

令和3年度 博士論文

Tamoxifen により生じる
RSK を介した EphA2 非定型的活性化機構

富山大学大学院 医学薬学教育部 生命・臨床医学専攻

総合口腔科学

米原啓介

目次

1.要旨.....	3
2.序文.....	6
3.材料と方法	8
3-1.抗体と試薬.....	8
3-2.細胞培養.....	8
3-3.Immunoblotting.....	9
3-4.RNA 干渉.....	10
3-5.タイムラプス観察.....	10
3-6.免疫蛍光染色.....	11
4.結果.....	12
4-1.Tamoxifen による RSK を介した EphA2 リン酸化の誘導.....	12
4-2.Tamoxifen による ER α 陰性乳がん細胞に対する遊走能の亢進.....	13
4-3.Tamoxifen による EphA2 の活性化および細胞内局在への影響.....	14
5.考察.....	16
6.総括.....	19
7.謝辞.....	20
8.図表.....	21
9.引用文献.....	27

1. 要旨

【緒言】

エストロゲン受容体 α (ER α) 陽性乳がん患者に対する tamoxifen の長期間投与は腫瘍再発の減少と生命予後の延長に寄与する確立された治療法である。しかし近年、tamoxifen への耐性化や子宮内膜がんのリスク上昇といった有害事象が、臨床上の問題となっている。

当初、tamoxifen は核内受容体である ER α に対してアンタゴニストとして働き、細胞の転写活性を抑制する機序が見出されていたが、ER α に依存することなく MAPK をリン酸化し腫瘍促進的に作用するといった、従来までと相反する機能が近年報告されている。また、tamoxifen の投与を受けた乳がん患者の特定のグループにおいて遠隔転移が増加するという報告があり、腫瘍転移能に対する tamoxifen の関与が示唆されるが詳しい機序は不明な点が多い。

本研究では細胞の遊走能を調整する重要な経路であるとされている EphA2 の MAPK 関連非定型的活性化に、tamoxifen が関与していると考え、がん細胞に対する tamoxifen の MAPK を介した EphA2 のリン酸化、細胞移動距離の測定による遊走能の評価および EphA2 の細胞内局在の変化について解析を行った。

【材料と方法】

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞およびヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に、tamoxifen による刺激を行い、ウェスタンブロット法により MAPK をはじめとする各種タンパクの解析を行った。また、HeLa 細胞に対して阻害剤処理、siRNA の導入を行い RSK との関与について検討した。

次に、タイムラプスイメージングシステムを用いて、MDA-MB-231 細胞同じくヒト乳がん細胞である MCF7 細胞に対し、tamoxifen による刺激を行った際の細胞遊走能の測定と解析を行った。また、MDA-MB-231 細胞に対し tamoxifen による刺激を行った際の EphA2 の局在を免疫蛍光染色により観察した。

【結果】

ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に対して高濃度の tamoxifen で刺激をすることで TNF- α と同程度に MAPK を活性化し、EphA2 の Ser-897 までも強くリン酸化した。阻害剤処理および siRNA の導入により、MAPK の活性化抑制を行うことで、tamoxifen による EphA2 の活性化は MEK-ERK-RSK 経路を介し、特に RSK による調節を受けていることが判明した。

ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞に対して、tamoxifen による刺激を行うとコントロールと比較して、著明に細胞の移動距離が増加し遊走能の亢進を認め、RSK 阻害剤の処理により遊走能は抑制された。MDA-MB-231 細胞に対し tamoxifen による

刺激を行ったが明らかな EphA2 のリン酸化の上昇は認めなかった。しかし、EphA2 の局在を解析したところ、無刺激時に細胞先端へ存在していた EphA2 は、tamoxifen による刺激により細胞内へ取り込まれ、しばらくすると再度細胞先端へ局在を移した。

【結論】

がん細胞に対する tamoxifen の刺激は、MEK-ERK-RSK を介した EphA2 の Ser-897 をリン酸化することで、EphA2 の細胞内局在を変化させ、細胞の遊走能に重要な役割を果たしていることが示唆された。本来であれば tamoxifen は ER α に対して細胞の転写活性を抑制的に調整することで抗腫瘍効果が期待されるが、今回の結果は MAPK の活性化と遊走能の亢進という tamoxifen の腫瘍促進的な一面を明らかとした。このような、MAPK を介した急速シグナル伝達経路の作用機序は未だに不明な点が多く残されている。今後、tamoxifen による腫瘍進展のメカニズムが解明されることで、臨床的に問題となっている有害事象に対する解決策を見い出すことが期待される。

2.序文

Tamoxifen は、エストロゲン受容体 α (ER α) のモジュレーターとして、ER α 陽性乳がん患者に対する第一選択薬として長い間使用されてきた。多くの患者は腫瘍の縮小と転移抑制の効果を認めたが、一部の患者では tamoxifen に対する耐性化を認め[1,2]、子宮内膜がんの発生[3]、遠隔転移およびその他の副作用のリスクを高めることが報告されている[4-6]。

ER α はリガンドであるエストロゲンと結合することによって直接的に転写活性因子として働く。tamoxifen は ER α とエストロゲンの結合を競合的に阻害し、ER α の転写活性に対する拮抗作用を有していると考えられている[7]。このような、tamoxifen の ER α を介した核に対する古典的な調節機構に加えて、近年では tamoxifen および高濃度エストロゲンによる細胞質における MAPK の迅速な活性化が生じるとされている[8-10]。さらに、tamoxifen やエストロゲンが子宮内膜がん細胞に対して細胞骨格のリモデリングおよび細胞遊走に関与していると考えられており[11]、tamoxifen に期待される腫瘍抑制的な作用以外にも腫瘍促進的な一面も併せ持つと考えられている[12,13]。しかし、tamoxifen によって誘導される腫瘍形成能や転移能に関する詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

EphA2 はチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) の中で最大ファミリーを形成している Eph ファミリーの一つであり、様々ながん種において過剰発現が確認されている

[14,15]。EphA2 のリガンドである Ephrin-A1 は EphA2 のチロシン残基をリン酸化することで定型的な活性化を誘導し、細胞の運動能を低下させ腫瘍抑制的に働くと考えられている[16,17]。一方で EGF や炎症性サイトカインである TNF- α などで細胞を刺激すると、リガンドに依存しない非定型的な活性化を惹起することがわかっており、これは EphA2 の C 末端領域に存在する Ser-897 を介すとされている[18-20]。

Zhou et al. は、MAPK である ERK の下流に位置する分子の ribosomal S6 kinases (RSKs) が触媒として直接 EphA2 の Ser-897 をリン酸化することで細胞の運動能を亢進させ、RSK のリン酸化と EphA2 のセリン残基のリン酸化は肺癌患者における予後不良因子であることを見い出した[20]。しかし、tamoxifen による EphA2 の活性化機構に対する詳細な関与は明らかではなかった。

本研究では、細胞の遊走能を調整する重要な経路であるとされている EphA2 の MAPK 関連非定型的活性化に tamoxifen が関与していると考え、tamoxifen により MAPK である ERK が活性化し、さらにその下流の RSK-EphA2 経路が活性化されるのか検証することを目的とした。また、tamoxifen により RSK-EphA2 経路が活性化された場合、細胞に対してどのような影響を及ぼすのかを検討するため、EphA2 の代表的な機能である細胞の遊走能の評価および EphA2 の細胞内局在の変化について解析を行った。本論文は先行して作成した論文[21]に加筆、修正を加えた。

3.材料と方法

3-1. 抗体と試薬

EphA2 (D4A2; #6997)、phospho-EphA2 (Ser-897; #6347)、phospho-RSK (Ser-380; #11989)およびphospho-ERK (Thr-202/Tyr-204; #9101)は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)から、RSK1 (C-21; sc-231)、RSK2 (C-19; sc-1430)、ERK (E-6; sc-271270)、 β -Actin (I-19; sc-1616)および α -Tubulin (B-7; sc-5286)は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)から購入した。ヒトリコンビナント TNF- α および EGF は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)から、4-hydroxy tamoxifen および trametinib は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)から、BI-D1870 は BioVision (Milpitas, CA, USA)から購入した。全ての試薬は dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し使用した。

3-2. 細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞、MCF7 細胞およびヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞は American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, TX, USA)から購入した。各細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (high-glucose condition; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)培地に 10% fetal calf serum、100 U/mL penicillin および 100 U/mL streptomycin (Meiji Seika

Pharma, Tokyo, Japan) を添加し、CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂) 内で培養した。細胞へのエストロゲン様作用を低減させるため、細胞を各試薬で処理する 24 時間前に phenol red および serum を除去した培地に交換し実験をおこなった。

3-3. Immunoblotting

細胞を刺激後、培地を取り除き冷却 PBS で洗浄し、Whole cell extracts (WCE) buffer を加え、ラバーポリスマンで回収し、1.5 mL チューブに移して 30 秒間のボルテックス後、10 分間氷上で静置した。その後、遠心 (4°C, 14000 rpm, 10 分) を行い得られた上清と等量の 2×SDS sample buffer を加え、95°C で 5 分間熱変性させた。Whole cell extracts (WCE) buffer は、25 mM HEPES (pH7.7)、0.3 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、0.1% Triton X-100、20 mM β-glycerophosphate、1 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM dithiothreitol (DTT)、10 μg/mL aprotinin、10 μg/mL leupeptin を用事添加し使用した。2×SDS sample buffer は 25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% glycerol、1% SDS、Bromophenol Blue を調整し使用した。

サンプルを SDS-PAGE で電気泳動し、Immobilon-P (Millipore) へ転写し、4°C で一晩ブロックエース (KAC Co.) による処理を行った。0.1% Tween-20 を含む PBS (PBST) で 15 分間の洗浄を 1 回行い、一次抗体を 2 時間反応させた。反応後のメンブレンを

PBST で 15 分間の洗浄を 3 回行った後、二次抗体を 2000 倍希釈で 1 時間反応させた。PBST で 15 分間の洗浄を 3 回行った後、ECL (Thermo Fisher Scientific)による処理を行い、暗室で X 線フィルム(富士フィルム)に感光させた。抗体の希釈には Can get signal (TOYOBO)、または PBST を使用した。

3-4. RNA 干渉

siRNA (small interfering RNAs) は Stealth RNA interference で設計し Life Technologies Corporation から購入した。ターゲット配列は以下の通りである。

RSK1 (5'-CCAUGCUG GCAGGAUUAUACUCCAUU-3'),

RSK2 (5'-GGGAGGAGAUUUGUUUACACG CUUA-3')。

siRNA の Negative Control として Lo GC Duplex #2 を Thermo Fisher Scientific, Inc から購入した。

HeLa 細胞に Lipofectamine Reagent (Life Technologies Corporation)を用いて、siRNA の最終濃度が 100 nM となるように導入し、72 時間後実験を行った。

3-5. タイムラプス観察

細胞を刺激後、タイムラプスイメージングシステム(Carl Zeiss Cell Observer)で CO₂ インキュベーション(37%, 5% CO₂)内で 5 分毎に合計 2 時間、合計 24 枚の連続写真

撮影を行った。撮影後、Image J Fiji, Manual Tracking plugin で細胞の移動した軌跡をプロットした。測定開始時の細胞の中央を(0,0)に設定し、座標中央から x 軸と y 軸に移動した細胞中央の座標を記録していった。Chemotaxis and Migration Tool により細胞の移動距離を測定した。取得したデータから以下の数式を用いて移動距離 (*total path length*) を算出し解析を行った。[22]

$$total\ path\ length = \sum_1^{24} (\Delta x^2 + \Delta y^2)^{1/2}$$

3-6. 免疫蛍光染色

Cover Slip Grass (Thermo Fisher Scientific) に細胞を播種し、24 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。細胞の接着を確認し、細胞を刺激後、冷却 PBS で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(武藤化学) 1 mM を加え、室温で 15 分間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、0.5% Triton-X 含有 PBS 1 mM を加え 3 分間静置した。PBS で 3 回洗浄し、パラフィルムの上で、希釈した一次抗体 (40 μ L/sample) を暗所で 45 分間反応させた。PBS で 5 回洗浄した後、パラフィルムの上で 500 倍希釈した Alexa flour-488 goat anti-rabbit 二次抗体 (50 μ L/sample) を暗所で 30 分間反応させた。PBS で 5 回洗浄し、スライドガラス (MATSUNAMI) 上で、SlowFade Gold AntiFade Reagent with DAPI (Invitrogen) と反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (ZEISS) で解析した。抗体の希釈液には 0.5% BSA 含有 PBS (FACS buffer) を使用した。

4.結果

4-1. Tamoxifen による RSK を介した EphA2 リン酸化の誘導

Tamoxifen による EphA2 の非定型的な活性化への影響を解析することを目的に、HeLa 細胞に対し tamoxifen と、EphA2 の非定型的な活性化を誘導することで知られる EGF および TNF- α で刺激を行った。Tamoxifen による刺激で ERK および RSK のリン酸化を強く誘導し、EphA2 の非定型的なリン酸化部位である Ser-897 の活性化を確認し、そのリン酸化レベルは TNF- α によるものと同程度であった(図1A)。次に、tamoxifen の有効濃度を把握するため HeLa 細胞に対し異なった濃度の tamoxifen で刺激を行った(図1B)。Tamoxifen による EphA2 の活性化は濃度依存的に強くなり、10 μ M で最大となった。よって以降の実験は tamoxifen 10 μ M で行った。同様に、HeLa 細胞に対して tamoxifen による刺激をタイムコース処理したところ、ERK、RSK および EphA2 の Ser-897 は刺激後 5 分で急速にリン酸化が誘導された(図1C)。ERK、RSK および EphA2 の活性化は刺激後 30 分で僅かにダウンレギュレートされており、60 分後に再活性化している。これは tamoxifen による活性化が二峰性で起こっているものと考えられた。同様の実験を ER α 陰性細胞である HEK293 細胞に対して行ったところ、MAPK および EphA2 のリン酸化が確認された(図1D)。

Zhou et al. は、EphA2 の非定型的なリン酸化に MEK-ERK-RSK 経路が関与していると報告[20]しており、tamoxifen による EphA2 の活性化がこの経路を介したもので

あるのか検証を行った。図2A では MEK 阻害剤の trametinib および RSK 阻害剤の BI-D1870 でそれぞれ前処理を行い、EGF あるいは tamoxifen による刺激を行ったところ、EphA2 のリン酸化は著明に抑制された。BI-D1870 で処理した際に ERK および RSK のリン酸化レベルが上昇しているが、これは RSK による ERK のネガティブフィードバック制御が解除されたためである。さらに、HeLa 細胞において主要な RSK のサブタイプである RSK1 および RSK2 を siRNA によるノックダウンを行い tamoxifen による刺激を行った。RSK1 あるいは RSK2 の単独ノックダウンにおいて EphA2 のリン酸化抑制は部分的であったが、ダブルノックダウンにおいては完全な抑制を示した(図2B)。以上の結果より、EphA2 の非定型的な活性化は tamoxifen による MAPK シグナルの活性化によって誘導されていることが判明した。

4-2. Tamoxifen による ER α 陰性乳がん細胞に対する遊走能の亢進

ER α 陰性乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞は EphA2 の過剰発現および RSK の恒常的な活性化を認めており、細胞遊走能が亢進していると報告されている。各々の細胞を追跡、記録することが可能であるタイムラプスイメージングシステムを用いることで、遊走能に対する tamoxifen の影響を検証した。MDA-MB-231 細胞は転移性の高い細胞株であることがよく知られているが、tamoxifen 刺激を行うことで遊走能がさらに亢進した。加えて、無刺激時または tamoxifen による刺激で亢進した遊走能は RSK

阻害剤による処理で抑制された(図 3A, B)。対照的に、ER α 陽性乳がん細胞である MCF7 細胞では tamoxifen による細胞の遊走は誘発されなかった(図 3C, D)。これらの結果より、EphA2 の非定型的なリン酸化に依存した細胞遊走は ER α の発現に関係なく tamoxifen によって誘導されることが示唆された。

4-3. Tamoxifen による EphA2 の活性化および細胞内局在への影響

タイムラプスイメージングシステムによる遊走能の結果より、MDA-MB-231 細胞において tamoxifen による刺激で RSK-EphA2 経路が活性化されるのか検証を行った。MDA-MB-231 細胞では tamoxifen による EphA2 の非定型的な活性化が起こらなかった(図 4A)。おそらく、MDA-MB-231 細胞においてこの経路が恒常的にリン酸化されていることが原因であると考えた。そこで、活性化された EphA2 の細胞内局在を解析するために免疫蛍光染色による観察を行った。過去に報告されているように、無刺激時において EphA2 は細胞膜上に発現していたが、大半は運動性細胞の進行先端に認める膜状仮足であるラメリポディアに集中していた。Tamoxifen により活性化された EphA2 は急速に細胞内へ移動し、30 分から 60 分にかけて核周囲への集積を認めたが、その後細胞膜上にリサイクルされた(図4B)。さらに、RSK 阻害剤による前処理の後に Tamoxifen による 60 分間の刺激を行ったところ核周囲への集積は起こらず、EphA2 のエンドサイトーシスは RSK がトリガーになっていることが示唆された(図 4C)。

同様に EphA2 の Ser-897 のリン酸化 (pS-EphA2) の変化を検証するために、RSK 阻害剤による前処理の後に tamoxifen による刺激を行った。図 4C に示す通り、tamoxifen による刺激で EphA2 と同様に pS-EphA2 が細胞膜から核周辺領域へ内在化していることが示された。

5. 考察

Tamoxifen は ER α 陽性乳がん患者に対して使用されてきた長い歴史を持つ抗がん剤である。Tamoxifen は ER α のリガンド受容ポケットに結合することで転写活性共役因子の誘導を抑制し、抗腫瘍効果を発揮するとされている[7,23-25]。このような機能から、当初 tamoxifen は ER α のアンタゴニストとして考えられていたが、子宮と骨に存在する ER α に対して部分的アゴニストとして働くことが見出されたため、estrogen receptor modulator (SERM)として考えられるようになった[26]。さらに、tamoxifen は ER α の存在に依存することなく、細胞に対して多様な影響を与えていると報告されている[27]。本研究では、過去に報告されていた tamoxifen によって誘導される MAPK の活性化を確認し、さらにその下流である RSK-EphA2 経路が細胞遊走に関する機能の調節を担っている可能性があるとし唆された。

本研究で用いられている tamoxifen の濃度は ER α のアンタゴニストとして使用される場合よりやや高く設定している。過去にも、ER α 陰性乳がん細胞株である MDA-MB-231 細胞に対し 6 μ M という濃度で刺激を行うと遊走能が亢進する[28]、子宮内膜がん細胞に 10 μ M という濃度で刺激を行うと ERK の活性化が誘導され遊走能が亢進するといった報告があった[11]。したがって、tamoxifen の多種多様な生物学的活性を解明するためには、高濃度の tamoxifen を使用することが必要であると考えた。本研究では、tamoxifen が EphA2 の一過性の内在化および細胞膜へのリサイクル経路を誘

導することを明らかにした。EphA2 はリガンドである Ephrin-A1 によって細胞遊走を抑制的に制御する働きを持つチロシンキナーゼ型受容体として知られているが、RSK を介した Ser-897 のリン酸化により遊走能が亢進するといった相反した機能も判明している[16-20]。

リガンドと結合した EphA2 はチロシン残基の自己リン酸化を生じ、Rho などの分子と相互作用し細胞接着を亢進させ、細胞遊走を阻害する[29]。しかし、EphA2 はリガンド非依存的な機能を介して細胞内に取り込まれるといった報告がなされており[30]、その機構として Rab ファミリーと呼ばれるエンドサイトーシス関連タンパク質の関与が予想されている。特に Rab11 は EphA2 の小胞輸送とリサイクリングに関わっているとの報告[31]があり、Rab11FIP1 は MDA-MB-231 細胞で高発現し、浸潤能や増殖能を亢進させる機能を有する[32]。以上のようなメカニズムは、細胞内に取り込まれた EphA2 が細胞遊走末端へ再供給される可能性を示唆している。さらに、membrane-anchored membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)による EphA2 の細胞外ドメインの切断がトリガーとなり、EphA2 の細胞内への輸送および細胞間反発、細胞間接合部の分解および高い運動能を持つ細胞における遊走能の亢進を引き起こすとの報告がある[33]。

本研究において、MDA-MB-231 細胞に対する tamoxifen の刺激で MAPK 以下のタンパク質のリン酸化が認められなかったにも関わらず、EphA2 の局在の変化を認め

遊走能が亢進した。MDA-MB-231 細胞は MAPK カスケードの上流に存在する RAS が変異し、下流タンパク質の恒常的な活性化が生じており[34]、ERK や RSK などの RAS 下流のタンパク質のリン酸化が上昇する余地が残されていないため、tamoxifen の刺激によるリン酸化レベルの変化が認められなかったものとする。Tamoxifen に対する耐性能を有した細胞において BCAR3 (breast cancer antiestrogen resistance-3) というタンパク質の発現を認め、特に MDA-MB-231 細胞において高発現を認めるという報告がある[35]。BCAR3 は細胞の浸潤、遊走能を促進することが知られるが、GDP/GTP 交換因子である GEF として Rac1、Cdc42、R-Ras、RalAなどを活性化すると考えられており、BCAR3 と Rab11 との相互作用によって遊走が制御されていることが予想される。今回、MDA-MB-231 細胞に対する tamoxifen の刺激で MAPK 以下のタンパク質のリン酸化が認められなかったにも関わらず、EphA2 の局在の変化を認め遊走能が亢進した結果は、このような RAS-MAPK シグナリング以外の経路の関与が考慮される。今後は、tamoxifen によって GEF である BCAR3 が誘導され Rab などの小胞輸送タンパクと共役し、EphA2 の細胞内輸送やラメリポディアヘリサイクリングが起こるといった局在化の機序を考慮していく必要があり、細胞内輸送に向かう際に EphA2 を選別しているメカニズムのさらなる解析は tamoxifen が腫瘍形成能および腫瘍の進展にどのように影響しているかを明らかにする上で重要である。

これら問題を解決する鍵として考えられているのが短縮型 ER α である。ER α は多重

プロモーター制御を受けており、複数のプロモーターにより発現が調整されている。さらに、非翻訳中間エクソンの選択的な挿入およびスキッピングにより多様な ER α のスプライスバリエントが産生されると判明している[36-40]。ER α 陰性のがん細胞において C 末端領域を欠損した ER α 46 や ER α 36 といった短縮型 ER α の発現が確認されてきた[41,42]。これらの短縮型 ER α は核内受容体として知られてきた従来の ER α と異なり細胞膜近傍に位置していることが判明しており、エストロゲンおよび tamoxifen による MAPK の活性化に関与していると考えられている[8.43]。

本研究により見出された、tamoxifen による EphA2 の非定型的な活性化は抗がん剤である tamoxifen が腫瘍促進的な一面を併せ持つことを明らかとした。今後、このメカニズムがさらに解明されていくことで、tamoxifen によるがん治療がより安全なものへと発展していくことが期待される。

6.総括

本研究において、tamoxifen により RSK を介した EphA2 の非定型的なリン酸化部位である Ser-897 が活性化することが見出された。ER α 陰性細胞である MDA-MB-231 細胞は tamoxifen による刺激で遊走能が促進したが、これは EphA2 のリン酸化ではなく EphA2 の細胞内での局在が変化することで引き起こされていることが示唆された。tamoxifen による腫瘍促進的な有害事象の克服のために、tamoxifen により誘導される RSK-EphA2 経路の変化に対するさらなる検証が必要であると考えられた。

7.謝辞

稿を終えるにあたり、格別なる御指導および御校閲を賜りました富山大学学術研究部・がん細胞生物学研究室 櫻井宏明教授、横山 悟准教授、周 越 助教に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、多大なる御協力と御支援を頂いた富山大学学術研究部医学系歯科口腔外科学講座 野口 誠教授、富原 圭准教授に厚く御礼申し上げます。

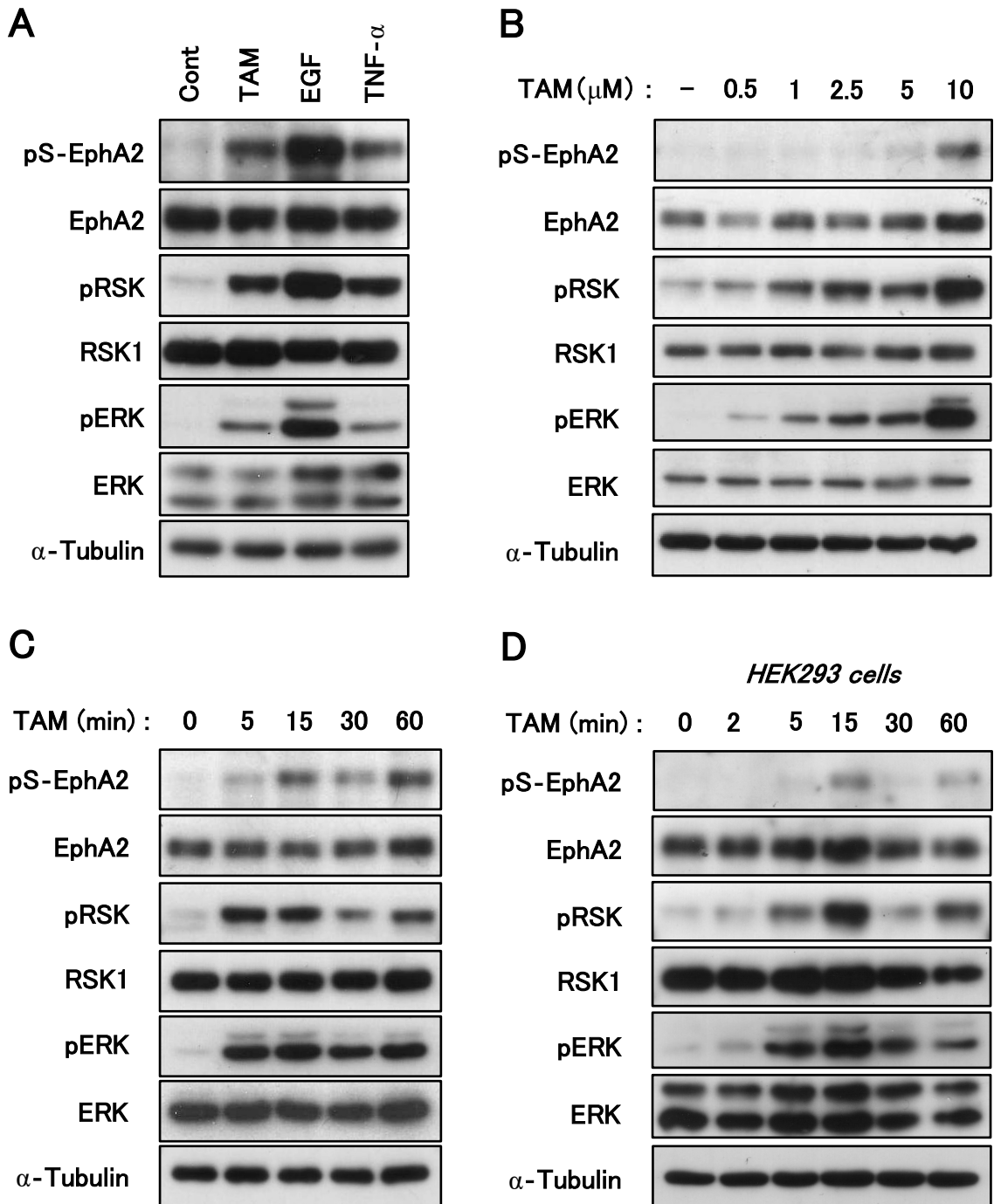


図1. TamoxifenによるEphA2 Ser-97のリン酸化

(A) HeLa細胞に対し10 μ M tamoxifen 10分間、100 nM EGF 15分間および20 nM TNF- α 20分間による刺激を行った。(B) HeLa細胞に対し異なった濃度のtamoxifen 15分間による刺激を行った。(C) HeLa細胞、(D) HEK293細胞に対し10 μ M tamoxifenで示した時間による刺激を行った。抽出した全細胞溶解液に対しimmunoblottingによる解析を行った。使用した抗体はphospho-EphA2 (pS-EphA2)、EphA2、phospho-RSK (pRSK)、RSK1、phospho-ERK (pERK)、ERK、 α -Tubulinおよび β -Actinである。

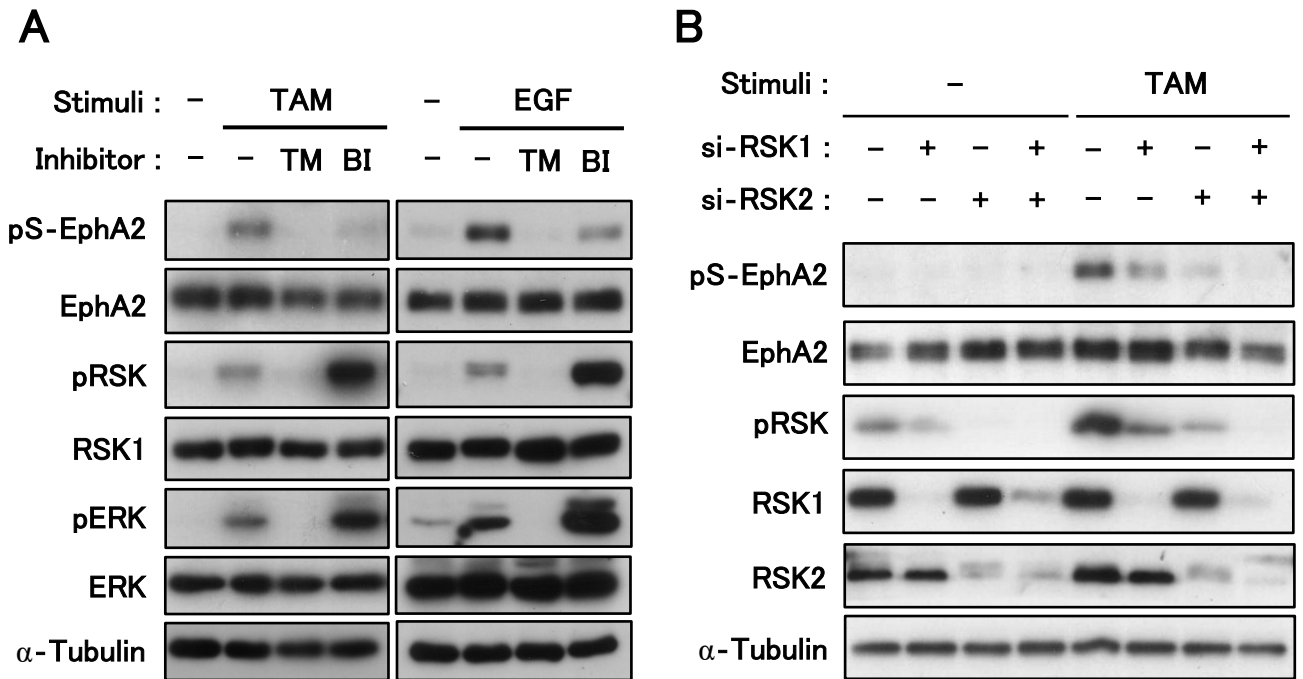
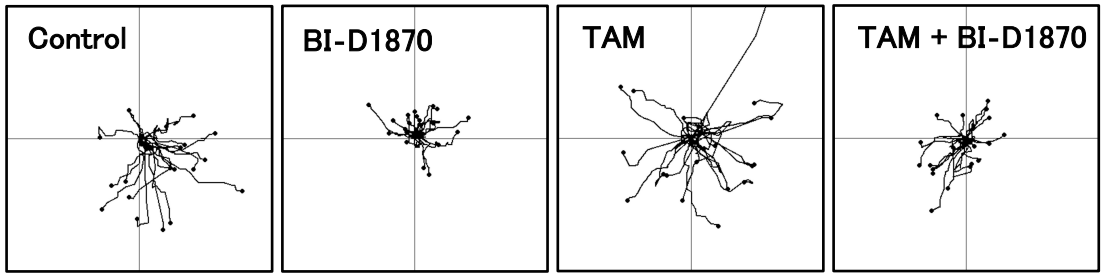


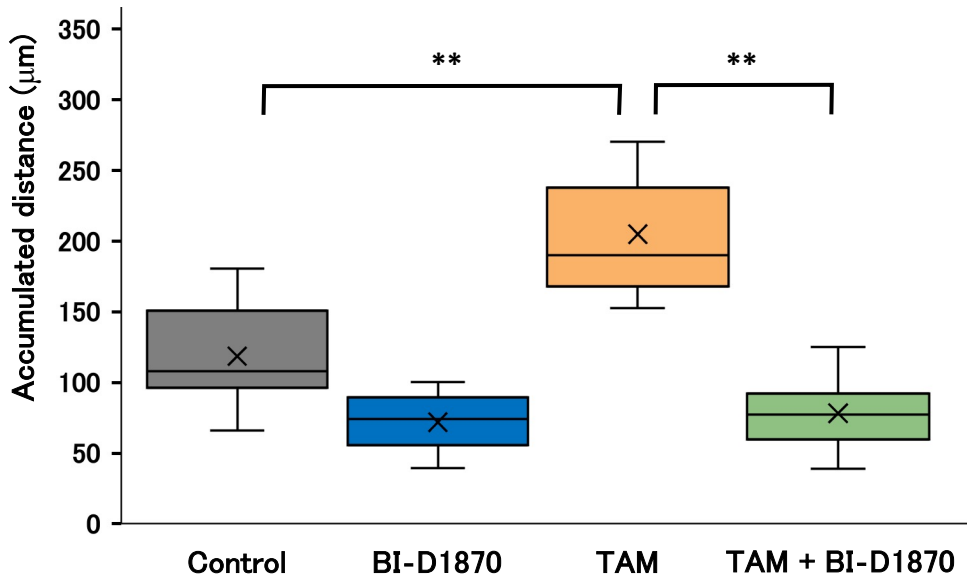
図2. TamoxifenによるRSKを介したEphA2リン酸化の誘導

(A) HeLa細胞に対し0.03 μ M trametinib (TM) および10 μ M BI-D1870 (BI) を30分間前処理し、10 μ M tamoxifenおよび100 nM EGF 15分間による刺激を行った。(B) HeLa細胞へRSK1、RSK2およびネガティブコントロールに対するsiRNAを導入し、72時間培養した後、10 μ M tamoxifen 15分間による刺激を行った。抽出した全細胞溶解液に対しimmunoblottingによる解析を記した抗体を用いて行った。

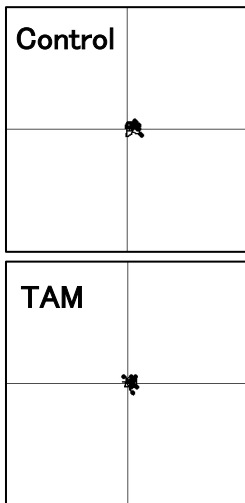
A



B



C



D

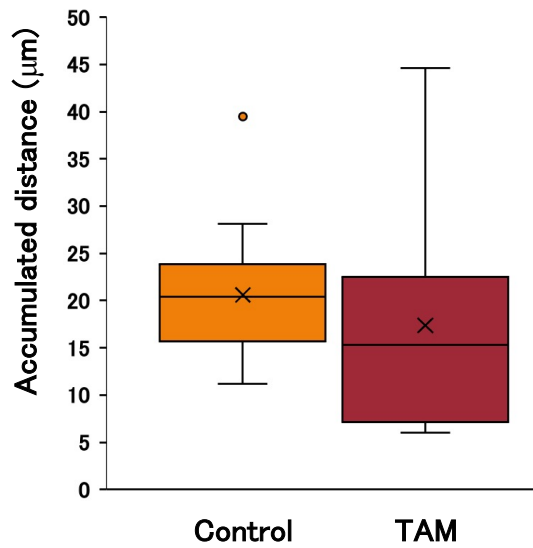


図3. Tamoxifenによる乳がん細胞に対する遊走能の亢進

(A) MDA-MB-231細胞に対し、 $0.03\mu\text{M}$ BI-D1870を30分間前処理し、 $2.5\mu\text{M}$ tamoxifenによる刺激を遊走能測定15分前より行った。ディッシュをタイムラプスイメージングシステムにセットし、120分間の細胞の移動距離の記録および測定を行った。Scatter plotsは細胞の任意の点を連続写真上で追跡することで作成した。(B) 統計学的解析は one-way ANOVA および Tukey's post hoc testを用いて行った。n=20, **p<0.01 (C) MCF7細胞に対しtamoxifenによる刺激を行い、(A)と同様の方法を用いて遊走能の測定を行った。なお、使用するtamoxifenの濃度は $10\mu\text{M}$ とした。(D) 統計学的解析は Student t-testによる2群の比較検定を行った。n=20, *p<0.05

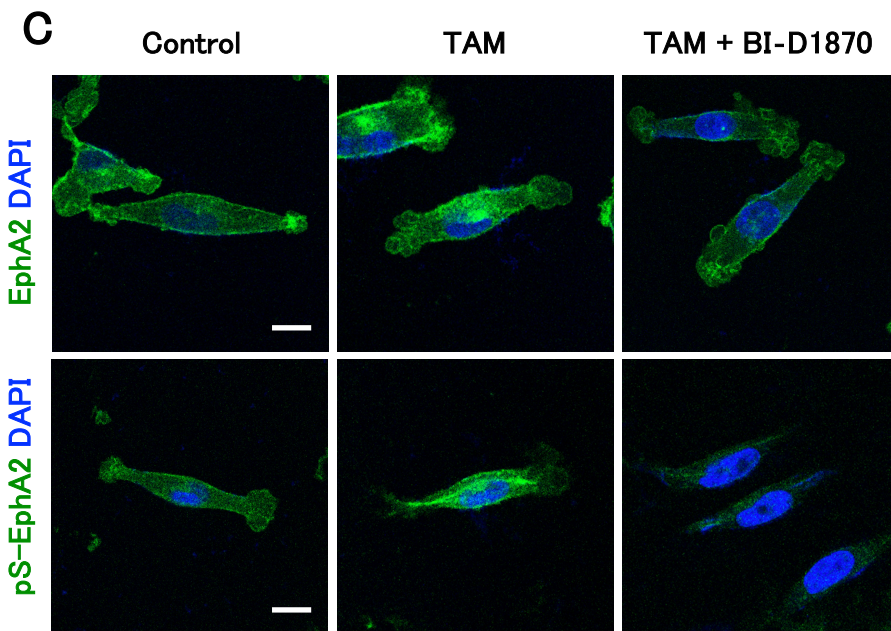
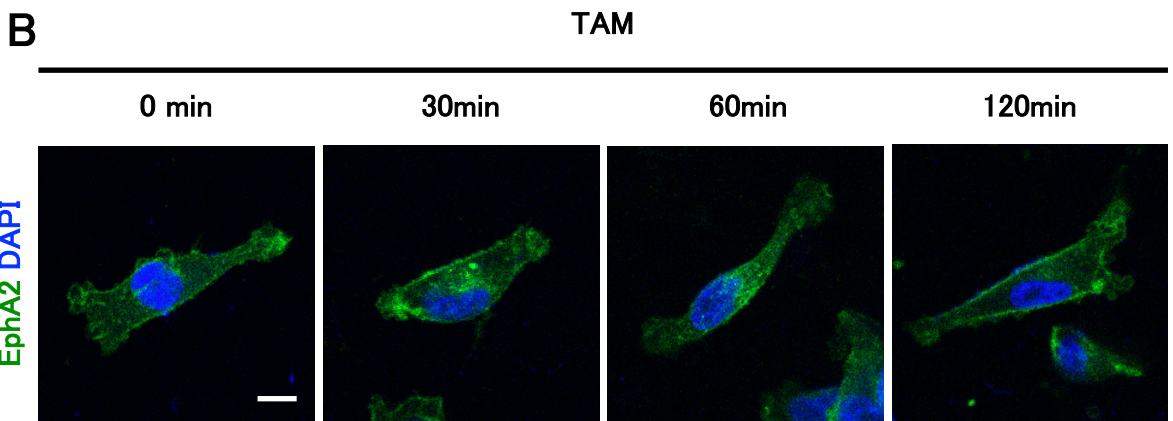
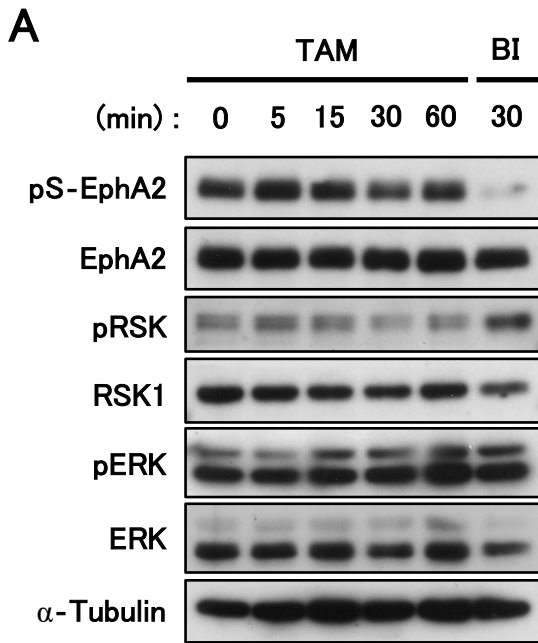


図4. TamoxifenによるEphA2の活性化および細胞内局在への影響

(A) MDA-MB-231細胞に対し2.5 μ M tamoxifenで示した時間による刺激を行った。加えて、10 μ M BI-D1870 (BI) を30分間前処理し、10 μ M tamoxifenで30分間の刺激を行った。(B) MDA-MB-231細胞に対し2.5 μ M tamoxifenを30分間、60分間および120分間でそれぞれ刺激を行った。細胞は固定した後に膜透過処理を行い、EphA2およびDAPIによる免疫蛍光染色を行った。(C) MDA-MB-231細胞は10 μ M BI-D1870を30分間前処理し、2.5 μ M tamoxifen 60分間による刺激を行った。細胞は固定した後に膜透過処理を行い、EphA2、pS-EphA2およびDAPIによる免疫蛍光染色を行った。

9. 引用文献

1. Harvey, J.M., Clark, G.M., Osborne, C.K. & Allred, D.C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **17**, 1474-1481 (1999).
2. Abe, O. et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**, 1687-1717 (2005).
3. Chlebowski, R.T., Schottinger, J.E., Shi, J.X., Chung, J. & Haque, R. Aromatase inhibitors, tamoxifen, and endometrial cancer in breast cancer survivors. *Cancer* **121**, 2147-2155 (2015).
4. Davies, C. et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771-784 (2011).
5. Wei, C.W. et al. Elevated expression of TANK-binding kinase 1 enhances tamoxifen resistance in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E601-E610 (2014).
6. Wang, Q. et al. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER alpha 36(+) breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Research* **28**, 336-358 (2018).
7. Brzozowski, A.M. et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the

- oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758 (1997).
8. Wang, Z.Y. et al. A variant of estrogen receptor-alpha, hER-alpha 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9063-9068 (2006).
 9. Shen, Y.Y. et al. Protein arginine N-methyltransferase 2 reverses tamoxifen resistance in breast cancer cells through suppression of ER-alpha 36. *Oncology Reports* **39**, 2604-2612 (2018).
 10. Shou, J. et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Jnci-Journal of the National Cancer Institute* **96**, 926-935 (2004).
 11. Acconcia, F., Barnes, C.J. & Kumar, R. Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology* **147**, 1203-1212 (2006).
 12. Gottardis, M.M., Robinson, S.P., Satyaswaroop, P.G. & Jordan, V.C. CONTRASTING ACTIONS OF TAMOXIFEN ON ENDOMETRIAL AND BREAST-TUMOR GROWTH IN THE ATHYMIC MOUSE. *Cancer Research* **48**, 812-815 (1988).
 13. Gottardis, M.M. & Jordan, V.C. DEVELOPMENT OF TAMOXIFEN-STIMULATED GROWTH OF MCF-7 TUMORS IN ATHYMIC MICE AFTER LONG-TERM ANTIESTROGEN ADMINISTRATION. *Cancer Research* **48**, 5183-5187 (1988).
 14. Pasquale, E.B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*

- 133**, 38-52 (2008).
15. Wykosky, J. & Debinski, W. The EphA2 Receptor and EphrinA1 Ligand in Solid Tumors: Function and Therapeutic Targeting. *Molecular Cancer Research* **6**, 1795-1806 (2008).
 16. Yeddula, N., Xia, Y.F., Ke, E., Beumer, J. & Verma, I.M. Screening for tumor suppressors: Loss of ephrin receptor A2 cooperates with oncogenic KRas in promoting lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E6476-E6485 (2015).
 17. Wiedemann, E. et al. Regulation of endothelial migration and proliferation by ephrin-A1. *Cellular Signalling* **29**, 84-95 (2017).
 18. Hamaoka, Y., Negishi, M. & Katoh, H. EphA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation. *Cellular Signalling* **28**, 937-945 (2016).
 19. Barquilla, A. et al. Protein kinase A can block EphA2 receptor-mediated cell repulsion by increasing EphA2 S897 phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell* **27**, 2757-2770 (2016).
 20. Zhou, Y. et al. Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2. *Nature Communications* **6** (2015).
 21. Yonehara, K. et al. RSK-mediated non-canonical activation of EphA2 by tamoxifen. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (now revising).
 22. Yamada, K. et al. Different PDGF Receptor Dimers Drive Distinct Migration Modes of the Mouse Skin Fibroblast. *Cellular Physiology and Biochemistry* **51** (2018).

23. McDonnell, D.P. & Wardell, S.E. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer. *Current Opinion in Pharmacology* **10**, 620-628 (2010).
24. Puranik, N.V. et al. Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ER alpha) by various parameters and molecular modelling approach. *Scientific Reports* **9** (2019).
25. Pike, A.C.W., Brzozowski, A.M. & Hubbard, R.E. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **74**, 261-268 (2000).
26. McDonnell, D.P., Wardell, S.E. & Norris, J.D. Oral Selective Estrogen Receptor Downregulators (SERDs), a Breakthrough Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **58**, 4883-4887 (2015).
27. Friedl, A. & Jordan, V.C. ESTRADIOL STIMULATES GROWTH OF ESTROGEN RECEPTOR-NEGATIVE MDA-MB-231 BREAST-CANCER CELLS IN IMMUNODEFICIENT MICE BY REDUCING CELL LOSS. *European Journal of Cancer* **30A**, 1559-1564 (1994).
28. Gu, W.W. et al. Tamoxifen resistance and metastasis of human breast cancer cells were mediated by the membrane-associated estrogen receptor ER-alpha 36 signaling in vitro. *Cell Biology and Toxicology* **33**, 183-195 (2017).
29. Hiramoto-Yamaki, N. et al. Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *Journal of Cell Biology* **190**, 461-477 (2010).
30. Zhuang, G.L., Hunter, S., Hwang, Y. & Chen, J. Regulation of EphA2 receptor endocytosis by SHIP2 lipid phosphatase via phosphatidylinositol 3-kinase-

- dependent Rac1 activation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 2683-2694 (2007).
31. Gundry, C. et al. Phosphorylation of Rab-coupling protein by LMTK3 controls Rab14-dependent EphA2 trafficking to promote cell: cell repulsion. *Nature Communications* **8** (2017).
 32. Zhang, J.Q. et al. RCP is a human breast cancer-promoting gene with Ras-activating function. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 2171-2183 (2009).
 33. Sugiyama, N. et al. EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *Journal of Cell Biology* **201**, 467-484 (2013).
 34. Krueger, J.S., Keshamouni, V.G., Atanaskova, N. & Reddy, K.B. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene* **20**, 4209-4218 (2001).
 35. Schrecengost, R.S., Riggins, R.B., Thomas, K.S., Guerrero, I. & Bouton, A.H. Breast cancer antiestrogen resistance-3 expression regulates breast cancer cell migration through promotion of p130(Cas) membrane localization and membrane ruffling. *Cancer Research* **67**, 6174-6182 (2007).
 36. Higuchi, T. et al. Variation in Use of Estrogen Receptor-alpha Gene Promoters in Breast Cancer Compared by Quantification of Promoter-Specific Messenger RNA. *Clinical Breast Cancer* **14**, 249-257 (2014).
 37. Hirata, S., Shoda, T., Kato, J. & Hoshi, K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **14**, 124-129 (2003).

38. Springwald, A. et al. Identification of novel transcript variants of estrogen receptor alpha, beta and progesterone receptor gene in human endometrium. *Endocrine* **37**, 415-424 (2010).
39. Poola, I., Koduri, S., Chatra, S. & Clarke, R. Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **72**, 249-258 (2000).
40. Hattori, Y. et al. Human C-terminally truncated ER alpha variants resulting from the use of alternative exons in the ligand-binding domain. *Molecular and Cellular Endocrinology* **425**, 111-122 (2016).
41. Li, L., Haynes, M.P. & Bender, J.R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4807-4812 (2003).
42. Wang, Z.Y. et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha 36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha 66. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**, 1023-1027 (2005).
43. Schreihofner, D.A., Duong, P. & Cunningham, R.L. N-terminal truncations in sex steroid receptors and rapid steroid actions. *Steroids* **133**, 15-20 (2018).