

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

#### **Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway**

(サイトケラチン 19 ヘッドドメインは HER2 と細胞質内で相互作用し HER2-Erk 経路の活性化を誘導する)

大塚智昭, 阪口政清, 山本寛斉, 富田秀太, 高田尚良, 枝園和彦, 橋田真輔, 高田友子, 渡邊元嗣, 諏澤 憲, 宗 淳一, 陳 友誼, 佐藤博紀, 難波 圭, 鳥越英次郎, 佃 和憲, 吉野 正, 三好新一郎, 豊岡伸一

Scientific Reports (掲載予定)

平成 26 年 9 月 第 73 回日本癌学会学術総会に発表

平成 27 年 4 月 AACR Annual Meeting 2015 に発表

平成 27 年 6 月 第 58 回関西胸部外科学会学術集會に発表

平成 28 年 2 月 Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics に発表

# 主論文

## Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway

(サイトケラチン 19 ヘッドドメインは HER2 と細胞質内で相互作用し HER2-Erk 経路の活性化を誘導する)

### 【緒言】

HER2 はヒト上皮成長因子受容体ファミリータンパクの 1 つであり、多くの悪性腫瘍において発現している。HER2 シグナリングの解析は、HER2 関連の癌発生の解明や新たな治療法の発展において非常に重要である。以前、我々は家族性肺癌の原因が HER2 膜貫通ドメイン(TD)の変異であることを解明した。TD は HER2 の二量体形成に重要である。我々はこの変異 HER2 の二量体形成のパートナーを調査する過程において、野生型 HER2 とサイトケラチン 19(KRT19)が結合することを発見した。KRT19 は中間型フィラメントであり、様々な癌に過剰発現することが知られており、また KRT19 断片は肺癌の腫瘍マーカーであるシフラでもある。今回我々は KRT19 と HER2 の結合部位の同定と HER2 シグナル伝達経路への作用を明らかにした。

### 【材料と方法】

#### 細胞株

HEK293T, HBEC5KT, OUMS-24, A549, NCI-H1781, NCI-H2170, PC-9 を使用した。

#### ウェスタンブロット, 免疫沈降法, リガンド刺激実験

定型的手法でウェスタンブロットおよび免疫沈降法を行った。全細胞成分の抽出には M-PER を使用した。細胞質成分と膜成分のタンパク質抽出には cell fractionation kit を使用した。信号の検出に ECL plus Western blotting detection reagents を使用した。免疫沈降法にモノクローナル抗 HA タグアガロース, グルタチオンセファロース 4B を使用した。抗 KRT19 抗体ビオチン化には Biotin Labeling Kit-SH を使用した。EGF および NRG1 をそれぞれ EGFR および HER3 のリガンドとしてリガンド刺激実験に使用した。NRG1 刺激は 100ng/ml の濃度で 1h 培養の後回収, EGF 刺激は 10ng/ml の濃度で 1h 培養の後, 各サンプルを回収した。

#### プラスミドベクターの作成とトランスフェクション

pID-SMART (C-TSC)プラスミドベクターを遺伝子の強制発現に使用した。導入した cDNA は以下の通りである。COOH 末端に HA-6His タグをつけた野生型ヒト HER2 全長, HER2 断片 (Ex: 1-652 aa, KD: 720-987 aa, C-Ter: 988-1255 aa, ΔC-Ter: 1-987 aa), TD 変異 HER2, EGFR 全長, MET 全長を作成した。COOH 末端に Flag-6His タグをつけた HER2 全長, EGFR 全長, HER3 全長を作成した。COOH 末端に Flag-6His タグをつけた KRT19 全長, KRT19 断片 (T1: 1-387aa, T2: 1-243 aa, T3: 1-133, T4: 1-79 aa, T5: 80-400 aa, T6: 80-243 aa, T7: 244-400 aa)を作成した。トランスフェクションには FuGENE-HD を使用した。

#### 質量分析法

目的とする細胞溶解物質をアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、鍍銀染色を行った。目的とするタンパク質バンドを切り出し、GENOMINE 社の LC-MS/MS サービスに提出した。

