poly-HEMA の粉末を 5 mg/mL の濃度となるように加え、37°C で 2 日インキュベートすることで完全に溶解させた。この poly-HEMA 溶液を 96 well plate 上に 50 µL/well となるように入れ、37°C で 2 日間インキュベートすることでエタノールを蒸発させた[73]。

8) 細胞形態の観察

細胞を播種してから 48 時間培養し、完全に底面に接着させた。その後、各細胞株につき 100 個の細胞の写真を撮り、ImageJ (version 1.51s; National Institutes of Health)ソフトウェアにより[74]、細胞の周長および面積を測定した。細胞の真円度は、以下の通りに算出した。

$$\text{真円度 (\%)} = 100 \times (4\pi \times \text{面積}) / (\text{周長})^2$$

9) 有意差検定

本章におけるデータセットの比較には、Student の *t* 検定を用いた。P<0.05 の時、有意に差があると定義した。

10) 試薬

その他の試薬は、下記の通りに購入した。

- PF-573228 (FAK inhibitor): Cayman Chemical
- Arg-Gly-Asp (RGD peptide): Merck KGaA
- 抗 Integrin α_v 中和抗体 (#ab16821; Mouse monoclonal IgG1): Abcam
- 抗 Integrin β_1 中和抗体 (#ab24693; Mouse monoclonal IgG1): Abcam
- 抗 E-cadherin 中和抗体 (#ab11512; Rat monoclonal IgG1): Abcam

第3章 ErbB4 がヒト乳がん細胞の血管擬態形成に与える影響の解析

第2章において、ITGB1 が血管擬態 (VM) 形成に必要であることが示された。この結果から、VM 形成における細胞表面受容体の重要性が示唆されたが、がん細胞表面に高発現する増殖因子受容体と VM の関係は明らかになっていない。本章では、その増殖因子受容体としてよく知られている ErbB ファミリーに注目した。特に、がん種によって多様な働きを持つ ErbB4 に焦点を当て、VM 形成との関与を評価した。

第1節 ヒト乳がん細胞株における ErbB4 発現量と血管擬態形成能

ヒト乳がん細胞は VM 形成の報告例が多数あり、また、ErbB 受容体を発現している細胞が多く存在する。そこで本章では、ヒト乳がん細胞株を用いて ErbB4 と VM 形成の関係を調べた。はじめに、よく用いられるヒト乳がん細胞株である MCF-7、MDA-MB-231、T47D 細胞における内在的な ErbB4 の発現量を western blot により評価した。その結果、MCF-7 および T47D 細胞では内在的に ErbB4 が高発現していたが、MDA-MB-231 細胞では ErbB4 の発現が検出されなかった (Figure 3-1A)。これらの細胞をマトリゲル上に播種して VM 形成能を評価した結果、MDA-MB-231 細胞は VM 形成能が高く、MCF-7 および T47D 細胞では VM 形成能が低かった (Figure 3-1B)。これらの結果から、ErbB4 の高発現が VM 形成を負に制御する可能性が示唆された。

ErbB4 が VM 形成を負に制御するか否かを調べるため、MDA-MB-231 (ErbB4-negative) および T47D (ErbB4-positive) の両細胞を用いて実験を行った。ErbB4 は ErbB4 自身もしくは他の ErbB 受容体と二量体を形成するため、両細胞における ErbB 受容体の内在的な発現量を確認した。その結果、MDA-MB-231 細胞では EGFR が高発現しており、T47D 細胞では ErbB3 が高発現していた (Figure 3-2)。そのため、MDA-MB-231 細胞では EGFR が、T47D 細胞では ErbB3 が ErbB4 とのヘテロ二量体形成に寄与することが示唆された。

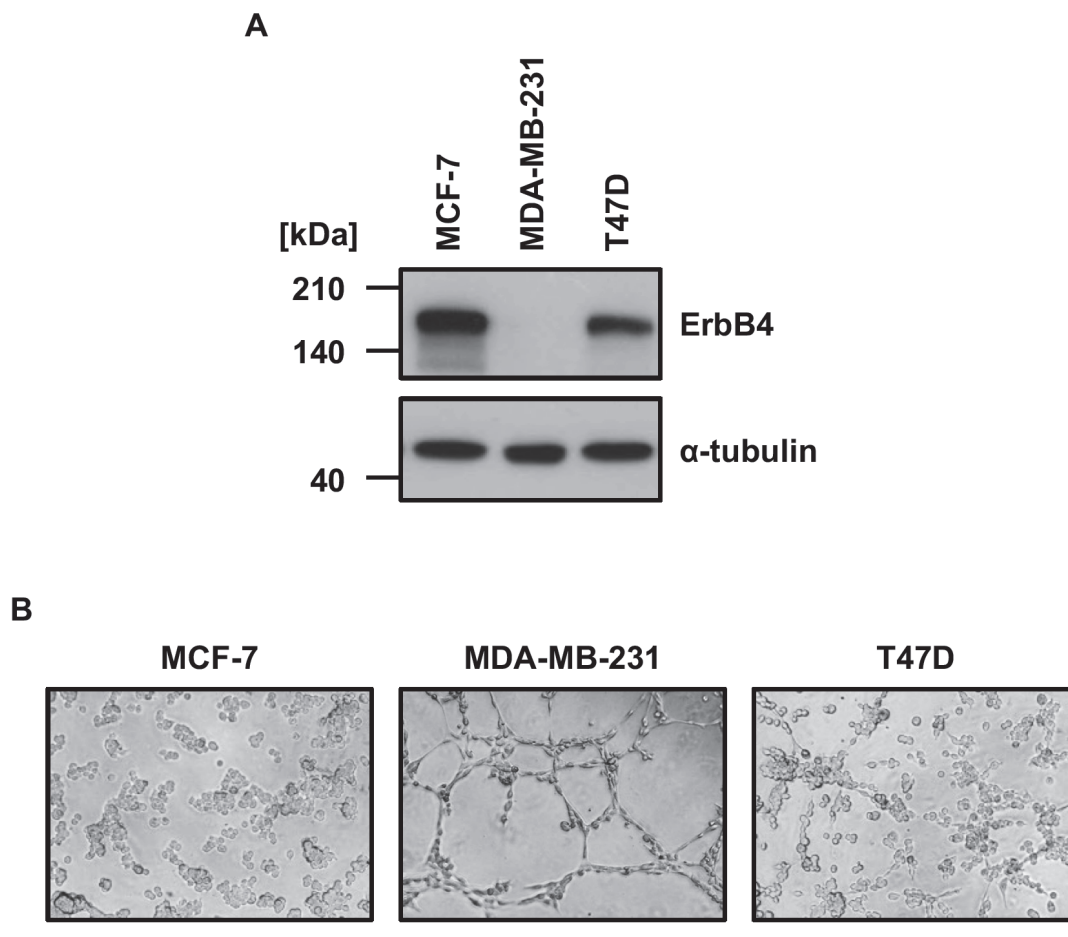


Figure 3-1. The endogenous expression of ErbB4 correlates with the VM-negative phenotype in human breast cancer cell lines.

(A) MCF-7, MDA-MB-231, and T47D cells were lysed and western blot was performed. (B) Cells were suspended in serum-free medium and subsequently seeded onto the Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (3 hours after seeding). Bar, 100 μ m.

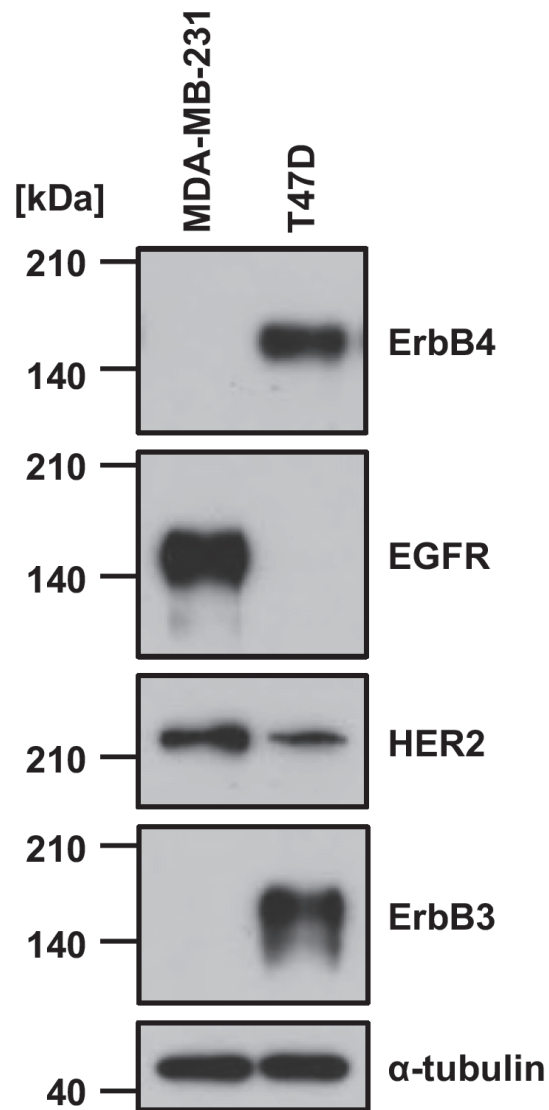


Figure 3-2. The endogenous expression of ErbB receptors in MDA-MB-231 and T47D cells.

MDA-MB-231 and T47D cells were lysed and western blot was performed.

第2節 ErbB4 の発現と血管擬態形成

1) MDA-MB-231 細胞における ErbB4 の過剰発現と血管擬態形成

内在的に ErbB4 を発現していない MDA-MB-231 細胞において、ErbB4 を過剰発現させた時の VM 形成を評価した。ErbB4 発現ベクターを作製し、MDA-MB-231 に遺伝子導入することで、ErbB4 過剰発現細胞を樹立した (Figure 3-3A)。その細胞を用いて VM 形成能を評価した結果、コントロールの Neo では細胞播種後 2 時間ほどで VM 形成が見られ、その後も時間依存的に VM を示すチューブ数が増加したのに対して、ErbB4 過剰発現細胞ではその形成が著しく遅くなった (Figure 3-3B,C)。しかし、ErbB4 の過剰発現によって完全には VM 形成が阻害されなかったことから、ErbB4 は VM 形成の初期段階においてその形成を負に制御することが示唆された。

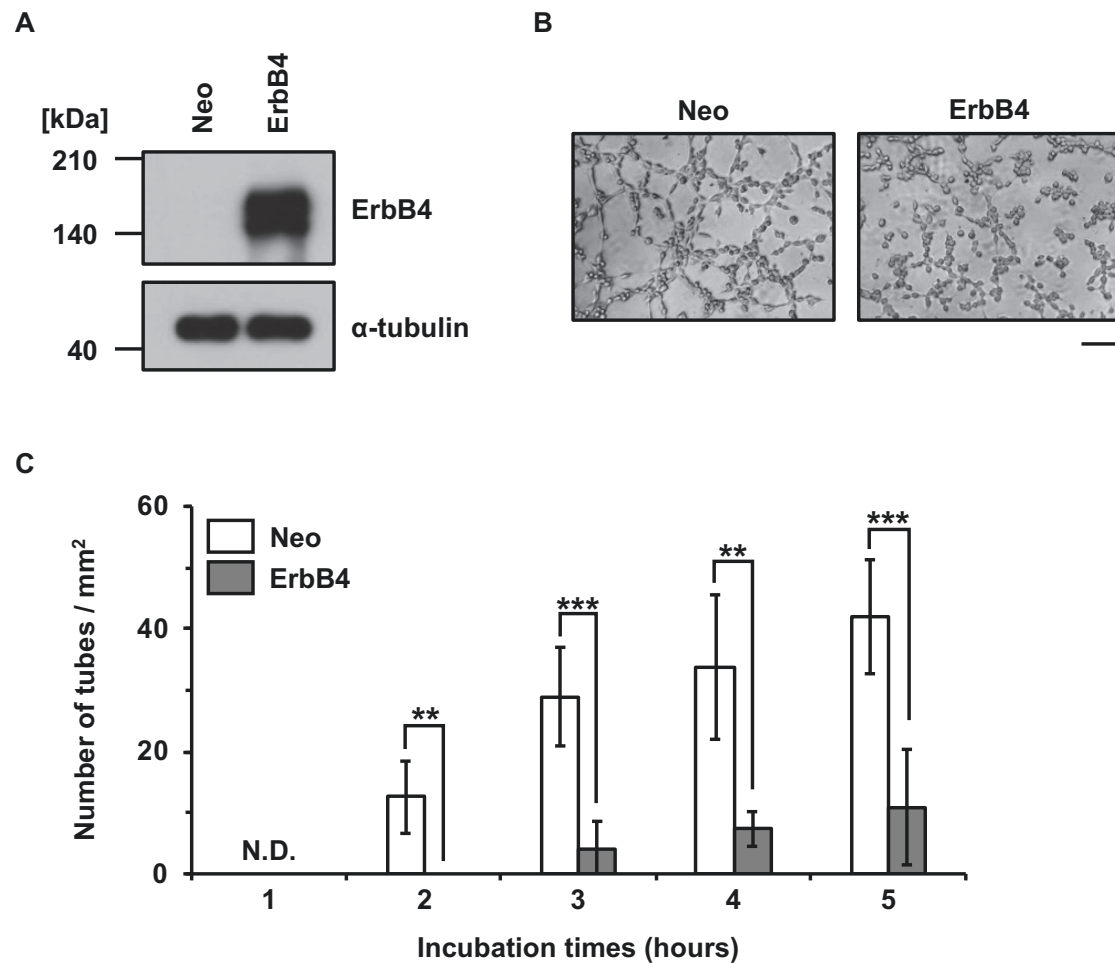


Figure 3-3. Overexpression of ErbB4 delays VM formation in MDA-MB-231 cells.

(A) MDA-MB-231 cells stably overexpressing ErbB4 were established, and the expression of the protein was confirmed by western blot. The pCI-neo empty vector (Neo) was used as a control. (B) Cells were suspended in serum-free medium and subsequently seeded onto the Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (3 hours after seeding). (C) VM formation was quantified every hour after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. *P* values <0.01 and <0.001 are indicated by ** and ***, respectively. N.D., not detected.

2) T47D および MCF-7 細胞における ErbB4 のノックアウトと血管擬態形成

Figure 3-4 より、ErbB4 の過剰発現が MDA-MB-231 細胞の VM 形成を抑制することが示された。そこで、内在的に高発現している ErbB4 をノックアウト (KO) し、その細胞の VM 形成能が向上するか否かを確かめた。T47D 細胞において、CRISPR/Cas9 システムにより ErbB4 をノックアウト (KO) した細胞株を樹立し (Figure 3-4A)、VM 形成を評価した結果、ErbB4 の KO によりその形成が促進した (Figure 3-4B,C)。また、T47D 細胞と同様に ErbB4 を高発現している MCF-7 細胞においても、CRISPR/Cas9 により ErbB4 を KO した結果 (Figure 3-5A)、VM 形成能が著しく上昇した (Figure 3-5B)。MCF-7 細胞の親株は、24 時間以上培養してもネットワーク構造が全く見られないほど VM 形成能が低い細胞であるため、MCF-7 細胞における ErbB4 の VM 抑制効果は非常に大きいと考えられる。

3) ErbB4-KO T47D 細胞における ErbB4 の再発現と血管擬態形成

T47D および MCF-7 細胞において、ErbB4 を KO すると VM 形成が促進したが、CRISPR/Cas9 システムにはオフターゲットのリスクがある。そこで、ErbB4 を KO 細胞に ErbB4 を再発現させることで、この VM 促進効果が本当に ErbB4 の欠損によるものか否かを確かめた。その結果、ErbB4 の再発現により VM 形成は抑制された (Figure 3-6)。したがって、ErbB4-KO T47D 細胞における VM 形成の促進は確かに ErbB4 の欠損によるものであり、内在性 ErbB4 の欠損は VM 形成を促進させることが示された。

これらの結果をまとめると、ヒト乳がん細胞において、ErbB4 は VM 形成を負に制御することが示された。

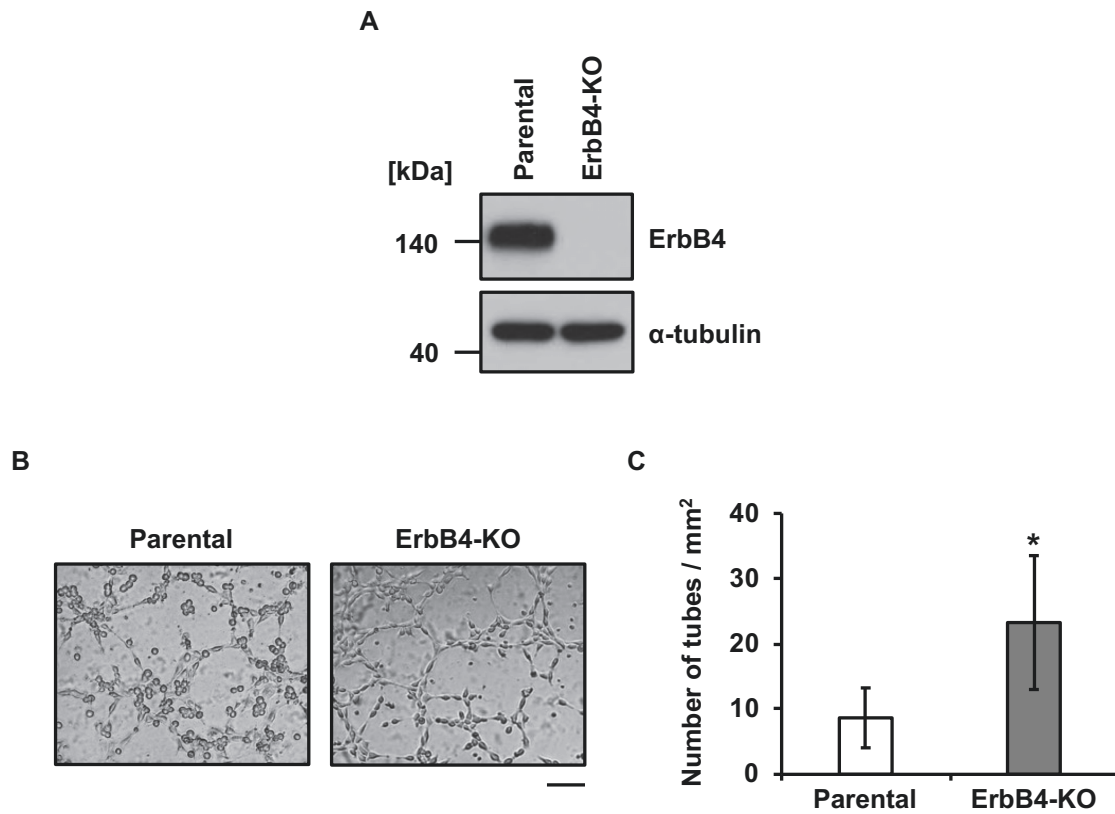


Figure 3-4. KO of ErbB4 promotes VM formation in T47D cells.

(A) ErbB4-knockout (ErbB4-KO) T47D cell lines were established by CRISPR/Cas9 system, and depletion of the ErbB4 protein was confirmed by western blot. (B) Cells were suspended in serum-free medium and subsequently seeded onto the Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (3 hours after seeding). (C) VM formation was quantified at 3 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. *P* value <0.05 is indicated by *.

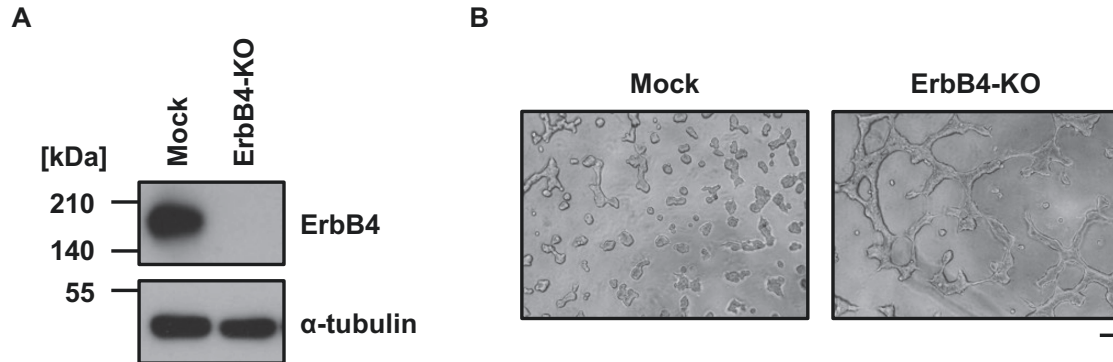


Figure 3-5. KO of ErbB4 promotes VM formation in MCF-7 cells.

(A) ErbB4-knockout (ErbB4-KO) MCF-7 cell lines were established by CRISPR/Cas9 system, and depletion of the ErbB4 protein was confirmed by western blot. Mock cells were generated by transfection with pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0 empty vector. (B) Cells were suspended in serum-free medium and subsequently seeded onto the Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (5 hours after seeding). Bar, 100 μ m.

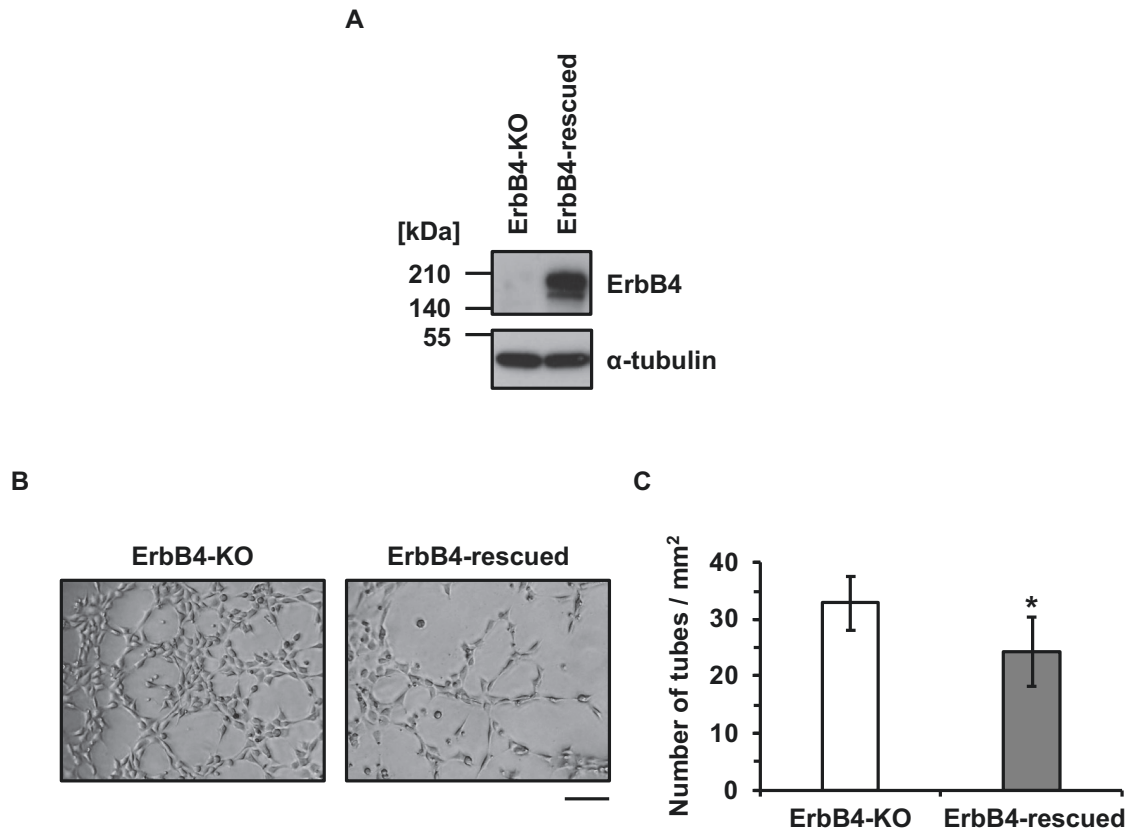


Figure 3-6. Reexpression of ErbB4 attenuates VM formation in ErbB4-KO T47D cells.

(A) ErbB4-KO T47D cells were transfected with the ErbB4-expression vector, and ErbB4-rescued T47D cell lines were established. The rescue of the ErbB4 protein was confirmed by western blot. (B) Cells were suspended and seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (3 hours after seeding). (C) VM formation was quantified at 3 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. *P* value <0.05 is indicated by *.

第3節 ErbB4 と細胞内シグナル伝達

ErbB4 は細胞表面に発現し、細胞外のリガンドと結合することで多様な細胞内シグナル伝達を活性化させる。そのシグナル伝達の中でも、PI3K/Akt および MAPK 経路は ErbB 受容体により活性化される代表的なシグナルである[62]。そこで第3節では、MDA-MB-231 および T47D 細胞において、ErbB4 の発現がこれらのシグナル伝達をどのように調節するかを評価し、VM 形成を制御する経路を調べることにした。

1) MDA-MB-231 細胞における ErbB4 の過剰発現とシグナル伝達

MDA-MB-231 細胞において、ErbB4 を過剰発現させると VM 形成が抑制された。そのため、ErbB4 の過剰発現が何らかのシグナル伝達を負に制御すると考えられる。そこで、western blot により PI3K/Akt、MAPK (Erk1/2) シグナル伝達の活性化状態を評価した結果、ErbB4 を過剰発現させても大きな差は見られなかった。そのため MDA-MB-231 細胞において、ErbB4 の発現自体はこれらのシグナル伝達にほとんど影響を与えないことが示唆された。

第2章において、FAK の活性化は VM 形成と相関することが示唆された。そこで PI3K/Akt および MAPK に加えて、FAK の Y397 のリン酸化を評価した結果、ErbB4 の過剰発現により FAK のリン酸化が抑制された (Figure 3-7)。従って、VM 形成が負に抑制される際に FAK の活性化が弱められることが示唆された。

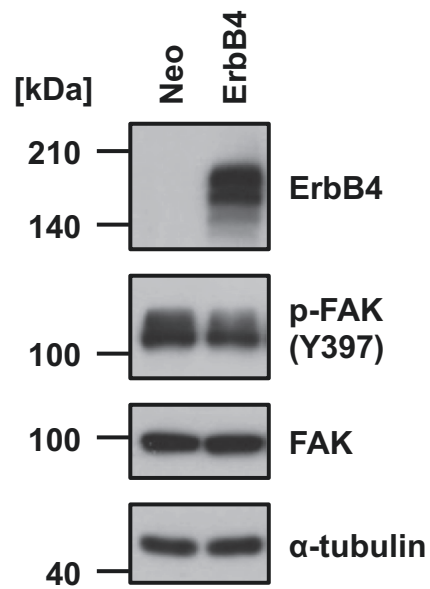


Figure 3-7. FAK signaling was attenuated by ErbB4 overexpression in MDA-MB-231 cells.

Neo and ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were lysed and western blot was performed.

2) T47D 細胞における ErbB4 の KO とシグナル伝達

T47D 細胞において、ErbB4 を KO すると VM 形成が促進した (Figure 3-4)。そのため、ErbB4 の欠損が何らかのシグナル伝達を活性化させると考えられる。そこで、western blot により PI3K/Akt、MAPK、FAK シグナルの活性化状態を評価した (Figure 3-8)。Akt に関しては、ErbB4 の KO により total の Akt 発現量は増加したが、リン酸化レベルには変化がなかった。また、MAPK シグナルについては、ErbB4 の KO により p-Erk1/2 発現量が低下した。さらに、ErbB4 の KO によって FAK のリン酸化レベルが上昇した。すなわち、Figure 3-7 と同様に VM 形成と FAK の活性化に正の相関が見られた。

続いて、ErbB4-KO 細胞に ErbB4 を再発現させた際のシグナル伝達を評価した (Figure 3-9)。ErbB4 の再発現によって VM 形成が抑制されたことから、負に制御されたシグナルが存在すると考えられる。結果として、total Akt の発現量は ErbB4 の再発現により低下したが、p-Akt 量に差は見られなかった。MAPK シグナルに関しては、ErbB4 の再発現により Erk1/2 のリン酸化レベルが上昇した。一方で、FAK シグナルは ErbB4 の KO により上昇したが、ErbB4 の再発現によって低下はしなかった。

従って、T47D 細胞において ErbB4 は Akt の発現を負に制御しているが、リン酸化 Akt 量には変化がなかった。また、ErbB4 は MAPK シグナルを活性化させた。さらに、FAK シグナルは必ずしも ErbB4 依存的に活性化状態が制御されるわけではなかった。

これらの結果をまとめると、ErbB4 の発現は細胞種によって PI3K/Akt および MAPK 経路に影響を与えることが示唆された。また、VM 形成能が高い細胞では FAK の活性化が見られるが、必ずしもその活性化は VM 形成に必要ではないことが示唆された。

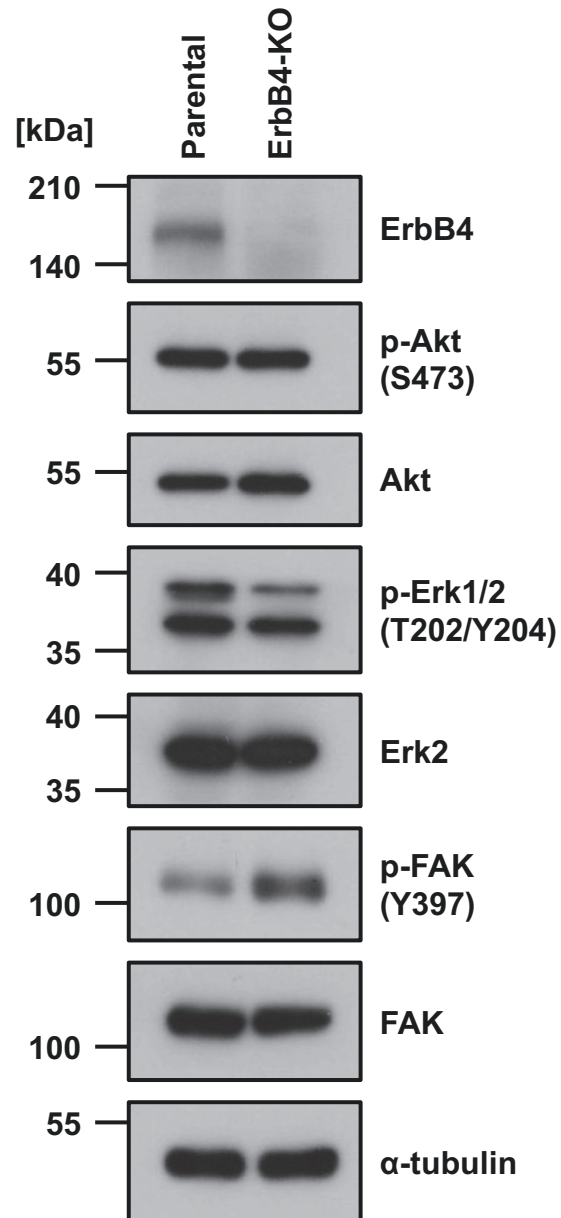


Figure 3-8. KO of ErbB4 activates FAK signaling in T47D cells.

Parental and ErbB4-KO T47D cells were lysed and western blot was performed.

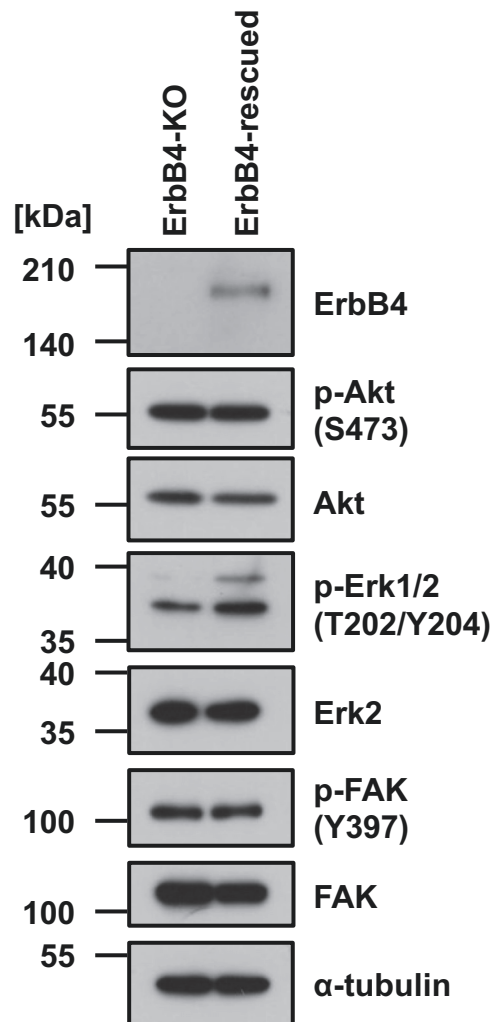


Figure 3-9. Reexpression of ErbB4 does not suppress FAK signaling in ErbB4-KO T47D cells.

ErbB4-KO and ErbB4-rescued T47D cells were lysed and western blot was performed.

第4節 ホルモン受容体と血管擬態形成

ヒト乳がんは、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER)、プロゲステロン受容体 (progesterone receptor: PR) および HER2 の発現量によって大別され、Table 3-1 によく用いられる乳がん細胞株の分類を示した[75]。本研究において MCF-7 および T47D 細胞を用いているが、これらはいずれもホルモン受容体陽性、すなわち ER⁺かつ PR⁺ で luminal A 型の乳がん細胞として知られている。そこで、これらホルモン受容体の下流シグナルが VM 形成に影響を与えるか否かを調べた。まず、MCF-7 細胞に ER アンタゴニストである fulvestrant、PR アンタゴニストである mifepristone をそれぞれ 3 μ M で処理した結果、いずれも MCF-7 細胞に影響を与えず、VM 形成は起こらなかった (Figure 3-10)。また、T47D 細胞においても同様に各アンタゴニストを処理した結果、fulvestrant 処理によって VM 形成は抑制され、mifepristone はほとんど影響を与えなかった (Figure 3-11)。

以上の結果をまとめると、MCF-7 細胞は VM 形成能を有していないが、その原因は ER および PR ではなかった。また、T47D 細胞において、PR ではなく ER が VM 形成を促進させた。いずれの結果においても顕著な差は見られず、ER および PR は VM 形成において重要な因子ではないことが示唆された。

Table 3-1. Subtype of human breast cancer cell lines [75].

Cell lines	ER	PR	HER2	Subtype
MCF-7	+	+	–	Luminal A
T47D	+	+	–	Luminal A
BT474	+	+	+	Luminal B
SKBR3	–	–	+	HER2
MDA-MB-231	–	–	–	Triple negative

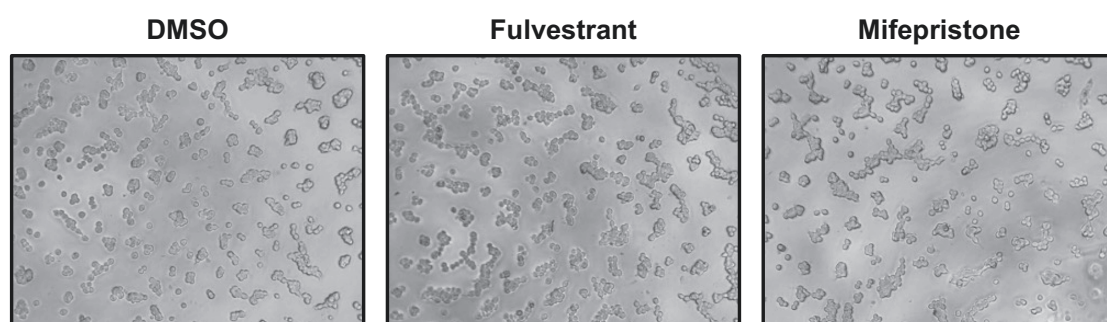


Figure 3-10. Antagonists of hormone receptors does not affect VM formation in MCF-7 cells.

MCF-7 cells were suspended and treated with DMSO, 3 μ M fulvestrant, or 3 μ M mifepristone. Then the cells were seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (5 hours after seeding). Bar, 100 μ m.

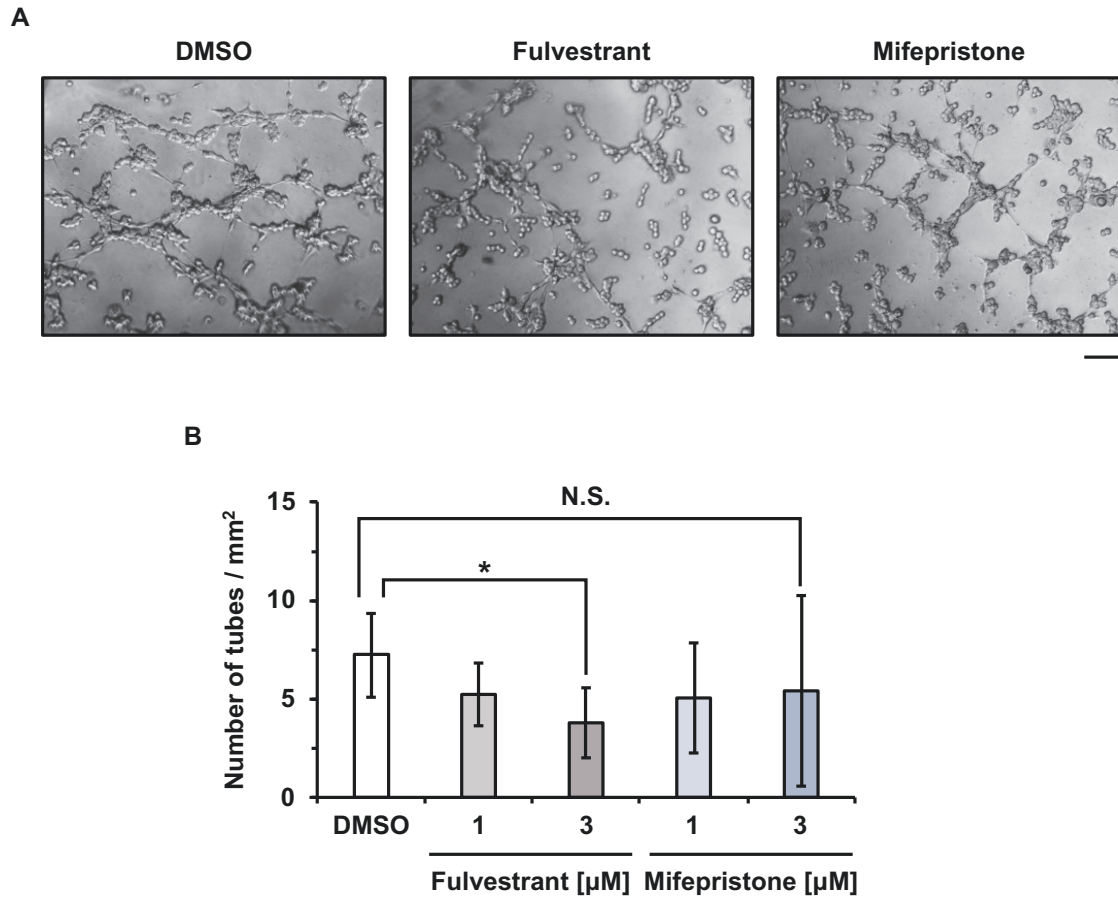


Figure 3-11. An estrogen receptor antagonist suppresses VM formation in T47D cells.

(A) T47D cells were suspended and treated with DMSO, fulvestrant (1 or 3 μM), or mifepristone (1 or 3 μM). Then the cells were seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images (3 μM treatment) of VM formation were shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μm . Data shown are means \pm SD. *P* value <0.05 is indicated by *. N.S., not significant.

第5節 Neuregulin 1 による ErbB4 の活性化と血管擬態形成

第2節で ErbB4 の発現が VM 形成を負に制御することが明らかになった。しかし、ErbB4 はリガンド非存在下では二量体化および自己リン酸化せず、「不活性化型」である。そこで、第5節では ErbB4 のリガンドとして知られる neuregulin 1 (NRG1) を細胞に処理し[76]、ErbB4 を活性化させた時に VM 形成がどのように変化するかを評価した。

1) 活性化型および不活性化型 ErbB4 過剰発現細胞の樹立

MDA-MB-231 細胞において、ErbB4 を過剰発現させた株における NRG1 の効果を評価することにした。その効果をより確実に評価するため、野生型の ErbB4 (ErbB4/wt) に加えて、後述する恒常的活性化型の E872K 変異型 ErbB4 (ErbB4/E872K)、キナーゼ活性を失わせた K751M 変異型 ErbB4 (ErbB4/K751M) をそれぞれ発現させた細胞株を樹立した (Figure 3-12)。

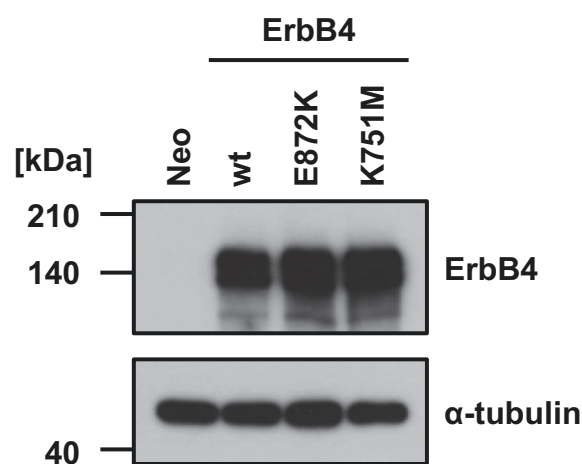


Figure 3-12. Establishment of wild-type or mutant ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cell lines.

MDA-MB-231 cells stably overexpressing wild-type (wt), E872K, or K751M ErbB4 were established, and the expression of the protein was confirmed by western blot. The pCI-neo empty vector (Neo) was used as a control.

2) 野生型およびキナーゼ不活性型 ErbB4 における NRG1 の処理と血管擬態形成

初めに、ErbB4 の活性化を誘導する条件を調べるため、ErbB4/wt および ErbB4/K751M を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞を用いて検討した。無血清培地中で各細胞に対して 100 ng/mL の NRG1 を 30 分間処理した結果、ErbB4/wt はリン酸化されたが、ErbB4/K751M では ErbB4 の ATP 結合ドメインが変異しているため、自己リン酸化は起こらなかった (Figure 3-13)。よって、100 ng/mL の NRG1 で ErbB4 の活性化を誘導できることが示された。そこで、この条件で NRG1 を処理した際の各細胞の VM 形成を評価した結果、ErbB4/wt 過剰発現細胞では NRG1 処理によって VM 形成が有意に促進した (Figure 3-14A,B)。一方、ErbB4/K751M 過剰発現細胞では NRG1 によって VM 形成は強められず、逆に形成が抑制される傾向にあった (Figure 3-14C,D)。そのため、NRG1 は ErbB4 のキナーゼ活性依存的に VM 形成を強め、ErbB4/K751M は NRG1 によってドミナントネガティブに働くことが示唆された。

以上の結果から、NRG1 が VM 形成を促進させることが示されたが、それは ErbB4 非依存的に起こる可能性がある。そこで、MDA-MB-231 細胞の親株に NRG1 を処理することで、ErbB3 や ErbB4 など NRG1 の受容体が発現していないにおける NRG1 の効果を確認した。その結果、MDA-MB-231 細胞の親株において、NRG1 は VM 形成に影響を与えなかった (Figure 3-15)。従って、NRG1 による VM 形成促進効果は ErbB4 依存的に起こることが示された。

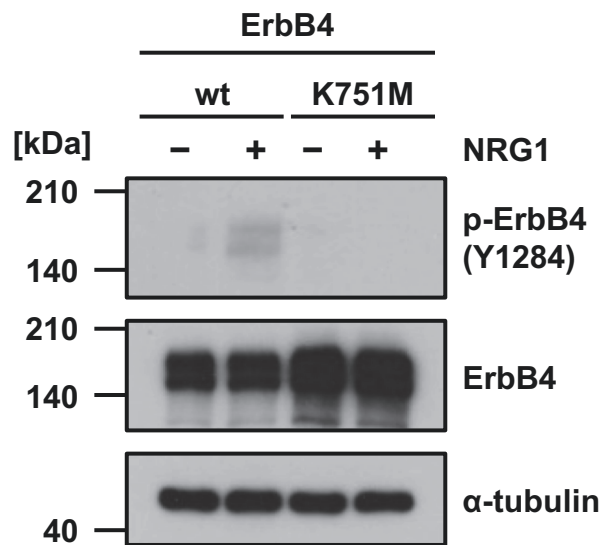


Figure 3-13. NRG1 activates ErbB4/wt in MDA-MB-231 cells.

wt or K751M ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were stimulated with vehicle control or 100 ng/mL NRG1 for 30 minutes in serum-free medium. The stimulated cells were lysed and western blot was performed.

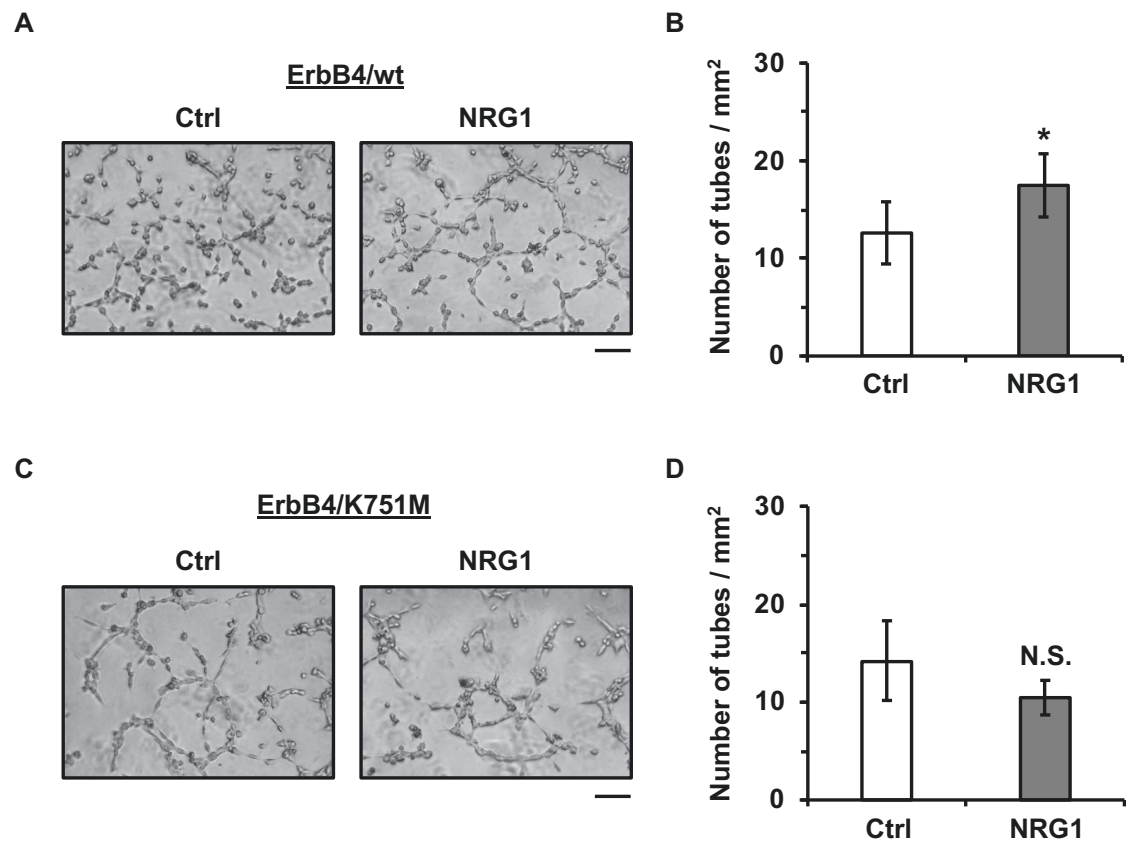


Figure 3-14. NRG1 promotes ErbB4-mediated VM formation in kinase activity-dependent manner.

(A and C) wt or K751M ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended in serum-free medium and treated with vehicle control or 100 ng/mL NRG1, then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation in wt (A) or K751M (C) ErbB4-overexpressing cells are shown (5 hours after seeding). (B and D) VM formation of wt (B) or K751M (D) ErbB4-overexpressing cells were quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Scale bars, 100 μ m. Data shown are the means \pm SD. *P* value <0.05 is indicated by *. N.S., not significant.

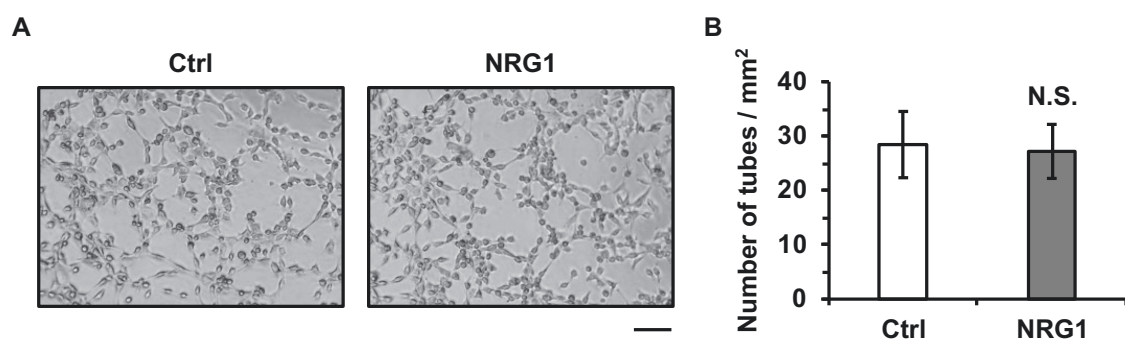


Figure 3-15. NRG1 does not affect VM formation in MDA-MB-231 cells.

(A) MDA-MB-231 cells were suspended and treated with 100 ng/mL NRG1, then seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (3 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 3 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.S., not significant.

3) E872K 変異型 ErbB4 における NRG1 処理と血管擬態形成

NRG1 による ErbB4 の活性化は VM 形成を促進させたため、活性化した ErbB4 は VM 形成を正に制御することが示唆された。そこで、実際のがん患者において報告例が複数ある ErbB4 の E872K 変異に注目した。E872K 変異は ErbB4 の細胞内チロシンキナーゼドメインで、2,614 番目のグアニンがアラニンに置換することで起こるミスセンス変異である (Figure 3-16A) [64,65]。この E872K 変異は ErbB4 のキナーゼ活性を強めることが示唆されているため[65]、ErbB4/wt と比較して、VM 形成をより促進させる変異なのではないかと考えた。その検証に当たり、western blot によって ErbB4/wt および ErbB4/E872K のリン酸化レベルを調べた結果、リガンドである NRG1 を処理しない状態 (= 0 ng/mL) で ErbB4/E872K は強くリン酸化されることが明らかになった (Figure 3-16B)。次に、NRG1 処理時の ErbB4 のリン酸化レベルを評価した結果、ErbB4/wt では NRG1 の濃度依存的にそのリン酸化レベルが上昇したが、ErbB4/E872K では NRG1 の処理によりそのリン酸化レベルが低下した (Figure 3-16B)。同じ ErbB 受容体ファミリーである EGFR において、恒常的に活性化している EGFR にそのリガンドである EGF を処理すると EGFR の活性化が弱められるという先行研究があるため[77]、ErbB4/E872K に NRG1 を処理した時も同様に、過剰な活性化による負のフィードバックが起こったと考えられる。以上より、ErbB4 の E872K 変異はリガンド非依存的に自身のキナーゼ活性を強めており、NRG1 刺激によってその活性が弱められることが示された。

続いて両細胞における VM 形成能を評価した結果、NRG1 非存在下で、ErbB4/E872K は ErbB4/wt よりも高い VM 形成促進効果を示した (Figure 3-17)。さらに、ErbB4/wt 過剰発現細胞では NRG1 の処理濃度依存的に VM 形成能が上昇したが (Figure 3-18)、ErbB4/E872K 過剰発現細胞では NRG1 の処理濃度依存的に VM 形成が弱められた (Figure 3-19)。この結果は、Figure 3-16 で示したリン酸化 ErbB4 量の増減と相関していることから、活性化型 ErbB4 は VM 形成を促進させることが強く示唆された。

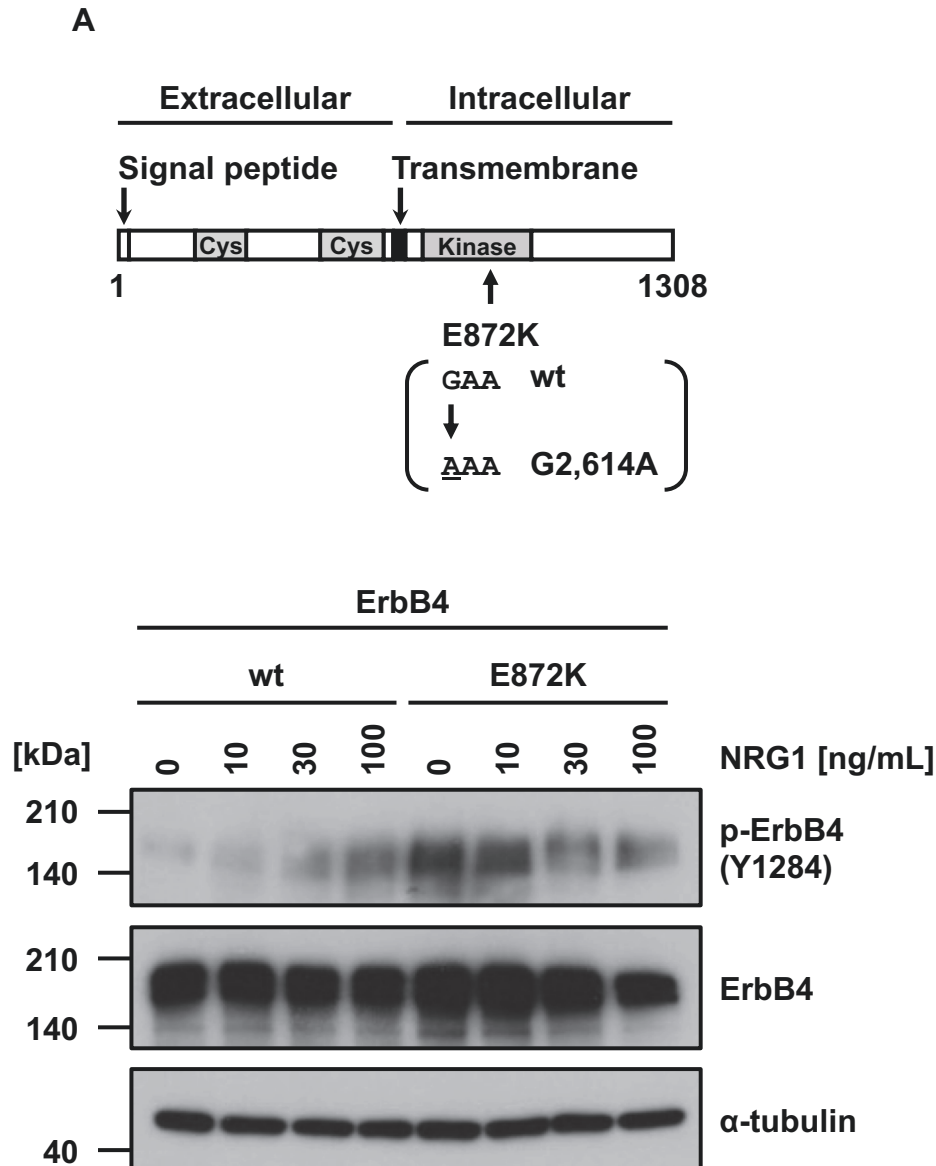


Figure 3-16. E872K mutation enhances ErbB4 phosphorylation in the absence of NRG1.

(A) A schematic diagram of the functional domain of human ErbB4. Two cysteine-rich and tyrosine kinase domains are contained in the extracellular and intracellular regions, respectively. The partial nucleotide sequences of the wt and E872K *ErbB4* are shown.

(B) wt or E872K ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were stimulated with vehicle control or NRG1 (10, 30, or 100 ng/mL) for 30 minutes in serum-free medium. The stimulated cells were lysed and western blot was performed.

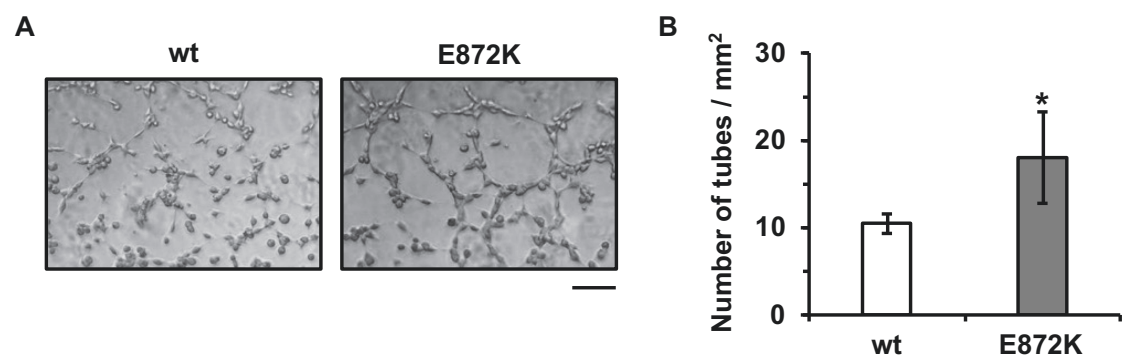


Figure 3-17. E872K mutation enhances ErbB4-mediated VM formation in the absence of NRG1.

(A) wt or E872K ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended and seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. *P* value <0.05 is indicated by *.

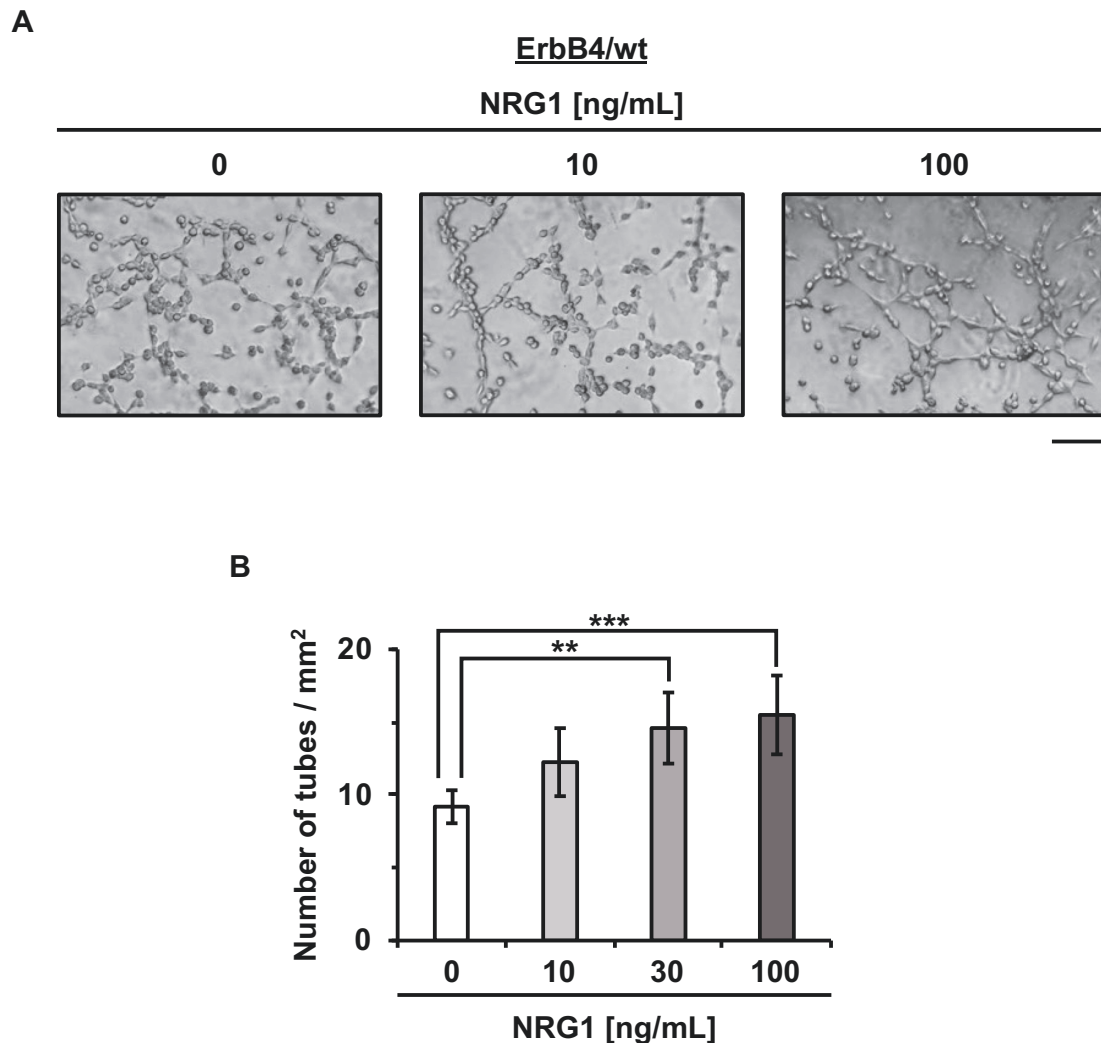


Figure 3-18. NRG1 promotes ErbB4/wt-mediated VM formation in a dose-dependent manner.

(A) ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended in serum-free medium and treated with vehicle control or NRG1 (10, 30, or 100 ng/mL), then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation are shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Scale bar, 100 μ m. Data shown are the means \pm SD. *P* values <0.01 and <0.001 are indicated by ** and ***, respectively.

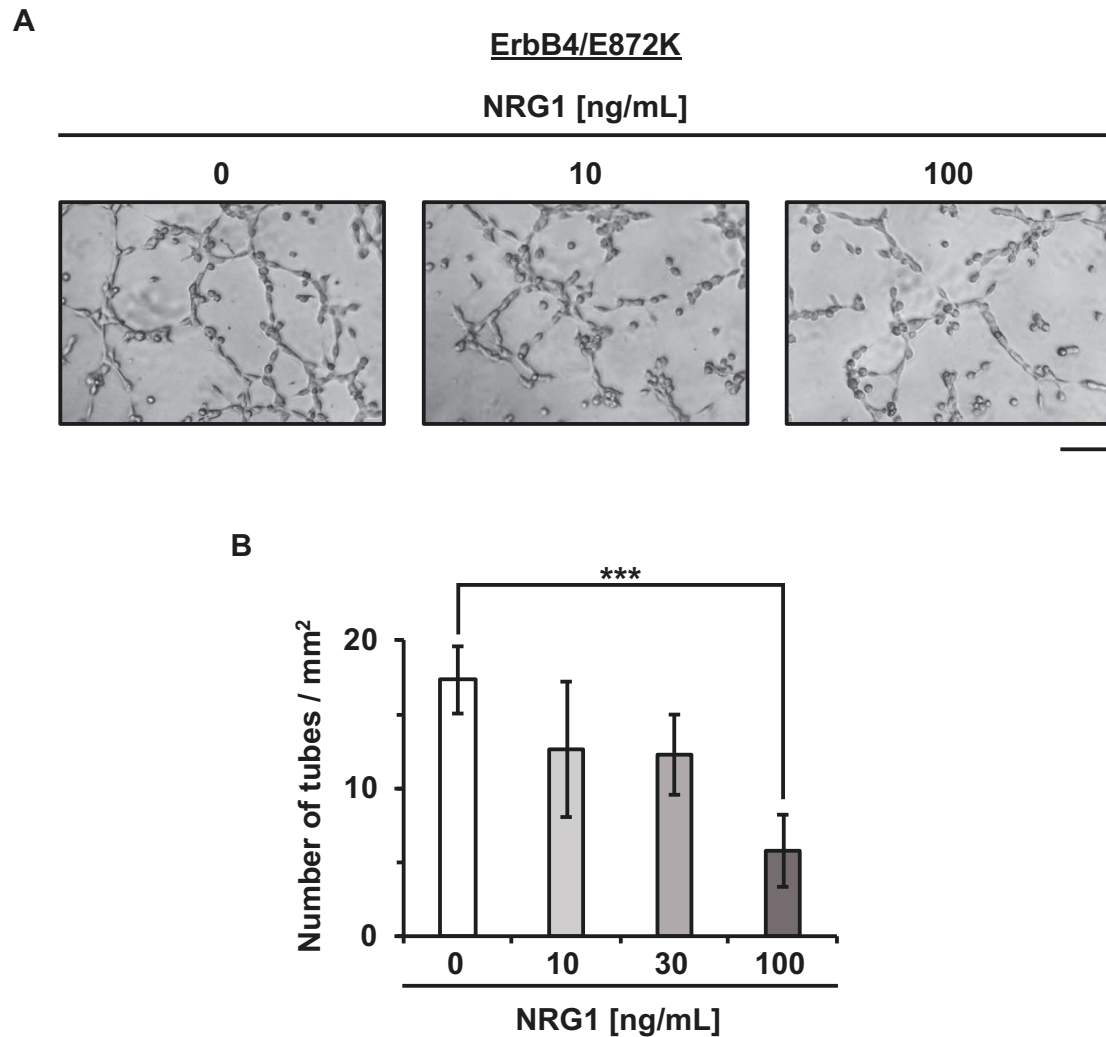


Figure 3-19. NRG1 attenuates ErbB4/E872K-mediated VM formation in a dose-dependent manner.

(A) ErbB4/E872K-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended in serum-free medium and treated with vehicle control or NRG1 (10, 30, or 100 ng/mL), then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation are shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Scale bar, 100 μ m. Data shown are the means \pm SD. *P* value < 0.001 is indicated by ***.

4) MDA-MB-231 細胞における ErbB4 の活性化と下流シグナル伝達の評価

ErbB4 の活性化が VM 形成を促進させたため、その活性化時における細胞内シグナル伝達を評価した。ErbB4/wt を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞において、NRG1 を 10 分間処理すると ErbB4 のリン酸化レベルは上昇したものの、その下流シグナルの著しい活性化は見られなかった (Figure 3-20)。一方で、ErbB4/wt と ErbB4/E872K を NRG1 非存在下で比較した結果、ErbB4/E872K 過剰発現細胞では PI3K/Akt シグナルが活性化していた (Figure 3-21)。そこで、ErbB4/wt を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞に NRG1 を処理して ErbB4 を活性化させ、PI3K 阻害剤である LY294002 を処理した結果、VM 形成が著しく阻害された (Figure 3-22)。また、ErbB4/E872K を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞においても、LY294002 は VM 形成を完全に阻害した (Figure 3-23)。従って、ErbB4 を介した VM 形成において、PI3K/Akt シグナルはその形成に寄与することが示唆された。

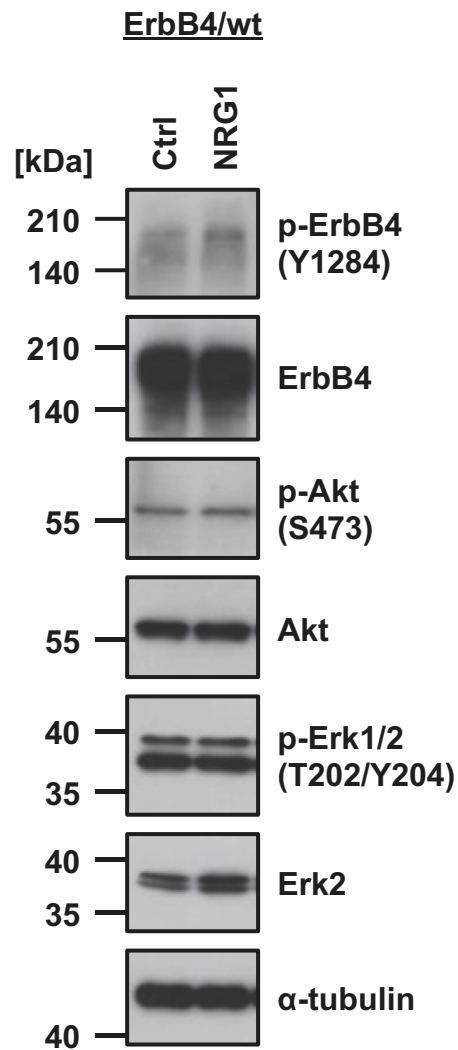


Figure 3-20. NRG1 does not activate the downstream signaling in ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells.

ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells were stimulated with vehicle control or 100 ng/mL NRG1 for 10 minutes in serum-free medium. The stimulated cells were lysed and western blot was performed.

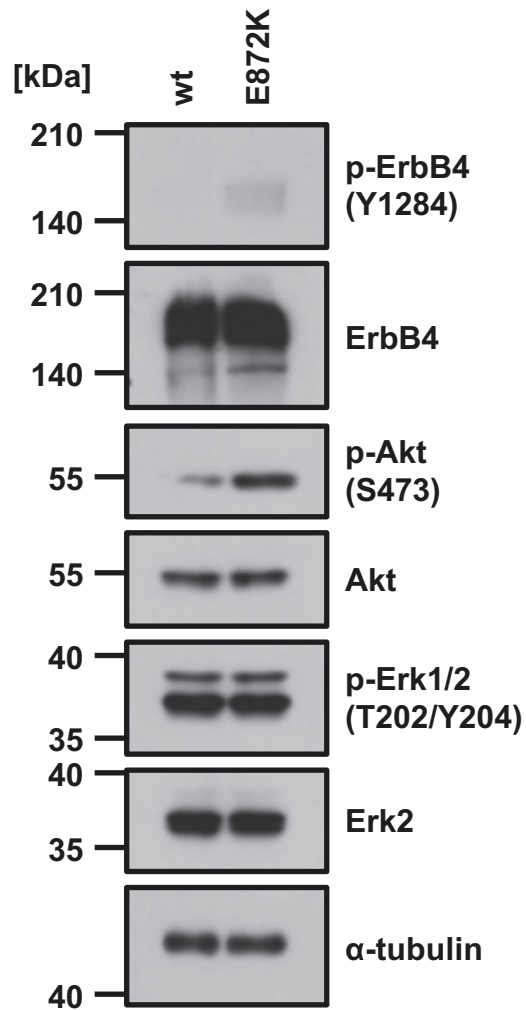
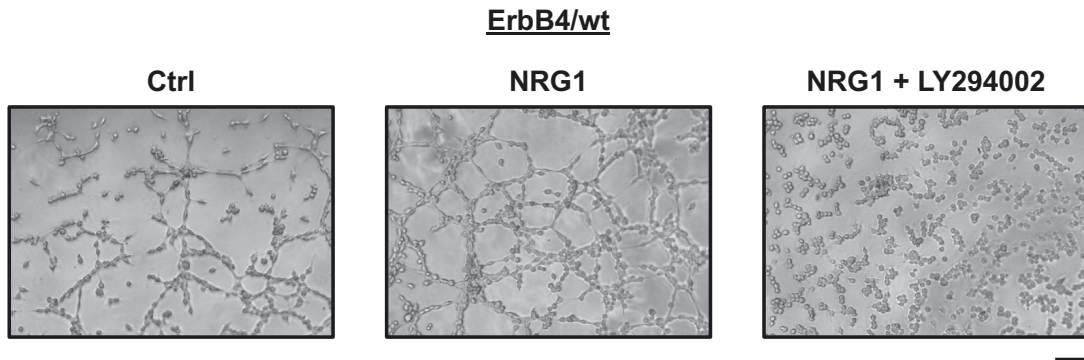


Figure 3-21. E872K mutation of ErbB4 enhances PI3K/Akt signaling in MDA-MB-231 cells.

wt or E872K ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were lysed and western blot was performed.

A



B

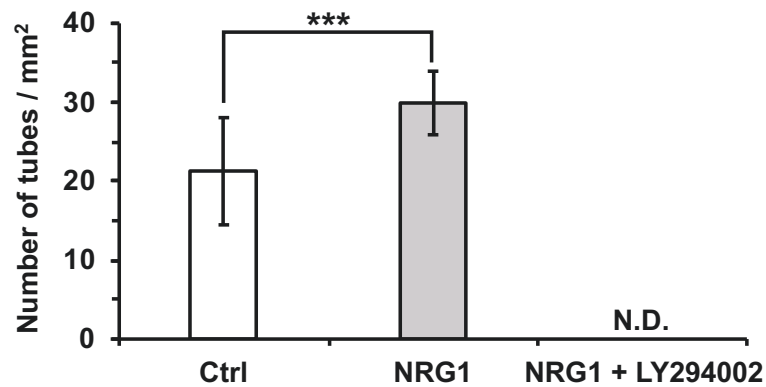
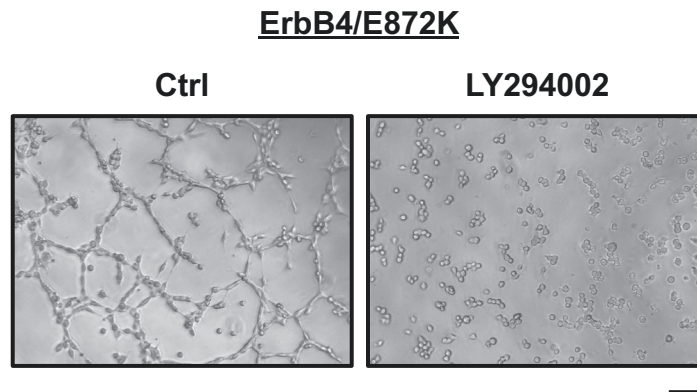


Figure 3-22. LY294002 significantly suppresses VM formation in ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells.

(A) ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended and cotreated with 100 ng/mL NRG1 and 10 μ M LY294002, then seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. *P* value <0.001 is indicated by ***. N.D., not detected.

A



B

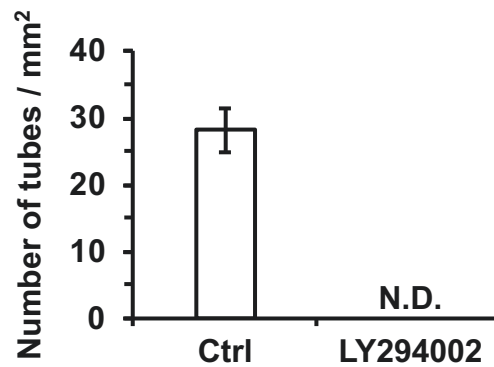


Figure 3-23. LY294002 significantly suppresses VM formation in ErbB4/E872K-overexpressing MDA-MB-231 cells.

(A) ErbB4/E872K-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended and treated with 10 μ M LY294002, then seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.D., not detected.

5) T47D 細胞における NRG1 処理と血管擬態形成

T47D 細胞を用いて、内在性の ErbB4 を活性化させた時の効果を評価した。T47D 細胞に対して 30 ng/mL の NRG1 を処理した結果、ErbB4 のリン酸化が強く誘導された (Figure 3-24A)。そこで、同条件で NRG1 を処理して VM 形成を評価した結果、T47D 細胞においても NRG1 は VM 形成を促進した (Figure 3-24B,C)。

T47D 細胞は内在的に ErbB3 を高発現しており、NRG1 は ErbB3 も活性化させることが知られている[78]。そのため、NRG1 は ErbB3 を介して VM 形成を促進させた可能性も考えられる。実際、T47D 細胞の親株に NRG1 を処理すると PI3K/Akt および MAPK シグナルが活性化すると同様に (Figure 3-25)、ErbB4-KO 株においても NRG1 はこれらのシグナル伝達を活性化させた (Figure 3-26)。しかし、NRG1 は ErbB4-KO T47D 細胞においては VM 形成を促進させなかったことから (Figure 3-27)、T47D 細胞における NRG1 の VM 促進効果は、ErbB4 を介したものであることが示された。

以上の結果をまとめると、NRG1 によるリガンド依存的な ErbB4 の活性化は、VM 形成を促進させた。また、転移性メラノーマや浸潤性乳がん患者で報告されている ErbB4 の E872K 変異は、リガンドによる刺激無しで ErbB4 を活性化させ、VM 形成を促進させる変異であった。ErbB4 の下流シグナルについては、PI3K/Akt シグナルの活性化が VM 形成と相関することが示唆された。

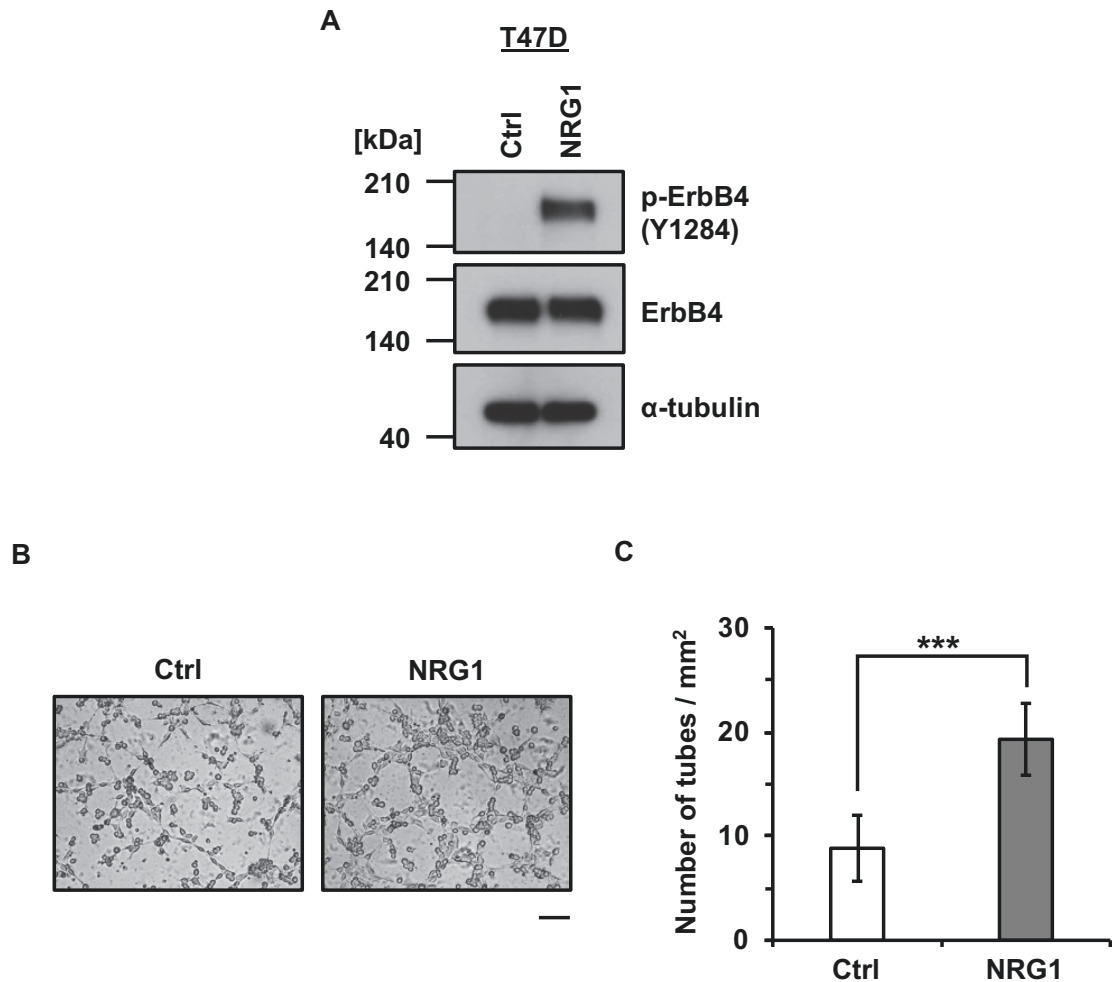


Figure 3-24. NRG1 promotes VM formation in T47D cells.

(A) T47D cells were stimulated with vehicle control or 30 ng/mL NRG1 for 30 minutes in serum-free medium. The stimulated cells were lysed and western blot was performed.

(B) T47D cells were suspended in serum-free medium and treated with vehicle control or 30 ng/mL NRG1, then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation are shown (5 hours after seeding).

(C) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Scale bar, 100 μ m. Data shown are the means \pm SD. *P* value <0.001 is indicated by ***.

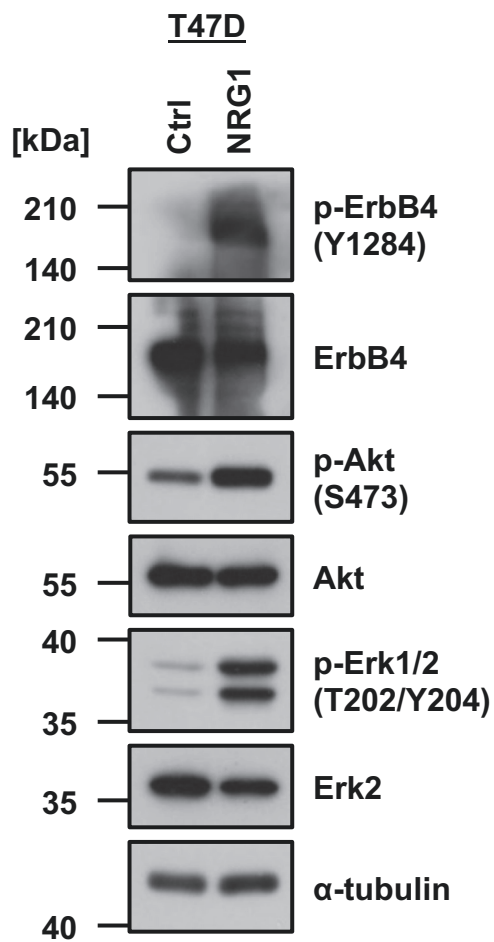


Figure 3-25. NRG1 activates ErbB4 and its downstream signaling in T47D cells.

T47D cells were stimulated with 30 ng/mL NRG1 for 10 minutes in serum-free medium, then lysed and western blot was performed.

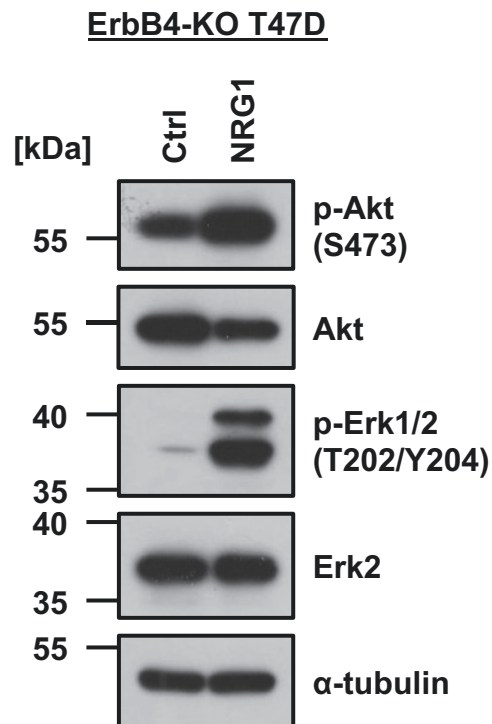


Figure 3-26. NRG1 activates intracellular signaling in ErbB4-KO T47D cells.

ErbB4-KO T47D cells were stimulated with 30 ng/mL NRG1 for 10 minutes in serum-free medium, then lysed and western blot was performed.

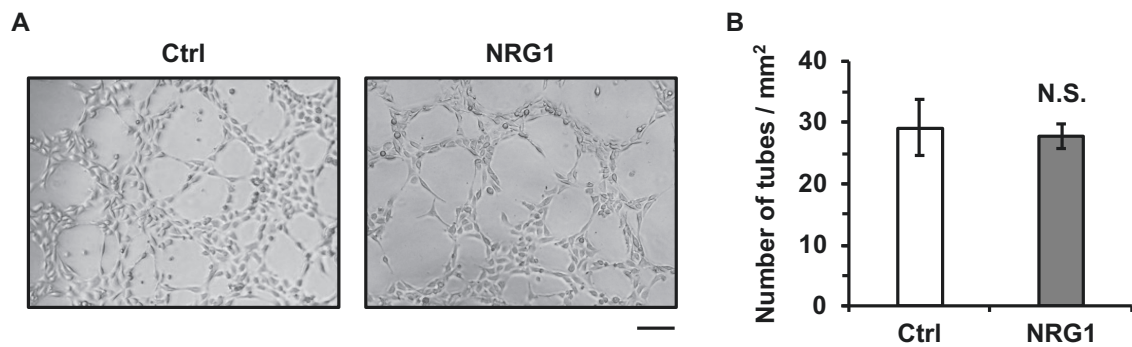


Figure 3-27. NRG1 does not promote VM formation in ErbB4-KO T47D cells.

(A) ErbB4-KO T47D cells were suspended and treated with 30 ng/mL NRG1, then seeded on Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation were shown (3 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 3 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μ m. Data shown are means \pm SD. N.S., not significant.

第6節 Afatinib 処理と血管擬態形成

第5節の結果から、活性化した ErbB4 は VM 形成を促進させることで、がんの悪性化に寄与することが考えられる。これまでに、EGFR や HER2 などの ErbB 受容体を標的とした低分子阻害剤が開発され用いられてきたが、VM 陽性がんにおけるその治療効果は知られていない。そこで、pan ErbB 阻害剤として知られる afatinib を用いて、ErbB4 を介した VM 形成が低分子化合物により抑制されるか否かを評価した。

1) ErbB4 非依存的な VM 形成における afatinib 処理

MDA-MB-231 細胞の親株は、ErbB4 は発現していないが afatinib の標的である EGFR は発現している (Figure 3-2)。そこで初めに、ErbB4 非依存的な VM 形成における afatinib の抑制効果を評価した。その結果、MDA-MB-231 細胞の親株において afatinib の濃度 1 μ M までは VM 抑制効果が見られず、3 μ M で有意に VM 形成を抑制した (Figure 3-28)。そして、10 μ M の afatinib 処理で VM 形成は完全に抑制された。従って、afatinib は ErbB4 非依存的な VM 形成を抑制することが示された。

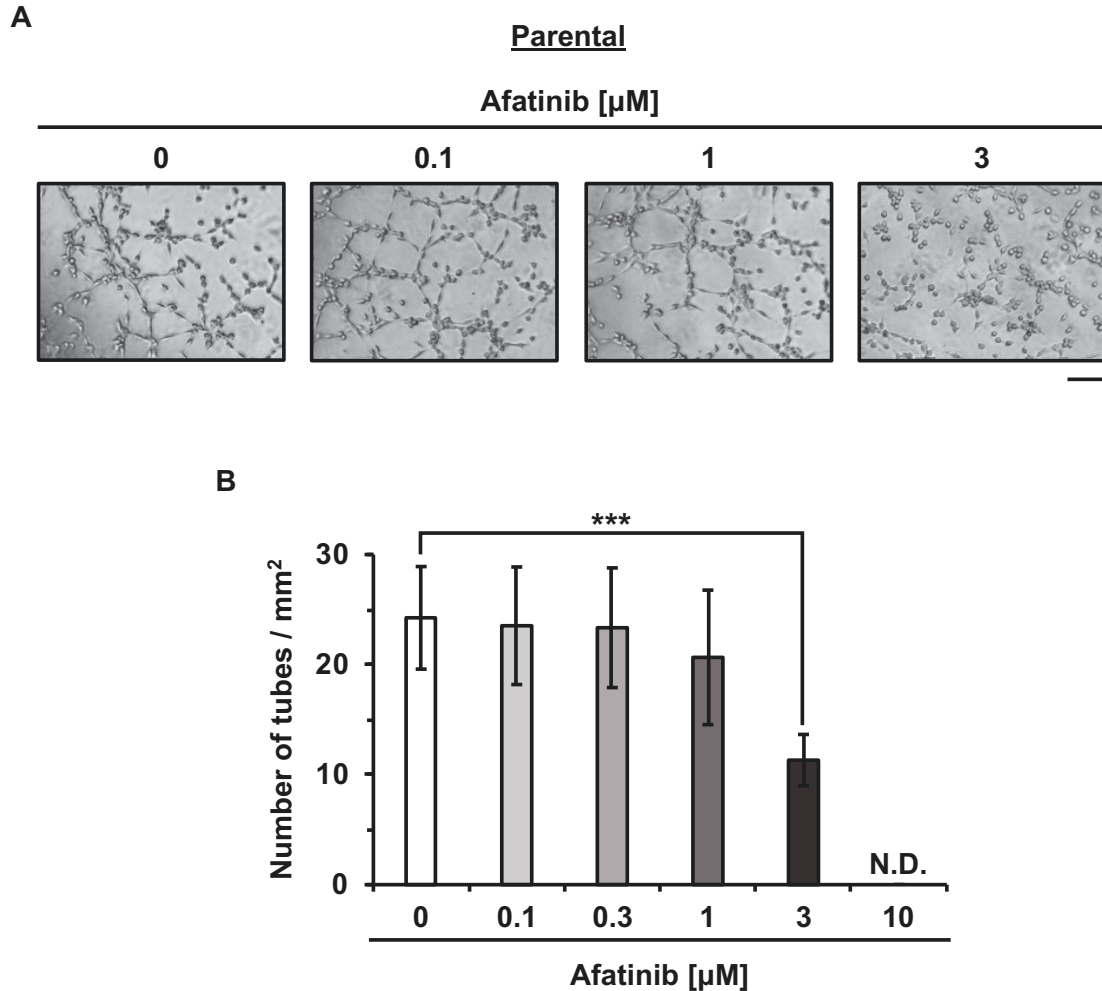


Figure 3-28. VM formation of MDA-MB-231 cells is suppressed by 3 μM afatinib treatment.

(A) MDA-MB-231 cells were suspended in serum-free medium and treated with dimethyl sulfoxide or afatinib (0.1, 0.3, 1, 3, or 10 μM), then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation are shown (3 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 3 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μm . Data shown are means \pm SD. P value <0.001 is indicated by ***. N.S., not significant.

2) ErbB4 を介した血管擬態形成における afatinib 処理

次に、ErbB4 を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞において、afatinib を処理した時の VM 形成を評価した。なお、ErbB4/wt を過剰発現させた細胞においては、NRG1 処理により VM 形成を促進させ、その時の afatinib による VM 阻害効果を検証した。その結果、ErbB4/wt 過剰発現細胞では親株と同様に、3 μ M で有意に VM 形成を抑制した (Figure 3-29)。一方で、ErbB4/E872K 過剰発現細胞では、0.1 μ M の afatinib 処理で著しく VM 形成が抑制された (Figure 3-30)。また、ErbB4/wt および ErbB4/E872K は、各々の過剰発現細胞の VM 形成が抑制された濃度の afatinib 処理により、そのリン酸化が著しく抑制された (Figure 3-31)。従って、E872K 変異は ErbB4 のリン酸化が誘導されやすく、かつ afatinib による VM 阻害効果を受けやすいことが明らかになった。

これらの結果から、既存のチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) が VM 形成の抑制に有効であることを示され、また、ErbB4 の恒常的活性化型変異は TKI の標的として有望であることが示唆された。

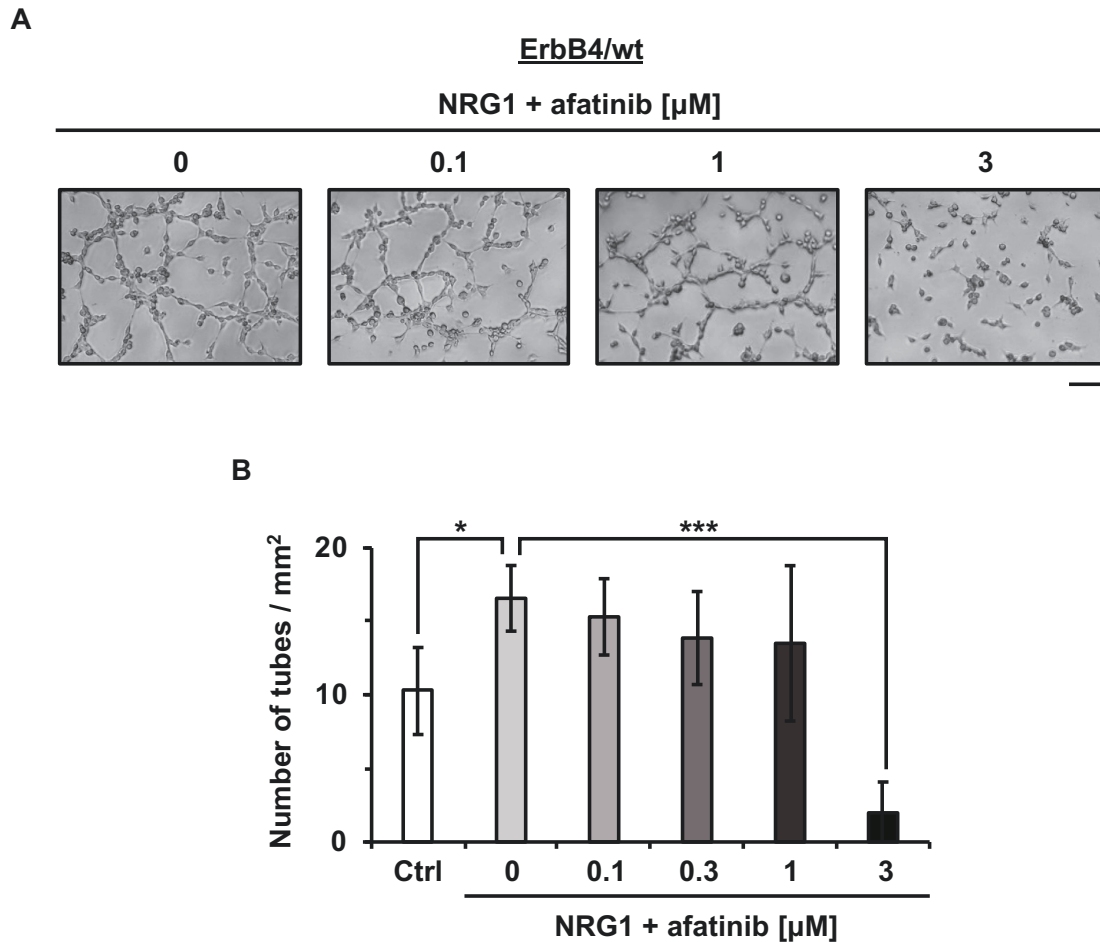


Figure 3-29. VM formation of ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells are suppressed by 3 μM afatinib treatment.

(A) ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended in serum-free medium and co-treated with various concentrations of afatinib and 100 ng/mL NRG1, then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation are shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μm . Data shown are means \pm SD. *P* values <0.05 and <0.001 are indicated by * and ***, respectively.

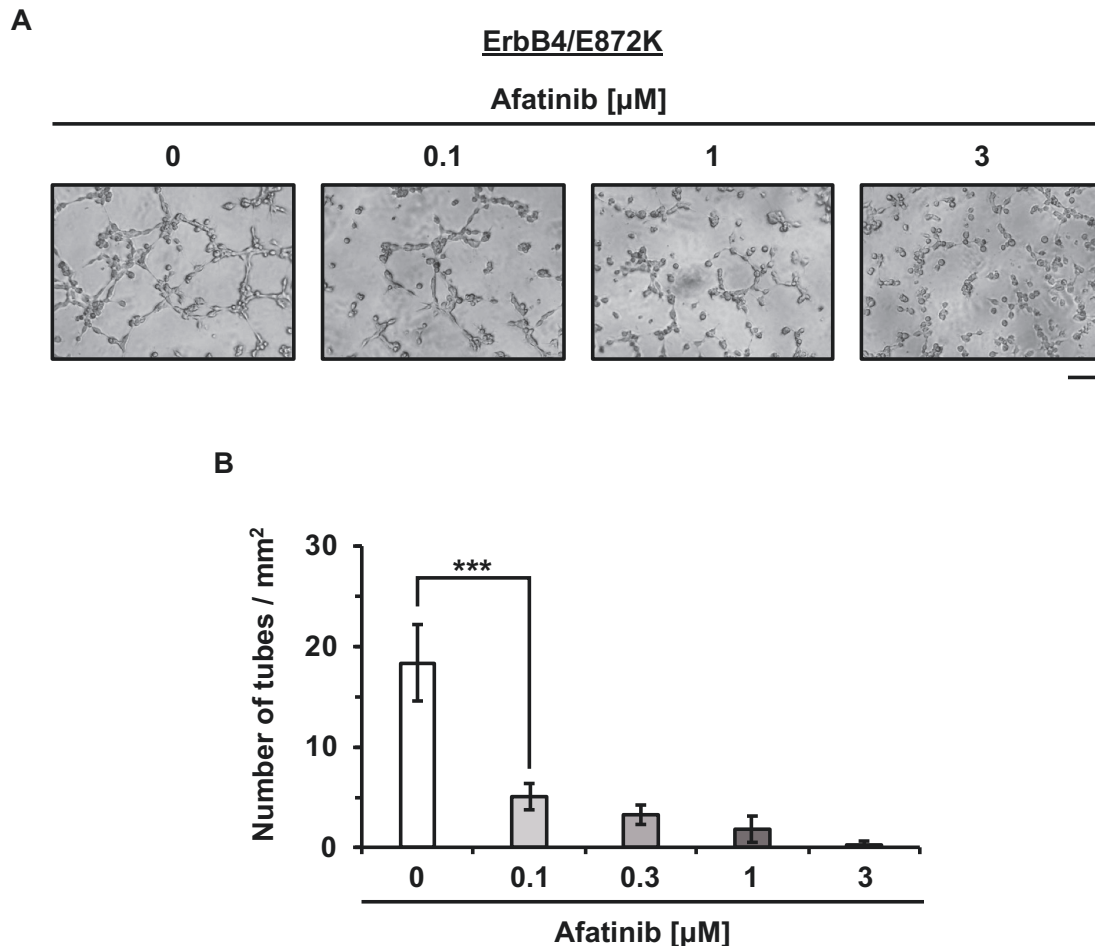


Figure 3-30. VM formation of ErbB4/E872K-overexpressing MDA-MB-231 cells are suppressed by 0.1 μM afatinib treatment.

(A) ErbB4/E872K-overexpressing MDA-MB-231 cells were suspended in serum-free medium and treated with various concentrations of afatinib, then seeded onto Matrigel-precoated 96 well plates (1.6×10^4 cells/well). Representative images of VM formation are shown (5 hours after seeding). (B) VM formation was quantified at 5 hours after seeding, and the number of tubes was counted in six randomly selected independent fields. Bar, 100 μm . Data shown are means \pm SD. P value <0.001 is indicated by ***.

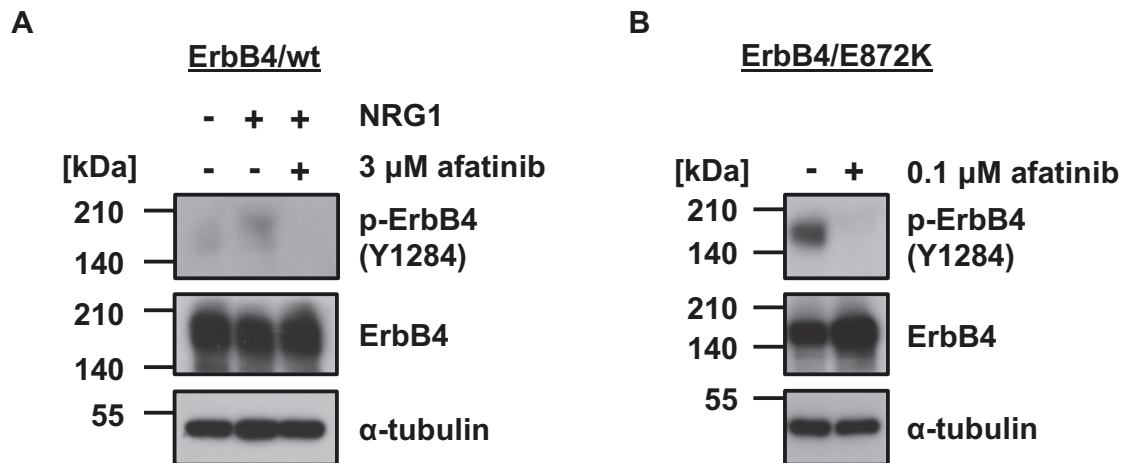


Figure 3-31. Afatinib inhibits phosphorylation of ErbB4 in MDA-MB-231 cells.

(A) ErbB4/wt-overexpressing MDA-MB-231 cells were cotreated with 100 ng/mL NRG1 and 3 μ M afatinib for 10 minutes in serum-free medium, then lysed and immunoblotted with the indicated antibodies. (B) ErbB4/E872K-overexpressing MDA-MB-231 cells were treated with 0.1 μ M afatinib for 10 minutes in serum-free medium, then lysed and western blot was performed.

第 7 節 ErbB4 変異とがん細胞の腫瘍形成能

これまでの結果から、ErbB4 が自身の活性化状態に応じて柔軟に VM 形成を調節することが示された。そこで最後に、腫瘍悪性化の重要な指標であるがん細胞の増殖能、遊走能について、ErbB4 やその変異体が与える影響を調べた。

1) ErbB4 ががん細胞の増殖能に与える影響

MDA-MB-231 細胞において、ErbB4 を過剰発現させた時の細胞増殖能を評価した結果 (Figure 3-32A)、細胞播種後 48 時間で、Neo よりも ErbB4/wt 過剰発現細胞の生細胞数が多くなった。また、ErbB4/K751M は ErbB4/wt と比べて生細胞数を低下させた。その後 96 時間で、ErbB4/E872K は ErbB4/wt よりも細胞増殖能を上昇させた。

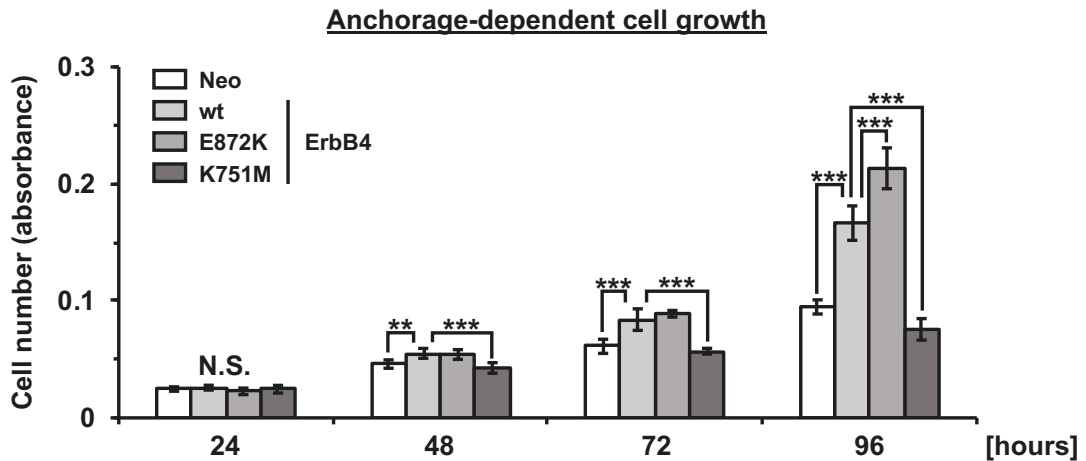
さらに、poly-HEMA をコートした well plate 上に細胞を播種し、足場非依存的な細胞増殖能を評価した (Figure 3-32B)。その結果、Neo に比べて ErbB4/wt は著しく生細胞数を増加させ、ErbB4/E872K は ErbB4/wt よりもさらに生細胞数が多かった。また、ErbB4/K751M は ErbB4/wt よりも有意に少ない生細胞数であった。従って、ErbB4 は足場依存的および足場非依存的な細胞増殖を促進し、その活性は E872K 変異によって高められることが示された。

2) ErbB4 ががん細胞の遊走能に与える影響

Wound-healing assay により、MDA-MB-231 細胞において ErbB4 を過剰発現させた時の細胞遊走能を評価した (Figure 3-33)。その結果、Neo に比べて ErbB4/wt 過剰発現細胞では、その細胞遊走能が低下した。一方で、ErbB4/E872K は ErbB4/wt と比べて細胞遊走を促進させた。従って、ErbB4 の発現によって細胞遊走能は低下するが、ErbB4/E872K ではその遊走能が向上することが明らかになった。

これらの結果をまとめると、ErbB4 は他の ErbB 受容体と同様に、細胞増殖をキナーゼ活性依存的に促進させることが示された。また、ErbB4 が細胞遊走に与える影響は VM 形成の結果と相関しており、ErbB4 は細胞運動の調節を介して VM 形成を制御することが示唆された。

A



B

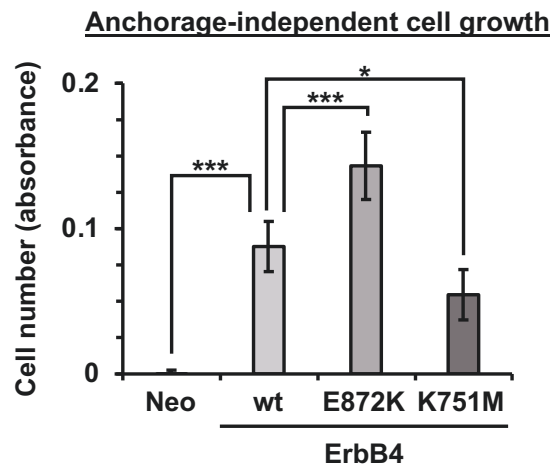
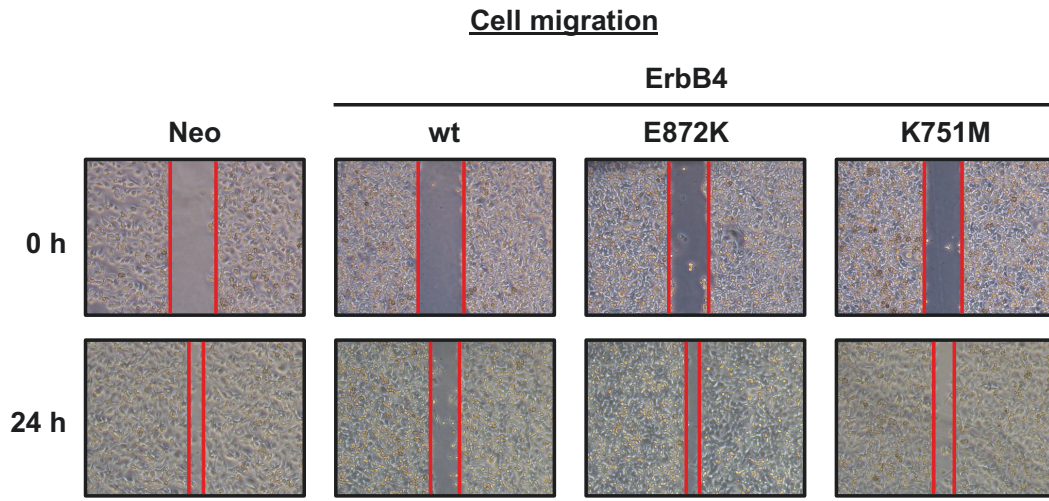


Figure 3-32. ErbB4 regulates cell proliferation in MDA-MB-231 cells.

(A) wt, E872K, or K751M ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were seeded on 96 well plates (500 cells/well) and cultured for 96 hours. WST assay was performed at every 24 hours. (B) wt, E872K, or K751M ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were seeded on poly-HEMA-precoated 96 well plates (5×10^3 cells/well). After 10 days culture, WST assay was performed. Data shown are the means \pm SD. *P* values <0.05, <0.01, and <0.001 are indicated by *, **, and ***, respectively. N.S., not significant.

A



B

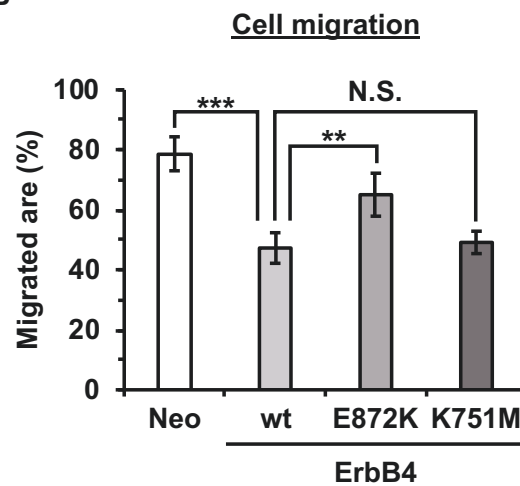


Figure 3-33. ErbB4 regulates cell migration in MDA-MB-231 cells.

(A and B) wt, E872K, or K751M ErbB4-overexpressing MDA-MB-231 cells were seeded on 12 well plates (2×10^5 cells/well). After 24 hours culture, cells were scratched and washed with PBS, and maintained with serum-free medium for 24 hours. The photographs were taken under phase-contrast microscopy at 0- and 24-hours after wounding (B). Migrated areas were quantified at four independent areas in each cell. Data shown are the means \pm SD. *P* values <0.01 and <0.001 are indicated by ** and ***, respectively. N.S., not significant.

第 8 節 まとめ

第 3 章では、細胞表面に発現し、がんにおける機能が複雑な ErbB4 に注目して、VM 形成との関係性を評価した。ヒト乳がん細胞株を用いて解析した結果、ErbB4 の発現が VM 形成と負の相関があることが示唆された。そこで、ErbB4 を発現していない MDA-MB-231 細胞に ErbB4 を過剰発現させた結果、VM 形成が著しく抑制された。一方で、内在的に ErbB4 を高発現している MCF-7、T47D 細胞において ErbB4 を KO すると、VM 形成が促進した。これらの結果から、ErbB4 の発現自体は VM 形成を負に制御することが示された。

続いて、ErbB4 を活性化させた際の VM 形成を評価した。ErbB4 を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞に、ErbB4 のリガンドである NRG1 を処理した結果、VM 形成は促進した。この時、キナーゼ活性を失わせた K751M ErbB4 では、NRG1 により VM 形成が促進しなかったことから、この促進効果は ErbB4 のキナーゼ活性依存的に起こることが示唆された。また、これまでに乳がん、メラノーマと複数のがんで報告されている ErbB4 の E872K 変異についても調べた結果、この変異によってリガンド非依存的に ErbB4 のリン酸化が誘導され、VM 形成も強められた。その一方で、ATP 競合的にチロシンキナーゼ活性を抑制する pan ErbB 阻害剤である afatinib を処理した際、この E872K 変異が制御する VM 形成は低濃度の処理で抑制された。このことから、E872K 変異はキナーゼ活性の増強を通じて VM 形成を強く誘導するが、他方でチロシンキナーゼ阻害剤による阻害効果を受けやすくなることが示唆された。

以上より、ヒト乳がん細胞において、ErbB4 の発現は VM 形成を抑制するが、活性化すると VM 形成を促進させることが示された。

第3章の実験方法

1) 細胞培養

ヒト乳がん由来 MCF-7、MDA-MB-231、T47D 細胞は、DMEM 培地に 7% (v/v) fetal bovine serum (FBS)、100 units/mL penicillin G、100 mg/L kanamycin、600 mg/L、2.25 g/L NaHCO₃ を添加した培地を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2) *In vitro* VM formation assay

マトリゲルは氷上で融解し、無血清の DMEM 培地により 1.5 倍に希釈して用いた。氷上で 96 well plate に希釈済みマトリゲルを加え (40 µL/well)、振盪することでマトリゲルを均一にコーティングした。その後、37°C で 30 分以上静置することで、マトリゲルを完全にゲル化させた。ゲル化したマトリゲル上に、 1.6×10^4 cells/well となるように懸濁した細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。VM 形成の様子は顕微鏡 (Leica) で撮影し、細胞で囲まれた領域を "tube" としてカウントした。1 つのサンプルにつき 6 箇所の視野を撮影し、各々の tube 数をカウントして 1 mm² あたりの数を算出し、平均化することで VM 形成の定量化を行った。

3) ErbB4 の過剰発現および再発現

ヒト *ErbB4* の cDNA は、Addgene より購入した。また、導入した ErbB4 が再び CRISPR/Cas9 により編集されるのを防ぐため、アミノ酸置換を起こさないように、増幅した *ErbB4* の塩基を置換した。塩基置換に用いたプライマーの配列は以下の通りである。

Forward, 5'-GTCTCTTTGCTGGTCGCCGCCGGGACCGTCCAGCCCAGCGATTC
TC-3'

Reverse, 5'-CCACACCCACAAGCCGGTGGCTGGCTTCATACGCGTGAATTCTC
G-3'

また、E872K 変異及び K751M 変異は以下のプライマーにより変異を導入した。

E872K

Forward, 5'-GAAGGAGATAAAAAAGAGTACAATGCTGATGGAGG-3'

Reverse, 5'-ACTCTTTTTTATCTCCTTCCAAGAGTCTGGCTAGC-3'

K751M

Forward, 5'-TGATTCTTAATGAGACAACTGGTCCCAAGG-3'

Reverse, 5'-TAATAGCCACAGGAATCTTCACAGTTTCTC-3'

上記のプライマーを用いて、PCR により増幅した。増幅した Cas9 耐性の *ErbB4* 遺伝子を、MluI および NotI により制限酵素処理した pCI-neo plasmid (Promega) に組み込んだ。このプラスミドを、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent を用いて MDA-MB-231、T47D 細胞に遺伝子導入した。その後、500 µg/mL の G418 (FUJIFILM Wako) によりセクションを行い、限界希釈法によりクローン細胞株を樹立した。

4) CRISPR/Cas9 システムを用いた ErbB4-KO 細胞の樹立

ITGB1 と同様に、ニッカーゼ改変型 Cas9 (D10A 変異型)を用いて ErbB4-KO 細胞を樹立した。Single guide RNA を作るためのオリゴ DNA の配列は、以下の通りである。

標的 1: forward, 5'-CACCGCAGACCCAAAGTCCTGTCGC-3'

reverse, 5'-AAACGCGACAGGACTTTGGGTCTGC-3'

標的 2: forward, 5'-CACCGGTGAGCCTTCTCGTGGCGGC-3'

reverse, 5'-AAACGCCGCCACGAGAAGGCTCACC-3'

各々の forward と reverse のオリゴ DNA をアニーリングし、BbsI により制限酵素処理した pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0 plasmid に組み込んだ。これら 2 つのプラスミドを、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent を用いて T47D 細胞に遺伝子導入し、2 µg/mL の puromycin dihydrochloride でセクションを行った。その後、限界希釈法によりクローン細胞株を樹立し、western blot により ErbB4 の KO を確認した。

5) Western blot

細胞表面を氷冷した PBS で洗浄した後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% [w/v] sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% [v/v] Triton X-100, 1% [w/v] sodium deoxycholate, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えた。なお、リン酸化タンパク質を検出する際には、上記の組成に加えて PhosSTOP™ を加えた lysis buffer を用いた。ラバーポリスマンを用いて細胞を掻き取ってマイクロテストチューブに溶液を移し、超音波処理することで細胞を破碎した。Coomassie Brilliant Blue G-250 を用いて細胞溶解液のタンパク質濃度を定量し、各サンプルの濃度を揃えた。各サンプルに loading buffer (350 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% [w/v] glycerol, 0.012% [w/v] bromophenol blue, 6% [w/v] SDS, and 30% [v/v] 2-mercaptoethanol) を加え、98°C で 5 分間熱処理した後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。泳動後のゲルを PVDF 膜に転写し、抗原抗体反応により各タンパク質を検出した。1 次抗体は、抗 EGFR 抗体 (Cell Signaling Technology #2232)、抗 HER2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology #sc-7301)、抗 ErbB3 抗体 (Cell Signaling Technology #12708)、抗 ErbB4 抗体 (Cell Signaling Technology #4795)、抗 p-ErbB4 (Y1284) 抗体 (Cell Signaling Technology #4757)、抗- α -tubulin 抗体 (Merck KGaA #T5168)、抗 FAK 抗体 (BD Biosciences #610087)、抗 p-FAK 抗体 (Abcam #ab81298)、抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology #9272)、抗 p-Akt (S473) 抗体 (Cell Signaling Technology #4060)、抗 Erk2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology #sc-1647)、抗 p-Erk1/2 (T202/Y204) 抗体 (Cell Signaling Technology #9101) を用いた。また、発色には、

Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) と Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrates (Merck KGaA) を用いた。

6) WST assay

Cell Counting Kit-8 を細胞に添加し (培地の 1/10 量)、37°C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、450 nm の吸光度を測定した。

7) 96 well plate における poly-HEMA のコーティング

95%エタノール溶液中に、poly-HEMA の粉末を 5 mg/mL の濃度となるように加え、37°C で 2 日インキュベートすることで完全に溶解させた。この poly-HEMA 溶液を 96 well plate 上に 50 μ L/well となるように入れ、37°C で 2 日間インキュベートすることでエタノールを蒸発させた[73]。

8) Wound-healing assay

細胞を 24 well plate 上に 2×10^5 cells/well となるように播種し、24 時間培養した。その後、200 μ L pipette tip (WATSON) によって細胞にギャップを作り、PBS で洗浄した後、FBS を含まない培地で 24 時間培養した。各々の細胞につき 4 箇所のギャップを撮影し、ImageJ ソフトウェア (version 1.51s; National Institutes of Health) を用いることで[74]、細胞が遊走した面積を定量化した。

9) 有意差検定

本章におけるデータセットは、2 サンプル間の比較の際には Student の *t* 検定を用いた。また、3 サンプル以上で比較を行う際には、one-way ANOVA および Tukey の多重比較検定を行うことで分析した。なお、SPSS ソフトウェア (version 27; IBM) により統計解析を行い、 $P < 0.05$ の時、有意な差があると定義した。

10) 試薬

その他の試薬は、下記の通りに購入した。

- Neuregulin 1-β1: R&D Systems
- Fulvestrant: Cayman Chemical
- Mifepristone: Cayman Chemical
- LY294002: Cayman Chemical
- Afatinib (BIBW2992): Tokyo Chemical Industry

第4章 総括

血管擬態 (VM) は、腫瘍内に疑似血管構造を作り出すことで、がん全体に血液を効率的に循環させる現象である。がんの継続した成長や転移には血管の存在が必要不可欠であるため、VMはがんを悪性化させる現象であると考えられている。実際に近年の研究で、VMの存在はがんの浸潤や転移、患者の予後不良に寄与することを示す結果が多数報告されている。そのため、VMを抑制できれば効果的ながん治療につながると思われるが、その根本的な形成メカニズムには不明瞭な点が多く、VMを標的としたがん治療は現実的ではないのが現状である。

これまでの研究で、VM形成は細胞外マトリックス (ECM) が豊富な領域で起こることが示唆されている。また、がん細胞の細胞膜上のタンパク質の発現量が変化することや、細胞形態の変化がVMの形成に重要であることが示唆されている。そのため著者は、「ある特定の細胞外因子ががん細胞に作用し、その刺激により細胞内シグナル伝達が活性化することでVM形成は引き起こされる」という仮説を立てた。そして、この流れにおいて最初のステップとなる「細胞外刺激の認識」に注目した。がん細胞の細胞膜上に発現する受容体がVM誘導因子と結合することが考えられるため、その受容体の機能を阻害することができればVM形成の抑制も可能であると考えた。

そのような背景の中で、本論文では2種類の細胞表面受容体について、VMとの関係を詳細に調べた。1つ目の integrin $\beta 1$ (ITGB1) は、ECMの代表的な受容体として知られているタンパク質である。2つ目の ErbB4 は、がんで高発現する上皮成長因子受容体ファミリーの1つとして知られるタンパク質である。機能が全く異なるこの2つの細胞表面受容体がVM形成を制御するか否かを評価することで、細胞表面受容体の阻害によりVM形成能が失われるのか否か、という問いの答えに大きく近づくことができると考えられる。また、細胞表面受容体は、低分子化合物や抗体医薬品など様々なモダリティにより標的とすることができるため、将来的にがん治療の標的として有望な分子となる可能性を秘めている。

本研究において、ITGB1とVM形成の関係に関して得られた結果をまとめると以下の通りである。

- 1) Integrin の活性はカルシウムイオンにより制御されており、ヒト線維肉腫由来の HT1080 細胞に EGTA を処理すると VM 形成が抑制された。また、EGTA と CaCl₂ を共処理すると VM 形成が回復したことから、カルシウムイオンによる integrin の活性化が VM 形成に重要であることが示唆された。
- 2) CRISPR/Cas9 システムにより、ITGB1 を KO した HT1080 細胞を樹立した。この細胞では VM 形成能が完全に失われており、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞およびヒトメラノーマ由来 CHL-1 細胞においても ITGB1 を KO した結果、同様に VM 形成が完全に抑制された。従って、ヒトがん細胞の VM 形成に ITGB1 は必要不可欠であることが示された。
- 3) ITGB1-KO HT1080 細胞において ITGB1 を再発現させた結果、VM 形成は回復した。従って、ITGB1-KO 細胞における VM 形成能の消失は、CRISPR/Cas9 システムのオフターゲット効果ではなく、ITGB1 の欠損によるものであることが確かめられた。
- 4) ITGB1 の欠損により FAK のリン酸化レベルは低下したが、ITGB1 を再発現させると FAK のリン酸化レベルが上昇した。すなわち、VM 形成が起こる細胞において、FAK は活性化していることが示唆された。しかし、HT1080 細胞に FAK 阻害剤を処理しても VM 形成が抑制されなかったことから、FAK の活性化は VM 形成と相関が見られる場合があるが、その形成に必須ではないことが示唆された。
- 5) 細胞表面受容体である ITGB1、integrin α v (ITGAV)、E-cadherin について、各々の中和抗体を処理した際の HT1080 細胞における VM 形成を評価した。その結果、抗 ITGB1 中和抗体は VM 形成を完全に抑制し、抗 E-cadherin 中和抗体は VM 形成を部分的に抑制した。一方、抗 ITGAV 中和抗体は VM 形成にほとんど影響を与えなかった。従って、細胞表面の接着分子全てが VM 形成に関与するわけではないことが示された。また、中和抗体による実験でも、ITGB1 が VM 形成に必須であることが示された。
- 6) ECM 成分の多くは Arg-Gly-Asp (RGD) という配列を介して細胞と接着する。そこで、HT1080 細胞に RGD ペプチドを処理することにより、RGD 配列依存的な ECM 成分の細胞への接着を阻害したが、VM 形成は抑制されなかった。すなわち、

RGD 配列に依らない ECM 成分の接着が、VM 形成には重要であることが示唆された。

3 種類のヒトがん細胞（線維肉腫、乳がん、メラノーマ）において、ITGB1 が VM 形成に必要不可欠であることが示された。ITGB1 は 12 種類もの α -integrin とヘテロダイマーを形成し、様々な ECM 成分を基質として認識する (Figure 1-5)。本研究の VM 形成アッセイにおいて用いたマトリゲルは、ラミニンやコラーゲン IV をはじめとする ECM 基質を含んでいることから、これらの基質と ITGB1 が相互作用することで VM 形成が誘導されると考えられる。先行研究において、ラミニン $5\gamma 2$ は MMPs により切断されて 2 つのフラグメント $\gamma 2'$ 、 $\gamma 2x$ になり、その一連のリモデリング機構がメラノーマの VM 形成を促進させることが報告されている[79]。ITGB1 はラミニンと接着し、また下流シグナルで MMPs の発現にも寄与することから、マトリゲル中のラミニンと ITGB1 の相互作用を介して、VM 形成に必要な ECM リモデリングが促進したことが考えられる。

また、コラーゲン IV は網目状のネットワーク構造をしているため[80]、ITGB1 とコラーゲン IV の結合によってがん細胞が血管様のネットワーク構造を作り出すことが考えられる。ITGB1 は、コラーゲンと細胞の結合に必須な integrin のアイソフォームであるため (Figure 1-5)、ITGB1 の欠損はがん細胞とコラーゲンの相互作用を完全に失わせる。したがって、VM 形成に必須な刺激としてコラーゲンが働くと仮定すれば、ITGB1 もまた、その受容体として VM 形成に必要不可欠な働きをすると思われる。

RGD 配列と細胞の結合に重要な ITGAV を阻害しても、VM 形成に影響を与えないことが示された。これに加えて、RGD ペプチド処理は VM 形成を抑制しなかった。多くの ECM タンパク質は RGD モチーフを使って integrin と結合するが、その相互作用は必要不可欠ではないことが明らかになった。細胞によっては、ITGAV の発現量が高く、ECM 中で数多の ECM-ITGAV 相互作用を形成することがある。そのようなケースでは、RGD モチーフの阻害によって ECM 中でのがん細胞の形態が影響を受けることで、VM 形成にも作用してしまうことがある[49,50]。しかし、それらはあくまで VM 形成に寄与するのみであり、血管様ネットワーク構造を作り出す基礎的な機構には関与しないことが、本実験によって示唆された。さらに、高濃度の 3-D collagen 中でがん細胞

胞を培養すると、*ITGB1* 遺伝子の発現量が上昇し、その環境下で collagen-induced network phenotype という VM 様の構造を作ることが報告されている[81]。この報告からも、実際に生体内でがん細胞が ECM と相互作用し、*ITGB1* の発現誘導を行うことで VM 形成が行われるというメカニズムが強く示唆された。以上より、本研究の結果は VM 形成に *ITGB1* が必須であることを示しており、*ITGB1* の阻害が有効ながん治療法となることを示唆するものとなった。

ErbB4 と VM 形成の関係に関して、本研究で得られた結果をまとめると以下の通りである。

- 1) ヒト乳がん細胞株 MCF-7、MDA-MB-231、T47D 細胞を用いて内在的な ErbB4 の発現量を調べた結果、MCF-7 および T47D 細胞で ErbB4 が高発現していた。また、この 3 種類の細胞を用いて VM 形成能を評価した結果、MCF-7 および T47D 細胞は VM 形成能が低く、MDA-MB-231 細胞では VM 形成能が高いことが明らかになった。従って、ErbB4 の発現と VM 形成能には負の相関があることが示唆された。
- 2) MDA-MB-231 および T47D 細胞における ErbB ファミリーの内在的な発現量を調べた結果、T47D 細胞は ErbB3 を高発現しており、MDA-MB-231 細胞は EGFR を高発現していた。
- 3) MDA-MB-231 細胞において ErbB4 を過剰発現させた結果、VM 形成に著しい遅れが生じた。この結果から、ErbB4 は VM 形成の初期段階において抑制効果をもたらすことが示唆された。また、内在的に ErbB4 を高発現している MCF-7、T47D 細胞において ErbB4 を KO した細胞株を樹立した結果、いずれの細胞においても ErbB4 の KO によって VM 形成が促進した。さらに、ErbB4-KO T47D 細胞に ErbB4 を再発現させた結果、VM 形成が抑制されたことから、ヒト乳がん細胞において ErbB4 の発現が VM 形成を抑制することが明らかになった。
- 4) ErbB 受容体の下流シグナルである PI3K/Akt および MAPK 経路の活性化状態を評価した。なお、MAPK 経路は Erk1/2 のリン酸化レベルにより評価した。その結果、MDA-MB-231 細胞に ErbB4 を過剰発現させてもこれらのシグナル伝達に

変化はなかった。また、T47D 細胞において ErbB4 を KO すると MAPK 経路は抑制されたが、Akt 経路は変化しなかった。

- 5) MDA-MB-231 細胞において、ErbB4 の過剰発現によりリン酸化 FAK 量が低下し、T47D 細胞において ErbB4 を KO するとリン酸化 FAK 量が増加した。即ち、第 2 章と同様に、VM 形成能が高い細胞で FAK は活性化することが示唆された。
- 6) MCF-7 細胞にエストロゲン受容体 (ER) アンタゴニストの fulvestrant と、プロゲステロン受容体 (PR) アンタゴニストの mifepristone を処理した結果、コントロールと同様に VM 形成は起こらなかった。また、T47D 細胞においても同様の実験を行った結果、fulvestrant は VM 形成を阻害し、mifepristone は影響を与えなかった。従って、ER と PR は両細胞の VM 形成を抑制しておらず、T47D 細胞においては ER が VM 形成を促進させることが示唆された。
- 7) 野生型 ErbB4 (ErbB4/wt) を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞に、ErbB4 のリガンドである NRG1 を処理すると、ErbB4 の活性化および VM 形成の促進がみられた。一方で、キナーゼ活性を失わせた K751M 変異型 ErbB4 (ErbB4/K751M) は、NRG1 を処理しても活性化は誘導されず、VM 形成も促進されなかった。
- 8) 乳がんやメラノーマなど複数のがん患者で報告されている E872K 変異型 ErbB4 (ErbB4/E872K) を MDA-MB-231 細胞に過剰発現させ、VM 形成に与える影響を調べた。その結果、ErbB4/E872K は NRG1 刺激がない状態で ErbB4/wt よりも活性化しており、さらに、ErbB4/E872K は NRG1 処理によりそのリン酸化レベルが低下した。この結果と一致するように、NRG1 を処理しない条件下で ErbB4/E872K は ErbB4/wt よりも高い VM 形成促進効果を示した。また、ErbB4/wt 過剰発現細胞では NRG1 の処理濃度依存的に VM 形成が促進したのに対し、E872K では NRG1 の処理濃度依存的に VM 形成が弱められた。従って、ErbB4 の E872K 変異は VM 形成能を高める変異であることが示された。
- 9) ErbB4 の E872K 変異は、PI3K/Akt シグナル伝達を活性化させた。また、ErbB4/E872K 過剰発現細胞に PI3K 阻害剤を処理すると VM 形成が著しく抑制されたことから、ErbB4 を介した VM 形成に PI3K/Akt シグナル伝達が寄与することが示唆された。

- 10) T47D 細胞において、内在性の ErbB4 を NRG1 により活性化させた結果、MDA-MB-231 細胞と同様に VM 形成が促進した。また、NRG1 処理により PI3K/Akt および MAPK 経路が活性化した。
- 11) MDA-MB-231 細胞の親株および ErbB-KO T47D 細胞において、NRG1 を処理したが VM 形成は促進しなかった。そのため、NRG1 は ErbB4 の活性化を通じて VM 形成を促進させることが強く示唆された。
- 12) 日本や欧米で認可済のチロシンキナーゼ阻害剤であり、EGFR、HER2、ErbB4 に対して阻害活性を示す afatinib を MDA-MB-231 細胞に処理し、VM 形成の阻害活性を評価した。その結果、NRG1 により活性化させた ErbB4/wt 過剰発現細胞においては、3 μ M の afatinib 処理によって VM 形成が阻害された。また、ErbB4/E872K 過剰発現細胞においては、0.1 μ M の afatinib 処理によって VM 形成が著しく阻害された。
- 13) ErbB4/wt のリン酸化は 3 μ M の afatinib 処理によって抑制された。また、ErbB4/E872K のリン酸化は 0.1 μ M の afatinib 処理によって抑制された。従って、各々の ErbB4 過剰発現細胞の VM 形成を阻害した濃度において、afatinib は ErbB4 の活性化を抑制することが示された。
- 14) MDA-MB-231 細胞において、ErbB4/wt の過剰発現は細胞増殖を促進させ、その活性は E872K 変異によりさらに高められた。また、ErbB4 の過剰発現は細胞遊走能を低下させたが、ErbB4/E872K は ErbB4/wt と比べて細胞遊走能を向上させた。

ヒト乳がん細胞において、ErbB4 の発現そのものは VM 形成を負に制御した。ErbB4 は細胞表面に発現することから、この VM 抑制効果は VM 形成に寄与する他の細胞表面受容体の活性を、ErbB4 が物理的に阻害した結果であると考えられる。一方で、リガンドである NRG1 処理により活性化させた ErbB4 は VM 形成を促進させることが示された。ErbB4 を過剰発現させた MDA-MB-231 細胞と比較して、T47D 細胞では低用量の NRG1 処理によって ErbB4 の活性化および VM 形成の促進が誘導された。T47D 細胞においては同じく NRG1 の受容体である ErbB3 が発現しているた

め、細胞全体での NRG1 に対する刺激応答性が高い。そのため、NRG1 と ErbB3/ErbB4 の相互作用が効率的に起こり、ErbB 受容体同士のダイマー形成が活発に起こったと考えられる。また、MDA-MB-231 細胞は EGFR を高発現しているが、過去の研究で EGFR-integrin $\alpha\beta3$ 複合体が VM 形成を促進させることが報告されている[82]。すなわち、EGFR は VM 形成を促進させるため、NRG1 刺激下において EGFR-ErbB4 二量体が VM 形成を促進させることが示唆された。

本研究において、ErbB 受容体を阻害する TKI である afatinib を処理し、VM 形成を抑制できることを見出した。特に、恒常的活性化型である ErbB4/E872K を過剰発現させた細胞では、afatinib による VM 阻害効果を強く受けた。ErbB 受容体は、自身のチロシン残基を自己リン酸化させる際、リジン残基を ATP 結合ドメインとして利用するため、E872K 変異によって ErbB4 における ATP の結合が安定化し、恒常的活性化を招くと考えられる。その一方で afatinib は不可逆的な ATP 競合的阻害剤であるため、ErbB4/E872K に対しては afatinib が ATP 結合ポケットに入り込みやすく、不可逆的にそのキナーゼ活性を阻害するため、大きな VM 抑制効果をもたらしたと思われる。すなわち本研究成果は、活性化型である ErbB4/E872K 変異が恒常的に VM 形成を促進させるのと同時に、afatinib のような ATP 競合的阻害剤に対する感受性を高めることを示しており、このような活性化型変異が VM 形成の抑制において有望な標的であることを示唆している。

以上のように、本論文で注目した 2 つの細胞表面受容体は、いずれもがん細胞の VM 形成に重要であることが示された。ITGB1 に関しては複数のがん細胞の VM 形成に必要不可欠であること、ErbB4 に関してはその活性化状態によって VM 形成を正にも負にも制御することを明らかにした。これらの知見は、「がん細胞がどのように VM 形成を制御するか」という根本的なメカニズムの理解に大きく寄与するものである。今後、より詳細に VM 形成機構が解明されていき、がん治療を大きく改善させる標的となることが期待される。

また、本研究を通じて、VM は腫瘍悪性化のための「進化形態」として、多くのがん細胞が取りやすい形であると考えた。がん細胞の中には、VM 形成を全く

示さないものから素早く形成を起こすものまで様々存在する。VM 形成を示さないがん細胞は、生体内で腫瘍成長を促す準備が十分に整っていると考えられる。例えば、MCF-7 細胞にはホルモン受容体が過剰発現しており、VM 形成を起こさなくても生体内で腫瘍成長をさせられる。一方で、HT1080 や MDA-MB-231 細胞などは生体内では強固な地位を築くことができないため、ECM 刺激に応じて速やかに VM 形成できるような準備を整えていると考える。言い換えると、これらのがん細胞は VM を頼らないと生きていけないのである。従って、VM は多くのがん細胞が頼る生存戦略であり、がんには生きるためのしかけが二重三重に用意されていると考える。

参考文献

1. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from tumor cells. *J Exp Med.* 1911;13:397-411.
2. Yamagiwa K, Ichikawa K. Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste (1. Mitteilung). *Mitteil Med Fakultät Kaiserl Univ Tokyo* 1915;15:295-344.
3. Fujiki H. Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's papers entitled "Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors" (I to VI reports). *Cancer Sci.* 2014;105:143-149.
4. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221.
5. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331:1565-1570.
6. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2017;17:457-474.
7. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003;9:713-725.
8. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997;272:22642-22647.
9. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995;270:1230-1237.
10. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992;12:5447-5454.

11. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604-4613.
12. Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong CC, Russo A, Russo MA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:E2707-E2716.
13. Calvani M, Rapisarda A, Uranchimeg B, Shoemaker RH, Melillo G. Hypoxic induction of an HIF-1 α -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* 2006;107:2705-2712.
14. Tsai SH, Huang PH, Hsu YJ, Peng YJ, Lee CH, Wang JC, Chen JW, Lin SJ. Inhibition of hypoxia inducible factor-1 α attenuates abdominal aortic aneurysm progression through the down-regulation of matrix metalloproteinases. *Sci Rep.* 2016;6:28612.
15. Aalders KC, Tryfonidis K, Senkus E, Cardoso F. Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:98-110.
16. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155:739-752.
17. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156:361-381.
18. Wei X, Chen Y, Jiang X, Peng M, Liu Y, Mo Y, Ren D, Hua Y, Yu B, Zhou Y, Liao Q, Wang H, Xiang B, Zhou M, Li X, Li G, Li Y, Xiong W, Zeng Z. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Mol Cancer.* 2021;20:7.
19. Yang JP, Liao YD, Mai DM, Xie P, Qiang YY, Zheng LS, Wang MY, Mei Y, Meng DF, Xu L, Cao L, Yang Q, Yang XX, Wang WB, Peng LX, Huang BJ, Qian CN. Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-

- analysis. *Angiogenesis* 2016;19:191-200.
20. Sun W, Shen ZY, Zhang H, Fan YZ, Zhang WZ, Zhang JT, Lu XS, Ye C. Overexpression of HIF-1 α in primary gallbladder carcinoma and its relation to vasculogenic mimicry and unfavourable prognosis. *Oncol Rep.* 2012;27:1990-2002.
 21. Wang M, Zhao X, Zhu D, Liu T, Liang X, Liu F, Zhang Y, Dong X, Sun B. HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36:60.
 22. Sun T, Zhao N, Zhao XL, Gu Q, Zhang SW, Che N, Wang XH, Du J, Liu YX, Sun BC. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology* 2010;51:545-556.
 23. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-939.
 24. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromentel C, Puisieux A. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79-89.
 25. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008;68:3645-3654.
 26. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:411-421.
 27. Williamson SC, Metcalf RL, Trapani F, Mohan S, Antonello J, Abbott B, Leong HS, Chester CP, Simms N, Polanski R, Nonaka D, Priest L, Fusi A, Carlsson F, Carlsson A, Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, Rothwell DG, Hughes A, Hicks J, Miller C, Kuhn P, Brady G, Simpson KL, Blackhall FH, Dive C. Vasculogenic mimicry in

- small cell lung cancer. *Nat Commun.* 2016;7:13322.
28. Delgado-Bellido D, Fernández-Cortés M, Rodríguez MI, Serrano-Sáenz S, Carracedo A, Garcia-Diaz A, Oliver FJ. VE-cadherin promotes vasculogenic mimicry by modulating kaiso-dependent gene expression. *Cell Death Differ.* 2019;26:348-361.
 29. Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol Cancer* 2017;16:65.
 30. Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor RE, Hendrix MJ. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:228-233.
 31. Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, Kinch MS, Hendrix MJ. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res.* 2001;61:3250-3255.
 32. Kim HS, Won YJ, Shim JH, Kim HJ, Kim BS, Hong HN. Role of EphA2-PI3K signaling in vasculogenic mimicry induced by cancer-associated fibroblasts in gastric cancer cells. *Oncol Lett.* 2019;18:3031-3038.
 33. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:288-300.
 34. Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:430-442
 35. Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem.* 1999;274:28071-28074.
 36. Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science.* 2003;302:103-106.

37. Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul.* 1991;2:951-964.
38. Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1992;267:23439-23442.
39. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599-511.
40. Shi X, Ma YQ, Tu Y, Chen K, Wu S, Fukuda K, Qin J, Plow EF, Wu C. The MIG-2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility. *J Biol Chem.* 2007;282:20455-20466.
41. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 2004;6:154-161.
42. Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 2000;275:22607-22610.
43. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-687.
44. Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, Pedersen RA, Damsky CH. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev.* 1995;9:1883-1895.
45. Huang X, Griffiths M, Wu J, Farese RV Jr, Sheppard D. Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2000;20:755-759.
46. Song J, Zhang J, Wang J, Cao Z, Wang J, Guo X, Dong W. β 1 integrin modulates tumor growth and apoptosis of human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2014;32:302-308.
47. Zhang L, Zhang T, Deng Z, Sun L. MicroRNA-3653 inhibits the growth and

- metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting ITGB1. *Oncol Rep.* 2019;41:1669-1677.
48. Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67:659-664.
 49. Oshita F, Kameda Y, Ikehara M, Tanaka G, Yamada K, Nomura I, Noda K, Shotsu A, Fujita A, Arai H, Ito H, Nakayama H, Mitsuda A. Increased expression of integrin beta1 is a poor prognostic factor in small-cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2002;22(2B):1065-1070.
 50. Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Belkin V, Baryshnikov A, Lichinitser M. Melanoma vasculogenic mimicry capillary-like structure formation depends on integrin and calcium signaling. *Microcirculation* 2011;18:390-399.
 51. Ruffini F, Graziani G, Levati L, Tentori L, D'Atri S, Lacal PM. Cilengitide downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of $\alpha v \beta 5$ integrin. *Int J Cancer* 2015;136:E545-E558.
 52. Sergeant A, Saule S, Leprince D, Begue A, Rommens C, Stehelin D. Molecular cloning and characterization of the chicken DNA locus related to the oncogene erbB of avian erythroblastosis virus. *EMBO J.* 1982;1:237-242.
 53. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64:8534-8540.
 54. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol.* 2005;18:1027-1033.
 55. Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, Yamada H, Kojima K, Kumagai J, Kawano T, Sugihara K. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in

- gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7843-7849.
56. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012;12:553-563.
 57. Nishio M, Horiike A, Murakami H, et al. Phase I study of the HER3-targeted antibody patritumab (U3-1287) combined with erlotinib in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015;88:275-281.
 58. Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, Gullick WJ. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res.* 2000;60:1483-1487.
 59. Barnes NL, Khavari S, Boland GP, Cramer A, Knox WF, Bundred NJ. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2163-2168.
 60. Vidal GA, Naresh A, Marrero L, Jones FE. Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J Biol Chem.* 2005;280:19777-19783.
 61. Naresh A, Long W, Vidal GA, Wimley WC, Marrero L, Sartor CI, Tovey S, Cooke TG, Bartlett JM, Jones FE. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66:6412-6420.
 62. Kainulainen V, Sundvall M, Määttä JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem.* 2000;275:8641-8649.
 63. Williams CS, Bernard JK, Demory Beckler M, et al. ERBB4 is over-expressed in human colon cancer and enhances cellular transformation. *Carcinogenesis* 2015;36:710-718.
 64. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Wang YP, Jo KH, Moon SW, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer* 2006;118:1426-1429.

65. Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, Cronin JC, Cruz P, Rosenberg SA, Samuels Y. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet.* 2009;41:1127-1132.
66. Kurppa KJ, Denessiouk K, Johnson MS, Elenius K. Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2016;35:1283-1291.
67. Kirchhofer D, Grzesiak J, Pierschbacher MD. Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem.* 1991;266:4471-4477.
68. Bazzoni G, Shih DT, Buck CA, Hemler ME. Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem.* 1995;270:25570-25577.
69. Bazzoni G, Ma L, Blue ML, Hemler ME. Divalent cations and ligands induce conformational changes that are highly divergent among beta1 integrins. *J Biol Chem.* 1998;273:6670-6678.
70. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309:30-33.
71. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 1985;40:191-198.
72. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8:2281-2308.
73. Fukazawa H, Mizuno S, Uehara Y. A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells. *Anal Biochem.* 1995;228:83-90.
74. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:671-675.
75. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD, Pollack JR. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 2009;4:e6146.
76. Haskins JW, Nguyen DX, Stern DF. Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with

- YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci Signal*. 2014;7:ra116.
77. Sato K, Shin MS, Sakimura A, Zhou Y, Tanaka T, Kawanishi M, Kawasaki Y, Yokoyama S, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H. Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation. *Cancer Sci*. 2013;104:1315-1322.
 78. Drilon A, Somwar R, Mangatt BP, Edgren H, Desmeules P, Ruusulehto A, Smith RS, Delasos L, Vojnic M, Plodkowski AJ, Sabari J, Ng K, Montecalvo J, Chang J, Tai H, Lockwood WW, Martinez V, Riely GJ, Rudin CM, Kris MG, Arcila ME, Matheny C, Benayed R, Rekhtman N, Ladanyi M, Ganji G. Response to ERBB3-Directed Targeted Therapy in NRG1-Rearranged Cancers. *Cancer Discov*. 2018;8:686-695.
 79. Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res*. 2003;63:4757-4762.
 80. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem*. 1981;120:203-211.
 81. Velez DO, Tsui B, Goshia T, Chute CL, Han A, Carter H, Fraley SI. 3D collagen architecture induces a conserved migratory and transcriptional response linked to vasculogenic mimicry. *Nat Commun*. 2017;8:1651.
 82. Camorani S, Crescenzi E, Gramanzini M, Fedele M, Zannetti A, Cerchia L. Aptamer-mediated impairment of EGFR-integrin $\alpha\beta 3$ complex inhibits vasculogenic mimicry and growth of triple-negative breast cancers. *Sci Rep*. 2017;7:46659.

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 生物化学研究室在籍中に、同大学理工学部教授 清水史郎博士の御指導のもと行ったものであり、ここに心より感謝申し上げます。実験に関する議論や論文執筆時の御助言等、あらゆる面で適切な御指導を頂いた御陰で無事に研究を遂行することができました。

本論文を作成するにあたり、慶應義塾大学理工学部教授 戸嶋一敦博士、同教授 荒井緑博士、同准教授 松本緑博士に多くの有益な御助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

化学的知見から多くの御助言を賜りました東京工業大学科学技術創成研究院助教 三浦一輝博士に心より御礼申し上げます。

師匠として、研究の進め方や実験に関する御指導だけでなく、日々の生活においても親身になってサポートをしてくださったエーザイ株式会社 丹羽祐貴博士に深く感謝申し上げます。

日頃より実験の御指導、御助言を頂きました生物化学研究室の先輩方、同輩達、後輩達に深く感謝いたします。特に、直接指導した小林紗恵さん、清水翔太さん、加茂広貴さん、中島みなみさん、福岡恵夢さんは、私を研究者としても人としても成長させてくれた存在でした。心より感謝いたします。

なお、本研究成果の一部は、JSPS 科研費 JP20J11197 の助成を受けたものであり、ここに深く感謝申し上げます。

最後に、私の研究生活を一番に応援してくれた家族に心から感謝いたします。