

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：13301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790327  
 研究課題名（和文） cMet/HGF受容体ON-OFF機能変換を介した再生・病態・発癌制御の研究  
 研究課題名（英文） Regulation of regeneration, disease and carcinogenesis through the ON-OFF conversion of the cMet/HGF receptor.  
 研究代表者  
 中村 隆弘 (NAKAMURA TAKAHIRO)  
 金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
 研究者番号：70414018

研究成果の概要（和文）：HGF-cMet シグナルの ON-OFF 調節メカニズムは長らく不明であった。cMet-Ser985 のリン酸化が、細胞膜表面に存在する cMet の細胞内への吸収を調節することで、HGF 依存的なシグナル発信を抑制することを明らかにした。さらに、cMet の生物活性は二量体化されたときのみ発現され、モノマーの場合はたとえ強いリン酸化が引き起こされていても決して発揮されないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Regulation mechanisms of the ON-OFF conversion of the HGF-cMet signal had remained to be clarified. We found that phosphorylation of the cMet-Ser985 was involved in suppression of the HGF-dependent cMet bioactivity through internalization of the cMet intracellularly from the cell surface. Moreover, we found that cMet exerts its biological activities only when they were dimer, and never exerts when monomer, even if strongly phosphorylated.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：HGF, Met, 組織再生, シグナル伝達, 細胞増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

HGF は cMet を介して肝臓をはじめ複数の組織・臓器の発生や再生を支えている (*BBRC* 239: 639, 1997; *Trends Cell Biol.* 8:404, 1998; *Kid Int* 59:2023, 2001). 一方、HGF-Met シグナルの活性化は多くの癌細胞の浸潤・転移を強力に促す他、抗癌剤耐性の獲得など、癌の悪性化や再発に深く関与している (*Int. J. Cancer* 119: 477, 2006; *Nat. Rev. Cancer.* 2:289 2002). これまでに HGF-Met シグナルの活性化や生物活性発現に至るメカニズムはよく理解されてきたが、「なぜ組織・臓器は固有の組織形態や大

きさに達した時点で過剰な増殖・再生に至ることなく再生を完了するか」といった素朴な疑問の解明が残されている。HGF-Met 系を研究の入口として、形態形成や再生の停止機構、停止破綻としての発癌や癌悪性化の理解につながるものと考えられる。

Met 受容体のチロシンリン酸化は HGF が細胞外ドメインと結合することで誘導されるが、Met 受容体の抑制機能を担っているのが Juxtamembrane (JM) ドメインである。JM ドメイン内の Ser985 がリン酸化されると HGF 依存的 Met 活性化は抑制される他 (*JBC* 279:26445, 2004)、Tyr1003 は Cbl を介した

Met 分解に関与する (*Mol Cell* 18:995, 2001). したがって JM ドメインを介した Met 活性化抑制のメカニズムと生理機能の解明は、増殖因子受容体の自己抑制を介した発生・再生・細胞癌化の制御機能を理解することにつながる。

## 2. 研究の目的

本研究は、生化学、分子生物学、細胞生物学的手法を用いて、JM ドメインを介した Met のキナーゼや生物活性発現の OFF 制御メカニズムの解析を行い、増殖因子受容体に備わっている自己抑制機能のメカニズムと意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 初代培養肝細胞を用いた Met の活性化と Met-Ser985 リン酸化の生化学的解析
- (2) マウス肝再生をモデルとする、Met の活性化と Met-Ser985 リン酸化の生化学的解析
- (3) ダイマライザーを用いて人工的に二量体化させることのできる cMet あるいは  $\Delta$  JM-Met を用いたシグナル発信能力の生化学的解析

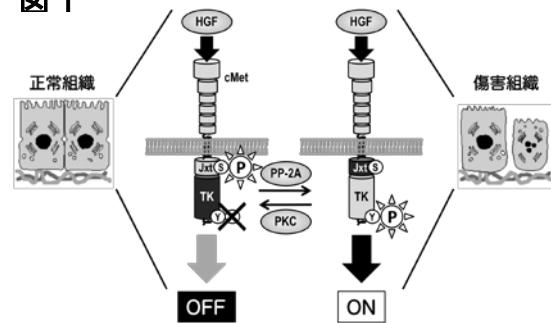
## 4. 研究成果

(1) 初代培養肝細胞において、NaFあるいはTPA処理によりcMet-Ser985が強制的にリン酸化された状態では、HGF処理によるMetシグナルの生物活性発現が抑制された。この時、cMet-Ser985がリン酸化されたMetはエンドサイトーシスによって細胞表面から細胞内に吸収されることを明らかにした (Nakayama et al., 2013)。