#### 組み換え KRT19-T4, HER2 C-ter の精製

T4 と C-Ter のプラスミドベクターを無血清培養した HEK293T に FuGENE-HD, Opti-MEM 培地を用いてトランスフェクションし、48 時間後にサンプルを回収, T4 は抗 DYKDDDDK 抗体ビーズカラム, C-Ter は抗 HA 抗体ビーズカラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーにかけた。

### 組み換え GST-KRT19 および GST-T4 の精製

KRT19 全長(野生型および S35D 変異;リン酸化ミミック), T4(野生型および S35D 変異)は pGEX-6P1 ベクターに導入され, GST 融合状態で *E. coli* に発現させた. 細菌内に発現された GST 融合タンパク質はグルタチオンセファロース 4B カラムを用いて精製された.

### 細胞増殖解析

細胞増殖解析は IncuCyte ZOOM Live Cell Imaging を用いて計測した. IncuCyte ソフトウェアで各ウェルの細胞密度を経時的に計測した.

### 免疫蛍光染色

定型的手法で細胞の免疫蛍光染色を行った. 固定に 4%パラホルムアルデヒドを使用. 透過処理に 100%エタノールを使用. 一次抗体に抗 HER2 ウサギ抗体, 抗 KRT19 マウス抗体を使用. 二次抗体に Alexa Fluor 594 抗ウサギ抗体, Alexa Fluor 488 抗マウス抗体を使用. Vectashield mounting medium with DAPI を滴下しカバーガラスを乗せた.

### 免疫組織染色

肺癌組織は岡山大学病院にて 2013 年 4 月から 12 月までに外科的に摘出されたものを無作為に抽出して得た検体 86 例を使用した. KRT19 染色は定型的手法で行った. HER2 染色は Ventana 自動免疫染色装置を使用した. HER2 および KRT19 のスコア化は Hercep test に準じて行われた.

### RNA 干渉実験

NCI-H1781 および NCI-H2170 に対し siRNA を用いて RNA 干渉を行った. 導入には Neon トランスフェクションシステムを使用した. Silencer Select siRNA KRT19 s7998, Silencer Select siRNA RebB2 s611, Silencer Select Negative Control #2 siRNA を使用. 電気穿孔法で導入した.

### 統計学的解析

統計学的解析には EZR を使用した.  $P < 0.05$  を有意差ありとした. 国立がん研究センター(NCC)のマイクロアレイデータ, the cancer genome atlas (TCGA)の肺腺癌患者のトランスクリプトームデータを使用した. 分子的基盤を調べるためにこれらのデータベースを用いて Gene set enrichment analysis を行った.

## **【結果】**

### HER2 結合タンパク質としての KRT19 の発見

いくつかの肺癌細胞株と HEK293T に *HER2* をトランスフェクションさせ, 免疫沈降法を用いてサンプルを回収したところ A549 細胞において 40kDa のバンドが観察された. このバンドを質量分析したところ KRT19 であった. HEK293T および A549 に HER2 と KRT19 を同時導入したところ, 両者において HER2 と KRT19 の結合が確認され, また KRT19 が HER2 リン酸化に関わっていることがわかった. また同様の実験を HER2, EGFR, MET で行ったところ KRT19 の結合は HER2 特異的なものであった.

### 肺癌細胞における HER2 および KRT19 発現

HEK293T, HBEC5KT, A549, NCI-H1781, NCI-H2170 をウェスタンブロットで解析したところ NCI-H1781 および NCI-H2170 において HER2, KRT1 は共に強発現していた. KRT19 の局在を調べるために NCI-H2170, PC9, さらには siHER2 を導入した NCI-H2170 を免疫蛍光染色したところ, HER2 陽性の NCI-H2170 では細胞膜に, HER2 陰性の PC9 および siHER2 導入 NCI-H2170 では細胞質に局在していた. ウェスタンブロットにおいても KRT19 局在は同様の結果を得た. 同様の結果が肺癌組織の免疫組織染色からも得られ, KRT19 発現と KRT19 局在は HER2 発現と有意に相関していた. また, ビオチン-アビジン相互作用を用いて KRT19 を回収したところ, PC9 と比較し NCI-H2170 で KRT19 のリン酸化が起っていた.

### KRT19-HER2 結合ドメインの決定

KRT19 および HER2 の全長および各断片プラスミドベクターを作成し、それぞれを同時導入したところ、KRT19 は NH2 末端である T4 が、HER2 は COOH 末端である C-ter が結合ドメインであることが解明され、この T4 が細胞内で HER2 リン酸化に関わっており下流シグナルである Erk を活性化させていた。さらに組み換え KRT19 を細胞外より投与することにより KRT19 全長は細胞外領域においても HER2 を活性化させていることがわかった。T4 は細胞外領域には関与しなかった。

### KRT19, リガンド存在下における HER2 下流シグナル活性

HER2 および Erk 経路は KRT19 全長および T4 導入によって活性化された。この Erk 経路活性は NRG1 刺激下の HER3 の存在や EGF 刺激下の EGFR の存在に関わらず生じるものであった。

### KRT19 抑制下における HER2 シグナルと細胞増殖

siRNA を用いて NCI-H1781 および NCI-H2170 の KRT19 を抑制したところ、HER2 リン酸化および Erk リン酸化が抑制された。また、細胞増殖を IncuCyte ZOOM で経時的に観察すると KRT19 抑制下では両者とも細胞増殖が抑制されていた。

### KRT19 mRNA 発現と予後

NCC および TCGA のデータベースを解析したところ、HER2 mRNA 高発現の症例のうち KRT mRNA 高発現の群は KRT mRNA 低発現の群より予後不良であった。

### Gene set enrichment analysis

NCC および TCGA のデータベースに対して hallmark gene set を用いて Gene set enrichment analysis を行ったところ、HALLMARK\_GLYCOLYSIS gene set が有意に上昇していた。また、C2 curated gene set を用いて同様に解析したところ、Ras 関連 gene set が有意に上昇していた。

### **[考察]**

今回の研究において我々は KRT19 が細胞内で結合し、HER2 とその下流にある Erk 経路が活性化することを発見し、KRT19 が癌発生に関わる分子であることが示唆された。肺癌組織において HER2 発現と KRT19 発現には有意な相関があり、HER2 存在下では KRT19 の局在も変化し、HER2、KRT19 共発現の群は予後不良であったこともわかった。

KRT19 の局在が変化するメカニズムは未解明であるが、KRT19 リン酸化は HER2 との結合能に変化しない一方、HER2 増幅肺癌において KRT19 リン酸化が亢進していたため、KRT19 リン酸化が KRT19 輸送に関与する可能性が示唆された。

サイトケラチンの悪性腫瘍における役割は未解明なものが多いが、サイトケラチンの主な役割は組織構造の補助、細胞骨格、細胞運動、そしてシグナル調整である。KRT19 は肝細胞癌において癌の浸潤に関与する、さらには KRT19 陽性肝細胞癌は幹細胞に見られるような自己複製能をもつという報告もある。今回我々は KRT19 が細胞膜で HER2 に結合することにより細胞内における HER2 シグナルを活性化することを発見した。

KRT19-HER2 結合は Akt 経路ではなく Erk 経路のみを活性化し、HER2 と EGFR や HER3 とのヘテロダイマーには関与しないことが示唆された。

以前、KRT19 が HER2 と細胞外領域で結合し HER2 活性に関わるという報告があったが、我々の研究により、細胞内領域においても HER2 結合と HER2 活性が起こることが解明された。この細胞内での機能は KRT19 の T4 と HER2 の C 末端が非常に重要である。

公共のデータベースから KRT19、HER2 共陽性は肺腺癌の予後不良因子であった。KRT19-HER2 結合ドメインは同定できており、今後はこの結合を標的とした治療の研究が望まれる。

### **[結論]**

今回我々は KRT19 の NH2 末端ドメインが HER2 の COOH 末端と結合し、HER2 活性および下流の Erk 経路を活性化することを発見した。この発見は KRT19 が肺癌治療において新たな治療標的になることを示唆している。