(2) マウスの無傷の肝臓において cMet-Ser985 はリン酸化されている一方、CCL4 投与により肝傷害を引き起こさせた肝臓において cMet-Ser985 は脱リン酸化され、それとは逆にチロシンのリン酸化 (活性化) が引き起こされることを見出した。再生のピークを過ぎると cMet-Ser985 は再びリン酸化され、それとは逆に Met チロシンの脱リン酸化が引き起こされることから、cMet-Ser985 のリン酸化と Met チロシンのリン酸化は相反

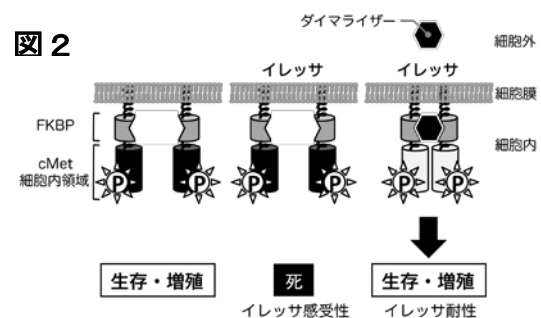
的な調節を受けていることが明らかとなった (図 1)。

図 1



(3) 野生型 Met (WT) あるいは JM ドメイン欠損変異 Met ( $\Delta$  JM) の細胞内領域と二量体形成ユニット (FKBP) とを融合させたキメラ蛋白質 (FKBP-cMet) を導入された HCC827 肺がん細胞は、ダイマライザー添加による cMet シグナルの生物活性として、イレッサ耐性を獲得した。一方、 $\Delta$  JM の細胞内領域と二量体形成ユニットとを融合させたキメラ蛋白質を導入された HCC827 細胞はダイマライザー添加によって、イレッサ耐性を獲得したが、その強さや持続性は FKBP-cMet WT を導入されたもの同程度であった。一方、強制発現させた FKBP-cMet は既に高レベルでリン酸化されている一方、イレッサ耐性獲得は認められず、ダイマライザー添加による FKBP-cMet の二量体化によって初めてイレッサ耐性獲得が認められた (図 2)。

図 2



これらの結果から、Met-JM 領域の Ser985 リン酸化は、Met 受容体の細胞表面から細胞内への動態制御を調節することによって、HGF 依存的な Met 活性化を OFF に制御するメカニズムであり、組織の傷害や再生の完了を察知し、cMet 受容体の過剰な活性化の抑制ならびに再生の完了に関与することが示唆された。一方、cMet が生物活性を発現するためにはリン酸化されるだけでは不十分であり、二量体

化されることが不可欠であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

① Michikoshi H, Nakamura T (contributed equally), Sakai K, Suzuki Y, Adachi E, Matsugo S, and Matsumoto K.  $\alpha$ -Lipoic Acid-Induced Inhibition of Proliferation and Met Phosphorylation in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Lett.*, in press, 2013. 査読有

URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438351300236X>

② Nakayama M, Sakai K, Yamashita A, Nakamura T, Suzuki Y, and Matsumoto K. Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine*, in press, 2013. 査読有

URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466613001543>

③ Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, and Yano S. The novel phosphoinositide 3-kinase-mammalian target of rapamycin inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib resistance of epidermal growth factor receptor mutant lung cancer cells triggered by hepatocyte growth factor. *Int J Cancer*, in press, 2013. 査読有

DOI:10.1002/ijc.28034

④ Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Kokuba Y, Nakamura T, Matsumoto K, and Otsuji E. HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *Int J Oncol.*, Vol. 42: no. 2 pp. 535-542, 2013. 査読有

DOI:10.3892/ijo.2012.1728

⑤ Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K,

Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, and Yano S. Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor for overcoming erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Mol Cancer Ther.*, Vol. 11: no.10 pp. 2149-2157, 2012. 査読有  
DOI:10.1158/1535-7163.MCT-12-0195

⑥ Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, and Yano S. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. *Am J Pathol.*, Vol. 181: no.3 pp.1034-1043, 2012. 査読有

DOI:10.1016/j.ajpath.2012.05.023

⑦ Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T, and Yano S. Paracrine Receptor Activation by Microenvironment Triggers Bypass Survival Signals and ALK Inhibitor Resistance in EML4-ALK Lung Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, Vol. 18: no.13 pp.3592-3602, 2012. 査読有

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-2972

⑧ Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, and Yano S. Hsp90 Inhibition Overcomes HGF Triggering Resistance to EGFR-TKIs in EGFR-Mutant Lung Cancer by Decreasing Client Protein Expression and Angiogenesis. *Journal of Thoracic Oncology*, Vol. 7: no.7 pp.1078-1085, 2012. 査読有

DOI:10.1097/JTO.0b013e3182519a2c

⑨ Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, and Yano S. Met Kinase Inhibitor E7050 Reverses Three Different Mechanisms of Hepatocyte Growth Factor - Induced Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in EGFR Mutant Lung Cancer. *Clinical Cancer*

*Research*, Vol. 18: pp.1663-1671, 2012.  
査読有

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1171

⑩ Xu Q, Nakayama M, Suzuki Y, Sakai K, Nakamura T, Sakai Y, and Matsumoto K. Suppression of acute hepatic injury by a synthetic prostacyclin agonist through hepatocyte growth factor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Vol. 302: no. 4 pp. G420-429, 2012. 査読有

DOI:10.1152/ajpgi.00216.2011

⑪ Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, and Yano S. Hepatocyte Growth Factor Induces Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, Vol. 7: no. 2 pp. 272-280, 2012. 査読有

DOI:10.1097/JTO.0b013e3182398e69

⑫ Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Imizu T, and Matsumoto K. 3-D collagen-dependent cell surface expression of MT1-MMP and MMP-2 activation regardless of integrin b1 function and matrix stiffness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 412: pp. 98-103, 2011. 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2011.07.050

⑬ Taiyoh H, Kubota T, Fujiwara H, Matsumura A, Murayama Y, Okamoto K, Ichikawa D, Ochiai T, Nakamura T, Matsumoto K, Nnakamura T, and Otsuji E. NK4 Gene Expression Enhances 5-Fluorouracil-induced Apoptosis of Murine Colon Cancer Cells. *ANTICANCER RESEARCH*, Vol. 31: pp. 2217-2224, 2011. 査読有

URL:<http://ar.iiarjournals.org/content/31/6/2217.long>

#### [学会発表] (計6件)

① 中村隆弘, 肺がん細胞を用いたWnt/beta-cateninシグナル抑制におけるKremen1の機能解析, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日, ロイトン札幌 (北海道)

② 竹内伸司, Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

③ 道越洗充, ヒト肺がん細胞に対するリポ酸の増殖抑制作用とそのメカニズム, 第63回

日本生物工学会大会, 2011年9月日, 東京農工大学 (東京都)

④ 中村隆弘, Functional Analyses of the Kremen in Lung Cancer Cells through Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 京都国際会議場 (京都府)

⑤ 徐慶, Suppression of acute hepatic injury by prostacyclin agonist through enhancing hepatocyte growth factor expression in mice, 日本分子生物学会北陸支部第11回シンポジウム, 2011年5月25日, 石川県立音楽堂 (石川県)

⑥ 中村隆弘, Functional Analyses of the Kremen in Lung Cancer Cells through Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway, 日本分子生物学会北陸支部第11回シンポジウム, 2011年5月25日, 石川県立音楽堂 (石川県)

#### [図書] (計1件)

① Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, and Matsumoto K. Significance, Mechanisms, and Progress of Anticancer Drugs Targeting HGF-Met. *Advances in Cancer Therapy*, 2011 Nov, Chapter 14 pp.313-333.

#### [その他]

ホームページ等

[http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shu\\_youdoutaiseigyo/index.html](http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shu_youdoutaiseigyo/index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 隆弘 (NAKAMURA TAKAHIRO)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
研究者番号: 70414018

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし