

EphA2 によるグリオブラストーマの細胞増殖制御機構  
に関する研究

2022

田村（濱岡） 裕穂

## 目次

緒言	3
第1章 <i>EphA2</i> は <i>MEK/ERK/RSK</i> 経路を介してグリオブラストーマの細胞増殖を促進する	6
【実験方法】	7
【実験結果】	10
第1節 <i>EphA2</i> は EGF 刺激によるグリオブラストーマの細胞増殖促進に関与する	10
第2節 EGF 刺激により <i>MEK/ERK/RSK</i> 経路を介して <i>EphA2</i> の S897 がリン酸化される	12
第3節 EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖の促進には <i>RSK</i> を介した <i>EphA2</i> の S897 リン酸化が必要である	14
【考察】	16
第2章 <i>EphA2</i> のチロシンキナーゼ活性を介して <i>EphA2</i> の S897 リン酸化が促進され、グリオブラストーマの細胞増殖が促進される	18
【実験方法】	19
【実験結果】	20
第1節 <i>EphA2</i> のチロシンキナーゼ活性を介して S897 のリン酸化が促進される	20
第2節 <i>EphA2</i> のチロシンキナーゼ活性を介して <i>ERK</i> のリン酸化が誘導される	22
第3節 <i>EphA2</i> による S897 のリン酸化促進には <i>ERK</i> の活性が必要である	23
第4節 <i>EphA2</i> のチロシンキナーゼ活性を介して細胞増殖が促進される	23
【考察】	24
第3章 <i>Filamin A</i> は <i>EphA2</i> と複合体を形成し、S897 リン酸化を促進してグリオブラストーマ細胞の増殖を促進する	26
【実験方法】	26
【実験結果】	28
第1節 <i>Filamin A</i> は <i>EphA2</i> と複合体を形成する	28

第2節 Filamin A の発現抑制により EGF 刺激によるグリオブラストーマの細胞増殖の促進が抑制される	30
第3節 Filamin A のノックダウンにより EphA2 によるグリオブラストーマ細胞の増殖促進が抑制される	30
第4節 Filamin A のノックダウンにより EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化の促進が抑制される	31
【考察】	38
結論	40
略語表	41
謝辞	43
論文発表目録	44
引用文献	45

## 緒言

受容体型チロシンキナーゼである Eph 受容体 (Eph) は、隣接する細胞同士の接触により、細胞膜に局在するリガンドである ephrin と結合する。Eph と ephrin が結合すると、双方が活性化され、下流の分子を活性化し、シグナルを伝達する。Eph-ephrin シグナルは発生過程における細胞の移動や局在制御、神経軸索ガイダンスの制御で重要な役割を果たしている。一方、Eph、ephrin の発現が正常組織とがん組織で異なる例が様々ながんで報告されており、Eph-ephrin シグナルとがんとの関連が注目されている (Boyd, Bartlett and Lackmann, 2014; Kania and Klein, 2016)。Eph の一つである EphA2 は様々ながんで発現が亢進していることや、発現量とがんの予後に相関関係があることが数多く報告されている (Wykosky and Debinski, 2008)。

グリオブラストーマは悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、またその悪性度は最も高いグレード4に分類される。治療として、外科的切除や放射線治療に加えてアルキル化剤であるテモゾロミドによる化学療法が行われているが、生存期間中央値は未だ10ヶ月程度であり、極めて予後が悪いのが現状である (Stupp *et al.*, 2005; Ostrom *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017)。グリオブラストーマで、Eph、ephrin の発現が正常脳組織と比較して変化している例が多数報告されている (Nakada, Hayashi and Hamada, 2011)。EphA2 は Eph の中でも、乳がん、メラノーマ、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、膵臓がん、胃がん、食道がん、大腸がん、子宮頸がんなど様々な組織のがんで発現が亢進しており、発現量と予後の悪さに相関関係があることが多数報告されており、がんの治療のターゲット分子として注目されている。グリオブラストーマは、極めて予後が悪いがんの一つであり、効果的な分子標的薬は现阶段ではほとんどないのが現状であるため (Taylor *et al.*, 2019)、悪性化を引き起こす分子メカニズムを明らかにし、新たなターゲット分子による薬物治療が期待されている。EphA2 は、グリオブラストーマにおいて正常な脳組織と比較して発現が亢進しており、EphA2 の発現量とグリオブラストーマの予後の悪さとの間には正の相関関係があることが報告されている (Wykosky *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008)。EphA2 と最も親和性が高いリガンドは ephrin-A1 である。EphA2 が様々ながんで発現が上昇しているのに対して、ephrin-A1 は様々ながんで発現が低下していることが報告されている。Ephrin-A1 を介したシグナルは、がん細胞の増殖、運動性を抑制することが報告されている。EphA2 と ephrin-A1 のがん細胞における発現の増減の違いから、EphA2 はリガンド非依存的にがんの悪性化を引き起こす可能性が考えられる。ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ

(PI3K) /Akt 経路は、PTEN の不活性型変異や Akt の遺伝子の重複により、グリオブラストーマで亢進していることが報告されており、EphA2 のアミノ酸配列には、Akt の基質のリン酸化モチーフである R-X-R-X-X-S/T が細胞内ドメインに 5 箇所存在する。EphA2 によるがん悪性化のメカニズムに関しては、前述の 5 箇所の Akt の基質のリン酸化モチーフの中の 1 つに含まれる、EphA2 の細胞内のキナーゼドメインと sterile alpha motif (SAM) ドメインの間に存在する 897 番目のセリン (S897) がリン酸化されることにより、グリオブラストーマ細胞の運動性・浸潤性が促進されることが報告されている(Miao *et al.*, 2009)。しかしながら、EphA2 によるがん悪性化に関わる分子や、どのような分子を介して EphA2 の S897 リン酸化が起こるのかについては、不明な部分が多く残されていた。そこで本研究では、EphA2 によるがんの悪性化促進に関わる分子メカニズムを EphA2 の S897 リン酸化に着目して検討を行った。第 1 章では、上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナルと EphA2 との関連について、グリオブラストーマ細胞に EGF 刺激を加えることにより、MEK/ERK/RSK 経路が活性化され、RSK により EphA2 の S897 がリン酸化されることにより細胞増殖が促進されることを明らかにした。第 2 章では、EphA2 の発現亢進と EphA2 の S897 リン酸化との関連について、EphA2 が過剰発現することにより EphA2 のキナーゼ活性が上昇し、MEK/ERK 経路が活性化され、EphA2 の S897 のリン酸化が促進されることでグリオブラストーマ細胞の増殖が促進されることを明らかにした。第 3 章では、EphA2 と結合する分子を検証し、EphA2 と複合体を形成する分子としてアクチン結合タンパク質 filamin A を同定し、filamin A が EphA2 の S897 リン酸化を促進することでグリオブラストーマ細胞の増殖が促進されることを明らかにした。これらの研究成果について、以下に論述する (下図)。

## 正常細胞（発生過程）



## がん細胞

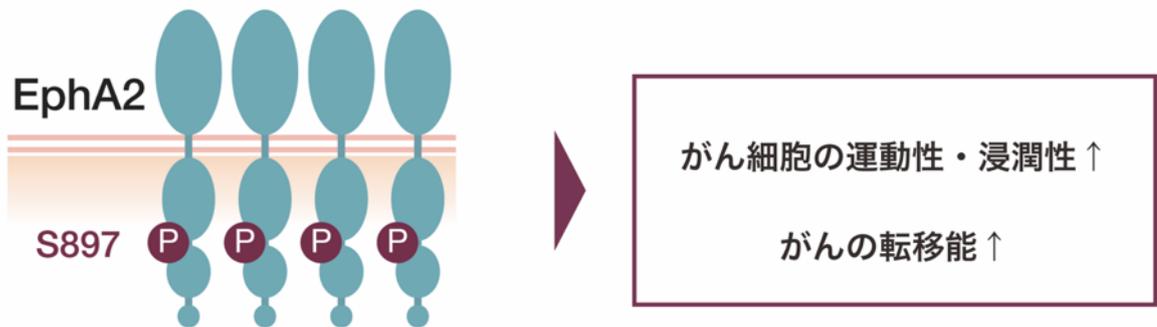


図 正常細胞における Eph-ephrin シグナルの役割（上段）  
がん細胞における EphA2 の役割（下段）

## 第1章

### EphA2 は MEK/ERK/RSK 経路を介してグリオブラストーマの細胞増殖を促進する

受容体型チロシンキナーゼの一つ EGFR は、Ras/Raf/MEK/ERK 経路、PI3K/Akt 経路を介して、細胞の増殖、生存率を制御しており、様々ながんで発現の上昇や遺伝子の変異が報告されている(Roskoski Jr, 2014)。グリオブラストーマでは、EGFR 遺伝子の変異や増幅が高頻度で見られ、特に細胞外ドメインの一部を欠損した常時活性型変異体が高頻度で見られることが報告されている。EGFR の遺伝子変異はグリオブラストーマにおける遺伝子変異の中で最も高頻度で見られ、EGFR の常時活性型変異体を発現しているグリオブラストーマでは野生型の EGFR を発現しているグリオブラストーマと比較して増殖能、アポトーシス耐性能が亢進していることが報告されている(Brennan *et al.*, 2013; Furnari *et al.*, 2015)。しかしながら、グリオブラストーマにおいて EGFR とどのような分子が相互作用しているのか、EGFR シグナルが細胞にどのような変化をもたらすのかにかんしては報告があまりなかった。Akt により EphA2 の S897 がリン酸化されることにより、グリオブラストーマの細胞の運動性が促進されることが報告されていた(Miao *et al.*, 2009)。

P90 ribosomal S6 kinase (RSK) は、Ras/Raf/MEK/ERK 経路の下流で、ERK によりリン酸化されることで活性化されるセリンスレオニンキナーゼである。RSK と Akt はどちらも AGC キナーゼファミリーに属し、基質のリン酸化モチーフが共通している。RSK は、様々な転写因子や酵素をリン酸化し、それらの活性を調節することによって、細胞の生存率や運動性を制御することが報告されている(Anjum and Blenis, 2008)。RSK は、ヒトでは RSK1-RSK4 の4つのアイソフォームが存在することが報告されている。アイソフォーム間のアミノ酸配列の相同性は 73-80 %程度であるが、アイソフォームや発現しているがんの種類の違いにより、がん細胞の機能への影響は異なる。グリオブラストーマでは、正常な脳組織と比較して、RSK2 の発現が上昇していることが報告されている(Mathew *et al.*, 2015)。しかしながら、RSK のグリオブラストーマにおける役割はよく分かっていなかった。

本章では、グリオブラストーマ細胞における EGFR シグナルと EphA2 との関連について細胞増殖に着目して検証した。その結果、EGF 刺激により、MEK/ERK/RSK 経路を介して EphA2 の S897 がリン酸化されることで、細胞増殖が促進されることが明らかになった。

## 【実験方法】

### プラスミド

野生型 EphA2 (EphA2-WT) あるいは EphA2-S897A 変異体 (EphA2-SA) の発現には、それらの cDNA を pcDNA3 ベクター (Life Technologies 社) に組み込んだプラスミドを用いた(Kawai *et al.*, 2013; Harada, Negishi and Katoh, 2015)。YFP 発現ベクター (pCAG) は大阪大学の宮崎純一先生、千葉大学の斉藤哲一郎先生より提供頂いた。ヒト RSK2 の cDNA を U-251 細胞から単離し、N 末端に HA タグ配列を付加して pcDNA3 ベクターに組み込んだ。核酸配列は ABI Prism 310 Genetic Analyzer により確認した。EphA2 及びコントロールの shRNA 発現ベクターは、以前の報告の通り、YFP と control luciferase (shControl) もしくは EphA2 (shEphA2) に対する shRNA をコードしている二重プロモーターベクターを用いて、YFP と shRNA を同じ細胞に発現させた(Hiramoto-yamaki *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2011)。RSK2 に対する shRNA (5'-gggaggagattgtttacacg-3'(Zhou *et al.*, 2015)) は、pSilencer-hygro ベクター (Life Technologies 社) を用いて発現させた。

### 試薬および抗体

MEK 阻害剤 U0126、PD98059、PI3K 阻害剤 LY294002 は Merck Millipore 社のものを、Akt 阻害剤 MK-2206 は ChemieTek 社のものを、RSK 阻害剤 BI-D1870 は Santa Cruz Biotechnology 社のものをそれぞれ用いた。ウサギポリクローナル抗 EphA2 (C-20) 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社のものを、マウスモノクローナル抗  $\alpha$ -tubulin (B-5-1-2) 抗体は Merck Millipore 社のものを、ウサギモノクローナル抗 S897 phospho-EphA2 (D9A1) 抗体、抗 T308 phospho-Akt (C31E5E) 抗体、抗 ERK (137F5) 抗体、抗 T202/Y204 phospho-ERK (D13.14.4E) 抗体、ウサギポリクローナル抗 Akt 抗体 (9272)、マウスモノクローナル抗 EphA2 抗体 (8B6) は Cell Signaling Technology 社のものを、マウスモノクローナル抗 HA (3F10) 抗体は Merck Millipore 社のものを、HRP 標識二次抗体は DAKO 社のものを、Alexa fluor 488 標識抗 GFP 抗体、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体は Thermo Fisher Scientific 社のものをそれぞれ用いた。

### 細胞培養およびトランスフェクション法

U251 細胞株 (09063001) は European Collection of Cell Cultures (ECACC) より購入した。A172 細胞株 (RCB2530) は RIKEN BRC より提供頂いた。HEK293T 細胞株は京都大学の垣塚彰先生よりご提供頂いた。U-251、A172、HEK293T 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、4 mM glutamine、100 units/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含むダルベッコ変法イーグル培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。トランスフェクションには血清使用量低減培地である Opti-MEM (Life Technologies 社) を

使用し、Polyethyleneimine MAX を用いた。

### MTT アッセイ

細胞増殖を 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイで定量した。U251 細胞を 96 ウェルプレート上にまき (2500 細胞 /ウェル)、15 時間無血清の DMEM で培養した。その後、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のヒト抗体 Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社) あるいは ephrinA1-Fc (R&D Systems) と 100 ng/ml の組換え型ヒト EGF (Merck Millipore 社) を添加して U251 細胞を 48 時間培養した。次に、5 mg/ml MTT を加えた PBS 溶液 を各ウェルに加え 4 時間インキュベートした。MTT が生細胞内に取り込まれ、還元されることで生成した MTT ホルマザン色素をイソプロパノール含有 0.04 N HCl の溶解溶液により溶解し、マイクロプレートリーダー (Tecan 社) で 595 nm の吸光度を測定した。

### BrdU の取込みの定量

24 ウェルプレートに据えたガラス製カバースリップ上に U251 細胞あるいは A172 細胞をまき、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (10  $\mu\text{M}$ ) を添加して U251 細胞に関しては 30 分間、A172 細胞に関しては 6 時間処理した後、4 % paraformaldehyde (PFA) を含む PBS を添加して、室温にて 20 分間細胞を固定した。その後、4 N HCl を含む PBS を添加して 5 分間処理した後、0.2 % Triton X-100 を含む PBS を添加して 10 分間処理し、10 % FBS を含む PBS を添加して 30 分間ブロッキングした。その後、抗 BrdU 抗体を添加して一晩 4 °C にてインキュベートした。次に、Alexa Fluor 594 共役 抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 488 標識 抗 GFP 抗体あるいは Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific 社) を添加して 1 時間室温にてインキュベートした後、PBS で洗浄した。続いて 90 % glycerol と 0.1 % *p*-phenylenediamine dihydrochloride を含む PBS を用いて封入した。Nikon Eclipse E800 顕微鏡を用いて蛍光顕微鏡観察を行い、デジタルカメラシステム (Leica DC350F) にて顕微鏡画像を取得した。

### イムノブロットイング法

SDS-PAGE 法により細胞溶解液のタンパク質を分離し、PVDF 膜 (Merck Millipore 社) に転写した。3 %スキムミルク含有 Tris バッファーでブロッキング後、一次抗体に続いて HRP 共役二次抗体でインキュベートし、Chemi Lumi One (ナカライテスク社) または enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (GE Healthcare 社) を用いて検出した。

### データ解析

グラフに表されているすべてのデータは、独立した最低3回以上の実験を測定しそれらの平均を表したもので、エラーバーは平均値の標準誤差を表示した。統計的有意差は、SPSS (software version 16.0、IBM 社) の Student の t 検定あるいは one-way the analysis of variance (one-way ANOVA) のあと Bonferroni 検定を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$  となったものを有意と判断した。

## 【実験結果】

### 第1節

#### EphA2 は EGF 刺激によるグリオブラストーマの細胞増殖促進に関与する

EphA2 と EGFR との関連について調べるため、グリオブラストーマ細胞株 U251 を用いて細胞増殖を評価した。EphA2 のリガンドである ephrinA1-Fc を長時間加えることで、EphA2 がエンドサイトーシスされ、発現量が低下することが報告されている (Walker-daniels, Ii and Kinch, 2002; Binda *et al.*, 2012)。U251 細胞に関して、ephrinA1-Fc を添加後、24 時間及び 48 時間後の EphA2 の発現量は減少した (図 1-1 A)。次に、MTT アッセイにより細胞数を評価したところ、EGF 刺激後 48 時間で細胞数は増加したが、ephrinA1-Fc を同時に添加することで、EGF 刺激による細胞数の増加が抑制された (図 1-1 B)。U251 細胞に関して、EGF と共に control-Fc または ephrinA1-Fc を添加して 20 時間処理し、BrdU を取り込んだ細胞の割合を比較したところ、EGF 刺激により BrdU 取込み細胞の割合は増加したが、ephrinA1-Fc 添加により、EGF 刺激による BrdU 取込み細胞の割合の増加が抑制された (図 1-1 C)。EphA2 と細胞増殖との関連についてさらに検証するため、U251 細胞に関して EphA2 を shRNA によりノックダウンし、BrdU を取り込んだ細胞の割合を比較した。その結果、EGF 刺激による BrdU 取込み細胞の割合の増加は、EphA2 のノックダウンにより抑制された (図 1-1 D)。グリオブラストーマ細胞株 A172 を用いた検証も行った。A172 細胞に関して、ephrinA1-Fc を添加後 24 時間及び 48 時間後の EphA2 の発現量は減少し (図 1-1 E)、EGF 刺激による BrdU 取込み細胞の割合の増加は、ephrinA1-Fc を 24 時間添加することにより抑制された (図 1-1 F)。

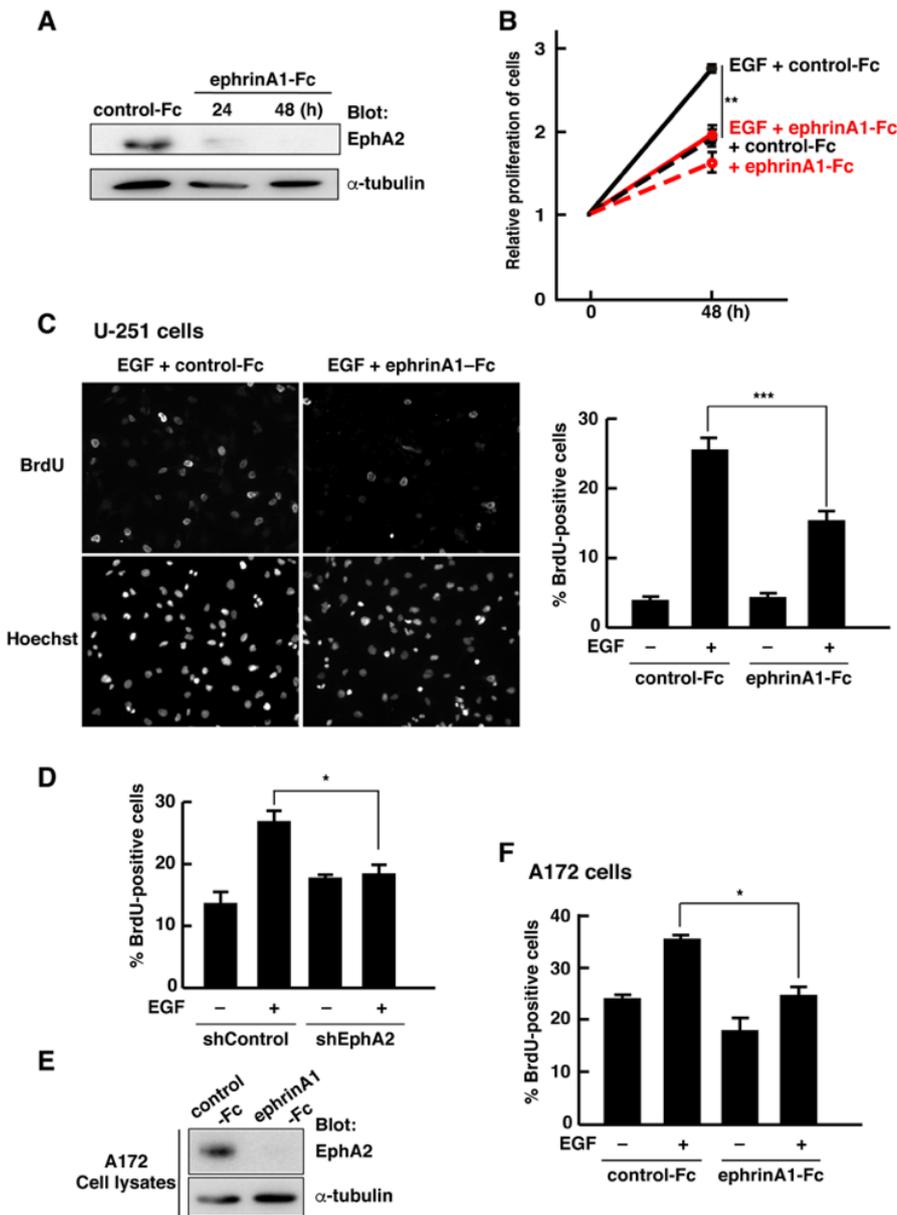


図 1-1 EGF 刺激によるグリオプラストーマ細胞の増殖促進には EphA2 が関与する

(A) U251 細胞に関して、control-Fc または ephrinA1-Fc (1 μg/ml) を添加して 24 時間または 48 時間処理し、細胞溶解液を回収した後、EphA2 と α-tubulin の発現量を抗 EphA2 抗体、抗 α-tubulin 抗体を用いて免疫ブロット法にて解析した。(B) U251 細胞に関して、control-Fc または ephrinA1-Fc (1 μg/ml) と EGF(100 ng/ml) を加えて 48 時間処理し、MTT アッセイにより 48 時間後の細胞数の変化を定量し、処理前 (0 時間) と比較した。生細胞数と比例する MTT ホルマザン色素の 595 nm の吸光度 ( $A_{595\text{ nm}}$ ) を 0 時間、48 時間処理後のサンプルにおいて測定し、0 時間の  $A_{595\text{ nm}}$  に対する 48 時間後の  $A_{595\text{ nm}}$  の比率を算出した。グラフは 5 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (\*\* $p < 0.01$ , one-way ANOVA, Bonferroni)。(C) U251 細胞に関して、control-Fc または ephrinA1-Fc (1 μg/ml) と EGF(100 ng/ml) を加えて 20 時間処理した後、BrdU (10 μM) を添加して 30 分間処理した。細胞を固定後、抗 BrdU 抗体と Hoechst 33258 で標識した。スケールバー、50 μm。BrdU 陽性の細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した。グラフは 4 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した。(\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA, Bonferroni)。(D) U251 細胞に関して、shControl または shEphA2 をトランスフェクションし、EGF(100 ng/ml) を加えて 20 時間処理を行った。その後、BrdU (10 μM) を添加して 30 分間処理した細胞を固定後、shControl または shEphA2 発現細胞を標識するために抗 GFP 抗体と抗 BrdU 抗体で標識した。BrdU、GFP 陽性細胞の数をカウントし、全 GFP 陽性細胞に対する BrdU 陽性の GFP 陽性細胞の割合を算出した (BrdU + GFP +/GFP +)。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Bonferroni)。(E) A172 細胞に関して、control-Fc または ephrinA1-Fc (1 μg/ml) と EGF(100 ng/ml) を加えて 24 時間処理し、細胞溶解液を回収した後、EphA2 と α-tubulin の発現量を抗 EphA2 抗体、抗 α-tubulin 抗体を用いて免疫ブロット法にて解析した。(F) A172 細胞に関して、control-Fc または ephrinA1-Fc (1 μg/ml) と EGF(100 ng/ml) を加えて 24 時間処理した後、BrdU (10 μM) を添加して 6 時間処理した。細胞を固定後、抗 BrdU 抗体と Hoechst 33258 で標識した。BrdU 陽性の細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差で表記した (\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Bonferroni)。

## 第2節

### EGF 刺激により MEK/ERK/RSK 経路を介して EphA2 の S897 がリン酸化される

EphA2 の S897 が Akt によりリン酸化されることで、グリオブラストーマ細胞の運動性、浸潤性が促進されることが以前報告されていた(Miao *et al.*, 2009)。そこで、EphA2 の S897 リン酸化と EGF 刺激との関連について、U251 細胞及び A172 細胞を用いて検証した。U251 細胞に関して、EGF を添加すると、EphA2 の S897 リン酸化は顕著に亢進した (図 1-2 A)。しかし、Akt 阻害剤 MK2206、Akt の上流のキナーゼである PI3K 阻害剤 LY294002 を添加しても、EGF 刺激による EphA2 の S897 のリン酸化に変化は見られなかった (図 1-2A)。一方、MEK 阻害剤 U0126、PD980759 を添加したところ、EGF 刺激による EphA2 の S897 は顕著に抑制された (図 1-2 B)。RSK は ERK によりリン酸化されることによって活性化するキナーゼであり、Akt と基質のリン酸化配列が類似している(Anjum and Blenis, 2008; Romeo, Zhang and Roux, 2012; Lara, Seckl and Pardo, 2013)。さらに、EphA2 の S897 の周辺のアミノ酸配列は RSK の基質のリン酸化モチーフに合致している。そこで、EphA2 の S897 リン酸化と RSK との関連について検証した。RSK 阻害剤 BI-D1870 を添加することによって、EphA2 の S897 のリン酸化は顕著に抑制された (図 1-2 C)。人胎児腎細胞由来の細胞株 HEK293T 細胞に、EphA2 野生型 (EphA2-WT) あるいは S897 をアラニンに置換してリン酸化を受けない変異体 EphA2-S897A (EphA2-SA) を RSK2 とともにトランスフェクションしたところ、EphA2-WT 単独の強制発現で S897 リン酸化が確認され、RSK2 を共発現させることにより S897 のリン酸化が亢進した (図 1-2 D)。次に、A172 細胞株を用いて EphA2 の S897 リン酸化について同様の検証を行った。A172 細胞に関して、EGF の添加により EphA2 の S897 リン酸化が誘導され、EGF 刺激による EphA2 S897 リン酸化は U0126、BI-D1870 の添加により抑制された (図 1-2 E)。一方、MK2206、LY294002 の添加では、A172 細胞に関して EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化は抑制されなかった (図 1-2 F)。これらの結果から、グリオブラストーマ細胞において、EGF 刺激により MEK/ERK/RSK 経路を介して EphA2 の S897 がリン酸化されることが示唆された。

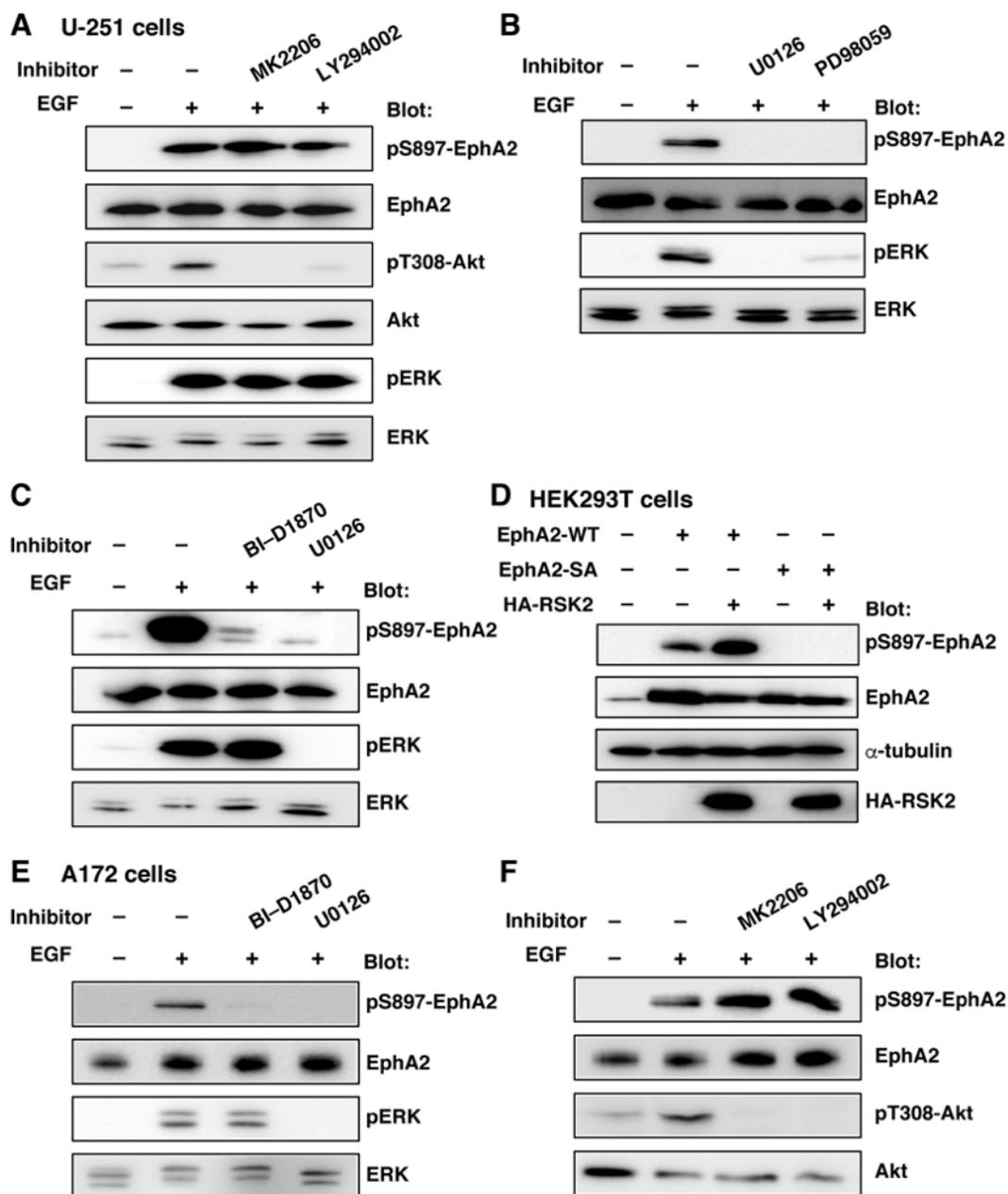


図 1-2 EGF 刺激により MEK/ERK/RSK 経路を介して EphA2 の S897 のリン酸化が誘導される

(A) U251 細胞に関して、MK2206 (1  $\mu$ M) または LY294002 (20  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、EGF (100 ng/ml) を 10 分間加えた。細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。(B) U251 細胞に関して、U0126 (20  $\mu$ M) または PD98059 (20  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、EGF (100 ng/ml) を 10 分間加えた。細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。(C) U251 細胞に関して、BI-D1870 (10  $\mu$ M) または U0126 (20  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、EGF (100 ng/ml) を 10 分間加えた。細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。(D) HEK293T 細胞に表記のプラスミドをトランスフェクションし、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。(E) A172 細胞に関して、BI-D1870 (10  $\mu$ M) または U0126 (20  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、EGF (100 ng/ml) を 10 分間加えた。細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。(F) A172 細胞に関して、MK2206 (1  $\mu$ M) または LY294002 (20  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、EGF (100 ng/ml) を 10 分間加えた。細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。

### 第3節

#### EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖の促進には RSK を介した EphA2 の S897 リン酸化が必要である

EphA2 の S897 リン酸化と細胞増殖との関連について検証するため、EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖の促進に対する RSK の関与について検討を行なった。U251 細胞に RSK 阻害剤である BI-D1870 を添加することで、EGF 刺激による BrdU 取込み細胞の割合の増加は抑制された (図 1-3 A)。RSK2 はグリオブラストーマで発現が上昇していることが報告されており (Mathew *et al.*, 2015)、U251 細胞では RSK の 4 つのアイソフォームの中で RSK2 の発現が確認された。そこで RSK2 の関与を調べるため、RSK2 に対する shRNA を作製した。HEK293T 細胞に HA-RSK2 を強制発現させた際の RSK2 の発現は、shRSK2 により抑制された (図 1-3 B)。U251 細胞に shRSK2 をトランスフェクションし、RSK2 をノックダウンしたところ、EGF 刺激による BrdU 取込み細胞の割合の増加は抑制された (図 1-3 C)。さらに、A172 細胞株でも、BI-D1870 の処置により、EGF 刺激による BrdU 取込み細胞の割合の増加は抑制された (図 1-3 D)。これらの結果から、EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖の促進に、RSK が関与していることが示唆された。

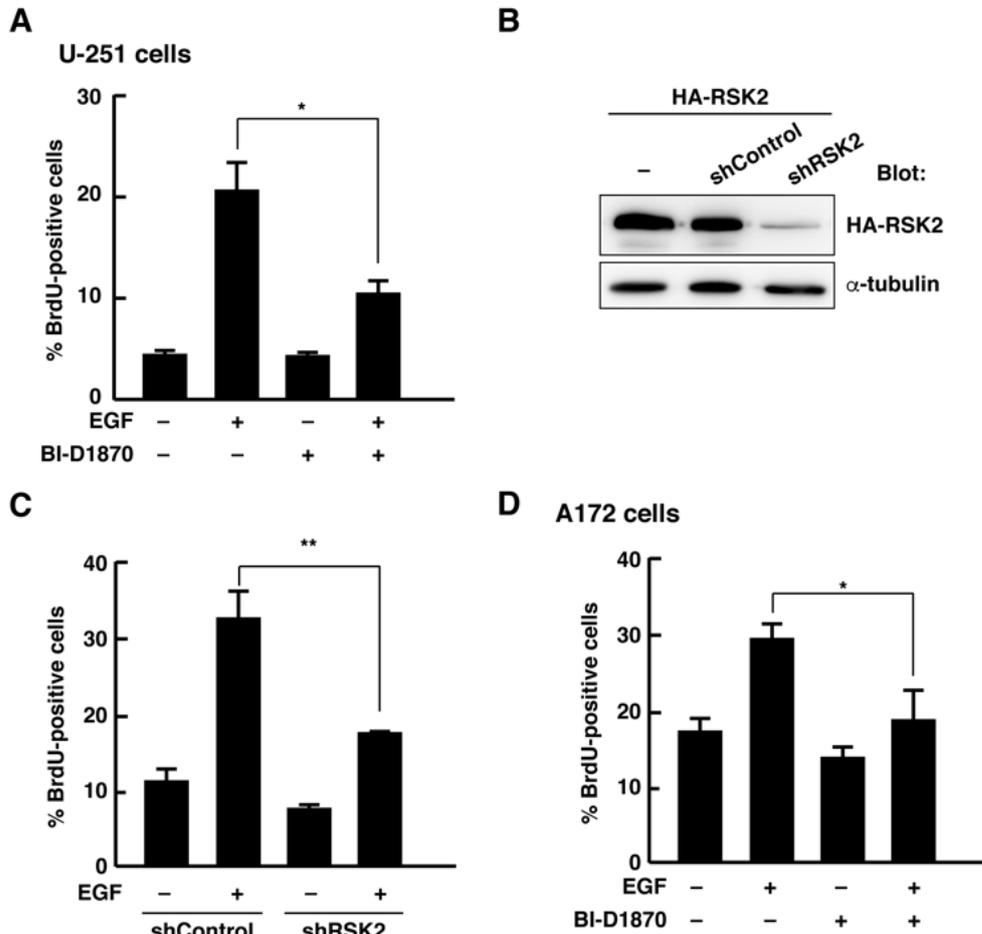


図 1-3 EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖促進には RSK が関与する

(A) U251 細胞に関して、BI-D1870 (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間、続いて EGF (100 ng/ml) を加えて 20 時間処理した後、BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した。細胞を固定後、抗 BrdU 抗体と Hoechst 33258 で標識した。BrdU 陽性の細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した。グラフは 4 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した。(\* $p < 0.05$ , student の t 検定)。(B) HEK293T 細胞に関して、shControl あるいは shRSK2 と HA-RSK2 をトランスフェクションし、HA-RSK2 の発現量を抗 HA 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて免疫ブロット法にて解析した。(C) U251 細胞に GFP の発現ベクターとともに shControl または shRSK2 をトランスフェクションし、EGF (100 ng/ml) を加え 24 時間処理した。その後、BrdU (10  $\mu$ M) で 30 分間処理した後、抗 GFP 抗体と抗 BrdU 抗体で標識した。BrdU、GFP 陽性細胞の数をカウントし、全 GFP 陽性細胞に対する BrdU 陽性の GFP 陽性細胞の割合を算出した (BrdU+GFP+/GFP+)。グラフは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した (\*\* $p < 0.01$ , one-way ANOVA, Bonferroni)。(D) A172 細胞に関して、BI-D1870 (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間、EGF(100 ng/ml)を加え 24 時間処理した後、BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 6 時間処理した。細胞を固定後、抗 BrdU 抗体と Hoechst 33258 で標識した。BrdU 陽性の細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した。グラフは 4 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した。(\* $p < 0.05$ , student の t 検定)。

次に、EphA2 の S897 リン酸化と EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖の促進との関連について、U251 細胞を用いて検証した。U251 細胞に EphA2-WT を過剰発現させると、コントロールと比較して、EGF 刺激が無い状態でも BrdU を取り込んだ細胞の割合が増加した。一方、EphA2-SA の過剰発現では、BrdU 取り込み細胞の割合の増加は見られなかった (図 1-4 A)。EphA2-WT の過剰発現による BrdU を取り込んだ細胞の割合の増加は、BI-D1870 で処置することにより抑制された (図 1-4B)。さらに、U251 細胞に HA-RSK2 を過剰発現させると、BrdU 取り込み細胞の割合は増加したが、EphA2-SA を共発現させると BrdU 取り込み細胞の割合の増加は見られなかった。これらの結果から、EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖の促進に、RSK による EphA2 の S897 のリン酸化が必要であることが示唆された。

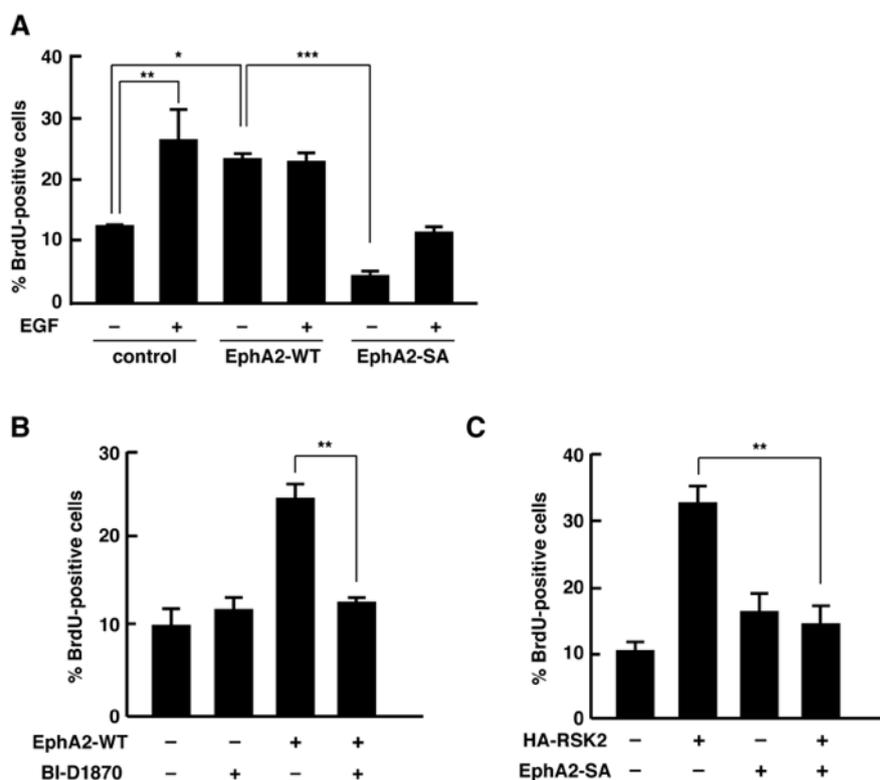


図 1-4 EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖促進には EphA2 の S897 リン酸化が必要である

(A) U251 細胞に GFP と共に EphA2-WT または EphA2-SA をトランスフェクションし、EGF (100 ng/ml) を加え 20 時間処理した。その後、BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、抗 GFP 抗体と抗 BrdU 抗体で標識した。BrdU、GFP 陽性細胞の数をカウントし、全 GFP 陽性細胞に対する BrdU 陽性の GFP 陽性細胞の割合を算出した (BrdU+GFP+/GFP+)。グラフは 4 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, one-way ANOVA, Bonferroni)。 (B) U251 細胞に GFP と共に EphA2-WT をトランスフェクションし、BI-D1870 (10  $\mu$ M) を添加して 20 時間処理した。BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、抗 GFP 抗体と抗 BrdU 抗体で標識した。BrdU、GFP 陽性細胞の数をカウントし、全 GFP 陽性細胞に対する BrdU 陽性の GFP 陽性細胞の割合を算出した (BrdU+GFP+/GFP+)。グラフは 5 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した (\*\* $p$ <0.01, one-way ANOVA, Bonferroni)。 (C) U251 細胞に GFP と共に表記のプラスミドをトランスフェクションし、BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、抗 GFP 抗体と抗 BrdU 抗体で標識した。BrdU、GFP 陽性細胞の数をカウントし、全 GFP 陽性細胞に対する BrdU 陽性の GFP 陽性細胞の割合を算出した (BrdU+GFP+/GFP+)。グラフは 4 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した (\*\* $p$ <0.01, one-way ANOVA, Bonferroni)。

## 【考察】

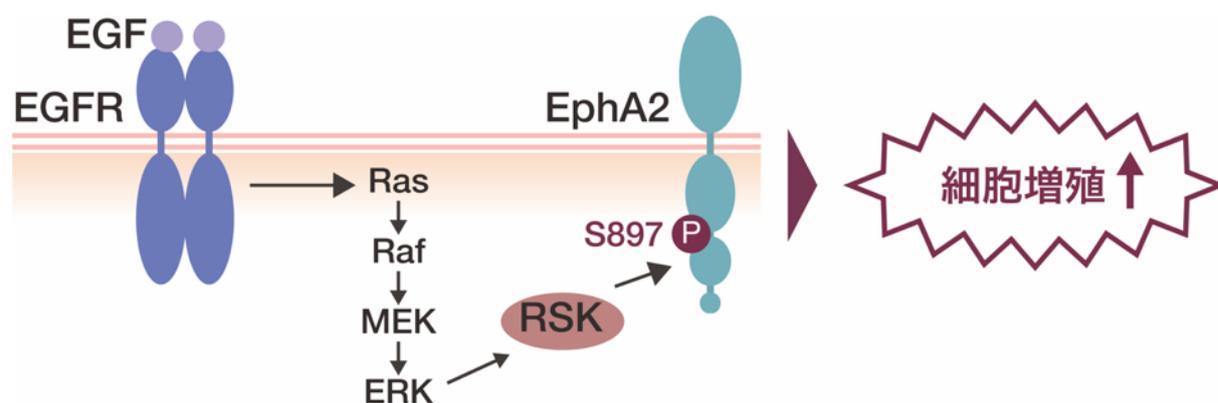
本章において私は、EGF 刺激の下流で MEK/ERK/RSK 経路を介して EphA2 の S897 リン酸化が促進されることで、グリオブラストーマの細胞増殖が促進されることを明らかにした (図 1-5)。

EphA2 の S897 リン酸化を引き起こす分子については、これまで Akt、RSK、PKA などさまざまな分子が報告されてきた。グリオブラストーマ細胞では、血清刺激により Akt が活性化され、Akt により EphA2 S897 がリン酸化されることで、細胞の運動性が促進されることが報告されている (Miao *et al.*, 2009)。乳がん由来の細胞株 MCF-7 細胞では、Akt により EphA2 の S897 がリン酸化されることで、EphA2 と RhoG の GEF である ephexin4 との結合が促進され、RhoG の活性化を引き起こすことで、細胞の運動性が亢進すること、浮遊状態での細胞死であるアノキスに対する耐性能が亢進することが報告されている (Kawai *et al.*, 2013)。Akt と EphA2 との関連については、このようながん細胞の悪性化以外に、イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株 MDCK 細胞では、HGF 刺激により Akt-PI3K 経路を介して EphA2 S897 がリン酸化され、ephexin4 を介して RhoG を活性化することにより、上皮管腔構造の形成が促進されることが報告されている (Harada, Negishi and Katoh, 2015)。また、前立腺がん細胞では、 $\beta$ -アドレナリン受容体アゴニスト刺激によって PKA による EphA2 の S897 リン酸化が起こることが報告されている (Barquilla *et al.*, 2016)。一方で、炎症性サイトカイン刺激により、RSK による EphA2 の S897 リン酸化が起こり、乳がん細胞の浸潤性が亢進されることが報告されている (Zhou *et al.*, 2015)。グリオブラストーマ細胞では、グルコースが欠乏することにより cystine/glutamate antiporter xCT (SLC7A11) を介して RSK2 が活性化され、EphA2 の S897 リン酸化が引き起こされることが報告されている (Teramoto and Katoh, 2019)。このように細胞種や上流の刺激の違いにより、EphA2 の S897 リン酸化を引き起こす分子、リン酸化により変化する細胞の機能が異なることが伺える。Akt、PKA、RSK はいずれも AGC キナーゼファミリーに属し、基質のリン酸化モチーフが類似している。EphA2 の S897 リン酸化がどのような分子を介して起こるのかということについて詳細に分析することは、EphA2 をターゲットにした治療に貢献すること

ができると考えられる。

RSK の遺伝子の変異や増幅とがんとの関連についてはあまり報告が無いのに対して、RSK の発現とがんの浸潤、転移との関連が報告されている。RSK の 4 つのアイソフォームの中で、特に RSK1 と RSK2 は乳がん、頭頸部扁平上皮がん、前立腺がん、白血病、肺がん、メラノーマ、多発性骨髄腫、グリオブラストーマなど様々ながんで発現が上昇していることが報告されている(Houles and Roux, 2018)。転移性の頭頸部扁平上皮がん細胞で RSK2 の発現が上昇しており、発現量と予後の悪さに相関関係があること、RSK2 が細胞の浸潤性を促進することが報告されている(Kang *et al.*, 2010)。EphA2 の S897 リン酸化は様々ながん細胞の運動性、浸潤性を促進することが報告されていることから、RSK による細胞の運動性の促進に EphA2 の S897 リン酸化が関与する可能性が考えられる。EphrinA1 刺激により Akt の活性が抑制されること、ephrinA1 刺激により Akt による EphA2 の S897 リン酸化、細胞の運動性の促進は抑制されることが報告されている(Yang *et al.*, 2011)(Miao *et al.*, 2009)。EphrinA1 は ERK の活性を抑制することが報告されており(Miao *et al.*, 2001)、RSK による EphA2 の S897 リン酸化も ephrinA1 刺激により抑制される可能性が考えられる。また、RSK は前立腺がんやメラノーマ、骨肉腫の細胞増殖を促進することが報告されている(Clark *et al.*, 2005; Romeo *et al.*, 2013; David *et al.*, 2005)。本章の結果から、グリオブラストーマ U251 細胞、A172 細胞において、RSK による EphA2 の S897 リン酸化を介して細胞増殖が促進されることが示唆された。このことから、RSK を介する細胞増殖促進に関与する RSK の基質として EphA2 が重要である可能性が考えられる。

図 1-5 グリオブラストーマ細胞における EGFR シグナルと EphA2 を介した細胞増殖制御機構



## 第2章

### EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介して EphA2 の S897 リン酸化が促進され、グリオブラストーマの細胞増殖が促進される

様々な組織のがんに関して、EphA2 の発現量の上昇が報告されており、発現量とがんの悪性度には正の相関関係があることが報告されている。受容体チロシンキナーゼの活性は、リガンドによる刺激以外に、細胞膜上の受容体の密度やチロシンホスファターゼの活性によっても調節されており、特に細胞膜上の受容体の密度が増大するとチロシンキナーゼ活性が上昇する。EphA2 を含む Eph 受容体ファミリー間で高度に保存されている juxtamembrane segment の 2 つのチロシン残基、キナーゼドメインのチロシン残基が自己リン酸化されると、構造変化が起こって自己阻害が解除され、Eph 受容体のキナーゼ活性が上昇することが報告されている(Binns *et al.* 2000; Wiesner *et al.* 2006; Wybenga-groot *et al.* 2001; Davis *et al.* 2008)。

EphA2 のリガンドである ephrinA1 は、がん促進的に働くキナーゼである FAK、ERK、Akt の活性化を抑制し、がん細胞の運動性、増殖を抑制することが報告されている(Miao *et al.* 2000; Miao *et al.* 2001; Yang *et al.* 2011)。一方で、ephrinA1 刺激により EphA2 が SH2-containing collagen-related proteins (SHC) 、 growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) と複合体を形成し、ERK を活性化するという報告もある(Pratt and Kinch, 2002)。また、ephrinA1 刺激により EphA2 を介してがん血管新生が促進されることが報告されている(Fang *et al.*, 2005)。このように、がんにおけるリガンド依存的な EphA2 の応答については、細胞の種類や細胞の置かれる状況により様々であると考えられる(Pasquale 2010; Beauchamp and Debinski 2012; Y. Zhou and Sakurai 2017)。また、ephrinA1 を介する応答と EphA2 の S897 リン酸化との関連については、ephrinA1 刺激により Akt による EphA2 の S897 リン酸化が抑制されるという報告がある(Miao *et al.*, 2009)。その一方で、ephrinA1 刺激は PKA による EphA2 の S897 リン酸化に影響しないという報告もある(Barquilla *et al.*, 2016)。

受容体型チロシンキナーゼの自己リン酸化によるキナーゼ活性の上昇は、リガンド依存的シグナルを増強させると考えられている。リガンド依存的な EphA2 の活性化は、ユビキチン化を引き起こすことで EphA2 の分解を誘導する一方で、リガンド非依存的な EphA2 の自己リン酸化は EphA2 の分解を引き起こさないことが報告されており(Sabet *et al.*, 2015)、EphA2 のリガンド依存的な活性化とリガンド非依存的な活性化との間に違いがある可能性が示唆されている。

本章において私は、EphA2 の過剰発現によりがん悪性化が引き起こされるメカニズムについて検証するため、EphA2 のキナーゼ活性の役割に着目し、EphA2 のさまざま

な変異体を用いて検討を行なった。その結果、EphA2 の過剰発現は、細胞膜上での密度の上昇、自己リン酸化の亢進を介して EphA2 のキナーゼ活性上昇につながり、その下流の ERK を活性化し、EphA2 の S897 リン酸化を促進することで、グリオブラストーマ細胞の増殖を促進することが明らかになった。

## 【実験方法】

### プラスミド

野生型 EphA2 (EphA2-WT)、EphA2-S897A 変異体 (EphA2-SA)、EphA2-K646M 変異体 (EphA2-KM) の発現には、それらの cDNA を pcDNA3 ベクターに組み込んだプラスミドを用いた。EphA2 の細胞内ドメインである 560-976 番目のアミノ酸をコードする配列 (EphA2-ICD) の発現には、その cDNA を pCXN2 ベクターに組み込んだプラスミドを使用した。YFP 発現ベクター (pCAG) は大阪大学の宮崎純一先生、千葉大学の斉藤哲一郎先生より提供頂いた。

### 試薬、抗体

MEK 阻害剤 U0126、PI3K 阻害剤 LY294002 は Merck Millipore 社のものを、Akt 阻害剤 MK-2206 は ChemieTek 社のものをそれぞれ用いた。ウサギモノクローナル抗 EphA2 (D4A2) 抗体、抗 S897 phospho-EphA2 (D9A1) 抗体、抗 Y588 phospho-EphA2 (D7X2L) 抗体、抗 T308 phospho-Akt (C31E5E) 抗体、抗 ERK (137F5) 抗体、抗 T202/Y204 phospho-ERK (D13.14.4E) 抗体、ウサギポリクローナル抗 Akt 抗体 (9272) については Cell Signaling Technology 社のものをを用いた。マウスモノクローナル抗 Flag (M2) 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin (B-5-1-2) 抗体は Merck Millipore 社のものを、マウスモノクローナル抗 BrdU (3D4) 抗体は BD Biosciences 社のものをを用いた。HRP 標識二次抗体は DAKO 社のものを、Alexa fluor 488 標識抗 GFP 抗体、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体は Thermo Fisher Scientific 社のものをそれぞれ用いた。

### 細胞培養およびトランスフェクション法

U-251、A172、HeLa、HEK293T 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、4 mM glutamine、100 units/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含むダルベッコ変法イーグル培地を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。トランスフェクションには血清使用量低減培地である Opti-MEM (Life Technologies 社) を使用し、HeLa、HEK293T 細胞には Polyethyleneimine MAX を、A172 細胞には Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。

### BrdU の取込みの定量

24 ウェルプレートに据えたガラス製カバースリップ上に A172 細胞をまき、10  $\mu$ M BrdU で 5 時間処置した後、細胞を 4 % paraformaldehyde (PFA) を含む PBS を添加して、室温にて 20 分間細胞を固定した。その後、4 N HCl を含む PBS で 5 分間処置した後、0.2 % Triton X-100 を含む PBS で 10 分間インキュベートし、10 % FBS を含む PBS で 30 分間ブロッキングした。その後、抗 BrdU 抗体を添加して一晩 4 °C にてインキュベートした。次に、Alexa Fluor 594 標識 抗マウス IgG 抗体と Alexa Fluor 488 標識 抗 GFP 抗体 (Thermo Fisher Scientific 社) を添加して 1 時間室温にてインキュベートした後、PBS で洗浄した。続いて 90 % glycerol と 0.1 % p-phenylenediamine dihydrochloride を含む PBS を用いて封入した。Nikon Eclipse E800 顕微鏡を用いて蛍光顕微鏡観察を行い、デジタルカメラシステム(Leica DC350F)にて顕微鏡画像を取得した。

## イムノブロットィング法

第 1 章と同様の手法で行った。

## データ解析

イムノブロットの画像のシグナル強度の解析は、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて行った。グラフに表されているすべてのデータは、独立した最低 3 回以上の実験を測定しそれらの平均を表したもので、エラーバーは平均値の標準偏差を表示した。統計的有意差は、KaleidaGraph (version 4.5.2, Synergy Software 社) の Student の t 検定あるいは one-way ANOVA のあと Tukey 検定を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$  となったものを有意と判断した。

## 【実験結果】

### 第 1 節

#### EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介して S897 のリン酸化が促進される

野生型 EphA2(EphA2-WT)、EphA2-S897A 変異体 (EphA2-SA)、646 番目のリジンをメチオニンに置換してキナーゼ活性を持たなくした EphA2-K646M (EphA2-KM) 変異体 (図 2-1 A) を HEK293T 細胞に強制発現させ、S897 のリン酸化および Y588 のリン酸化をそれぞれ抗 EphA2 S897 リン酸化抗体、抗 EphA2 Y588 リン酸化抗体を用いて、ウェスタンブロット法により調べた。EphA2 を過剰発現させることにより、Y588 の自己リン酸化を介して EphA2 のキナーゼ活性が上昇し、さらに Y588 のリン酸化が亢進することが報告されている。EphA2 の Y588 リン酸化は、EphA2-WT と EphA2-SA の過剰発現の間でほとんど差が見られなかった。一方、EphA2 の S897 リン酸化は、EphA2-KM を過剰発現させた場合では、EphA2-WT の過剰発現と比較して有意に低か

った (図 2-1 B)。これらの結果から、EphA2 の過剰発現により、EphA2 のキナーゼ活性を介して S897 リン酸化が促進されている可能性が考えられた。次に、EphA2 の過剰発現により誘導される S897 リン酸化についてさらに検証するため、EphA2 の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインを欠失することによって細胞内ドメインのみで構成される変異体 (EphA2-ICD) を用いた (図 2-1 C)。HeLa 細胞に EphA2-ICD を強制発現させて EGF 刺激したところ、S897 リン酸化が確認された (図 2-1 D)。このことから、EphA2-ICD が S897 リン酸化されることが可能な変異体であると考えられた。しかしながら、HEK293T 細胞に EphA2-ICD を強制発現させた場合に、Y588 リン酸化は検出されたのに対して、S897 リン酸化は検出されなかった (図 2-1 E)。このことから、EphA2 のキナーゼ活性を介する S897 リン酸化促進には、EphA2 の細胞外ドメインと膜貫通ドメインが必要である可能性が考えられた。

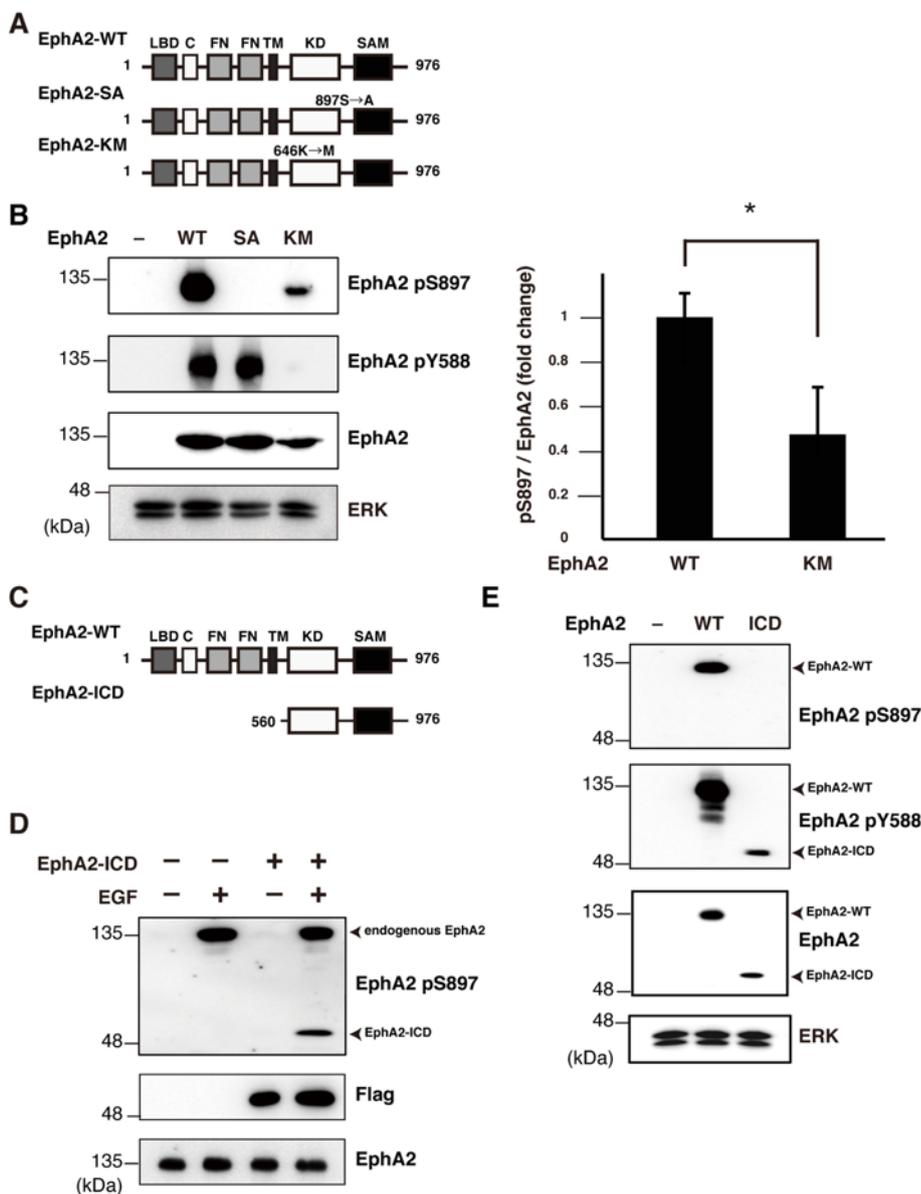


図 2-1 EphA2 のチロシンキナーゼ活性により S897 リン酸化が促進される

(A) 第 2 章で用いた EphA2 の変異体の構造。

(B) HEK293T 細胞に関して、EphA2-WT, EphA2-SA, EphA2-KM をトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、表記された抗体を用いて免疫プロット法にて解析した。右のグラフに関して、pS897-EphA2/EphA2 のシグナル強度の比は Image J を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した。(\* $p < 0.05$ , student の t 検定)。(C) 第 2 章で用いた EphA2 の欠失変異体の構造。(D) HeLa 細胞に関して、control ベクターまたは EphA2-ICD-Flag をトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、表記された抗体を用いて免疫プロット法にて解析した。(E) HEK293T 細胞に関して、EphA2-WT, EphA2-ICD をトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、表記された抗体を用いて免疫プロット法にて解析した。

## 第2節

### EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介して ERK のリン酸化が誘導される

EphA2 は RAS-MAPK 経路を増強するという報告がある(Pratt and Kinch 2002; Brantley-sieders *et al.*, 2008)。そこで、EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介した S897 リン酸化促進と RAS-MAPK 経路との関連について検証した。EphA2-WT、EphA2-KM、EphA2-SA、EphA2-ICD を HEK293T 細胞に強制発現させ、ERK のリン酸化を比較した。ERK のリン酸化レベルは、EphA2-KM、EphA2-ICD では EphA2-WT、EphA2-SA と比較して有意に低かった (図 2-2 A, B)。また、内在性の EphA2 と ERK の活性化との関連について検証するため、U251 細胞に ephrinA1-Fc または control-Fc を加えて 24 時間後の ERK リン酸化の変化を調べたところ、ephrinA1-Fc を加えた場合のリン酸化は control-Fc を加えた場合と比較して有意に低下した (図 2-2 C)。このことから、EphA2 の発現により ERK 活性化が促進されている可能性が考えられた。

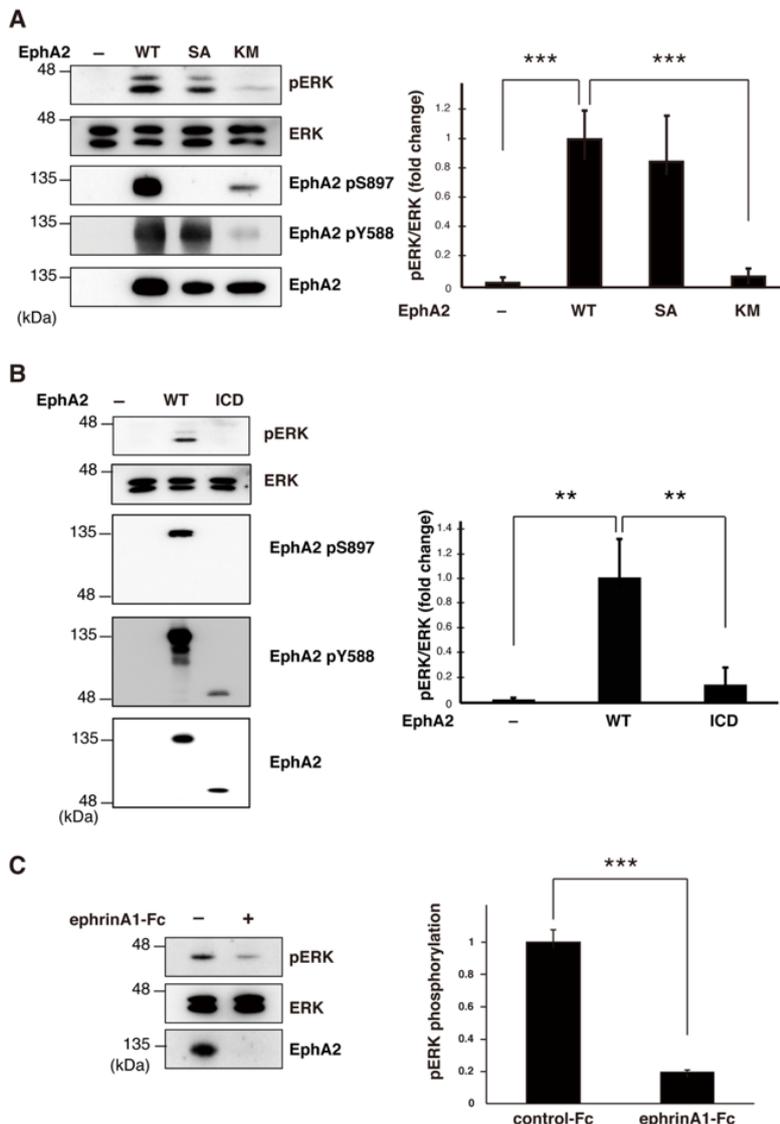


図 2-2 EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介して ERK が活性化される

(A) HEK293T 細胞に関して、表記のプラスミドをトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。pERK/ERK のシグナル強度の比を Image J を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した。 (\*\**p* < 0.001, one-way ANOVA, Tukey' s HSD post hoc test)。 (B) HEK293T 細胞に関して、control ベクター、EphA2-WT、または EphA2-ICD をトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。pERK/ERK のシグナル強度の比を Image J を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した。 (\*\**p* < 0.001, one-way ANOVA, Tukey' s HSD post hoc test)。 (C) U251 細胞に control-Fc または ephrinA1-Fc (1 μg/ml) を加えて 24 時間処置した後、細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。pERK/ERK のシグナル強度の比を Image J を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した。 (\*\**p* < 0.001, student の t 検定)。

### 第3節

#### EphA2 による S897 のリン酸化促進には ERK の活性化が必要である

EphA2 は、MEK/ERK の下流で RSK によってリン酸化されることが報告されている (Y. Zhou *et al.*, 2015)。そこで、EphA2 の過剰発現による S897 リン酸化と ERK 活性化との関連について検証した。HEK293T 細胞に、EphA2-WT を強制発現させた際の S897 リン酸化は、MEK 阻害剤 U0126 により抑制された (図 2-3 A)。一方、Akt 阻害剤 MK2206 あるいは PI3K 阻害剤 LY294002 を用いても、HEK293T 細胞に EphA2-WT を強制発現させた際の S897 リン酸化に変化はなかった (図 2-3 B)。これらのことから、EphA2 の発現による S897 リン酸化には、MEK/ERK 経路の活性化が必要である可能性が考えられた。

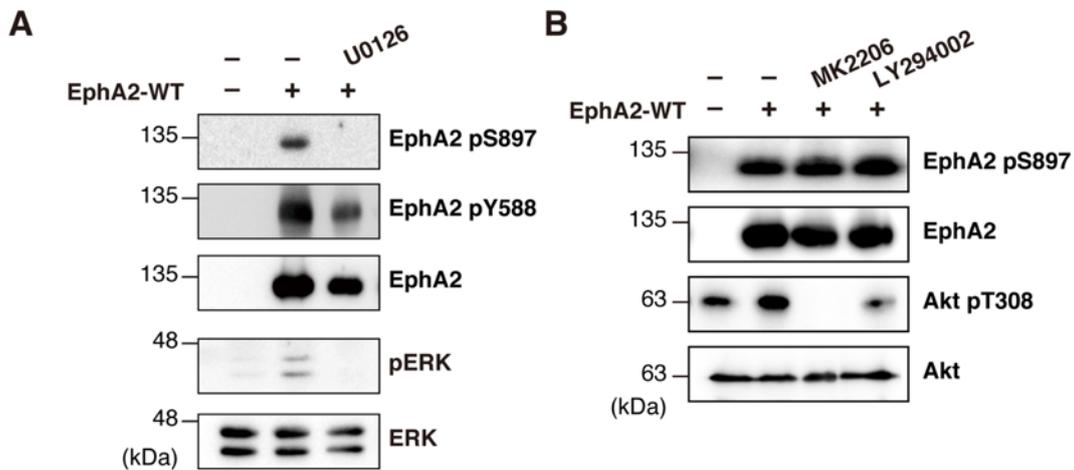


図 2-3 EphA2 の過剰発現による S897 リン酸化には ERK 活性化が関与する

(A) HEK293T 細胞に関して、control ベクターまたは EphA2-WT をトランスフェクションし、U0126 (20  $\mu$ M) を添加して 15 時間処理した。その後、細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。(B) HEK293T 細胞に関して、control ベクターまたは EphA2-WT をトランスフェクションし、MK2206 (1  $\mu$ M) または LY294002 (20  $\mu$ M) を添加して 15 時間処理を行った。その後、細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。

### 第4節

#### EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介して細胞増殖が促進される

EphA2 のキナーゼ活性とグリオブラストーマ細胞の増殖との関連について調べるため、グリオブラストーマの A172 細胞に EphA2-WT あるいは EphA2-KM を過剰発現させ、BrdU を取り込んだ細胞の割合を比較することによって細胞増殖に対する影響を調べた。その結果、EphA2-WT 過剰発現と比較して、EphA2-KM を過剰発現させた場合には BrdU 取込み細胞の割合が有意に低下した (図 2-4 A)。さらに、EphA2-ICD を過剰発現させた場合に、コントロールと比較して BrdU 取込み細胞の割合に変化は見られなかった (図 2-4 B)。これらのことから、EphA2 の過剰発現による細胞増殖の促進には、EphA2 のキナーゼ活性と、細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインが必要で

あると考えられた。

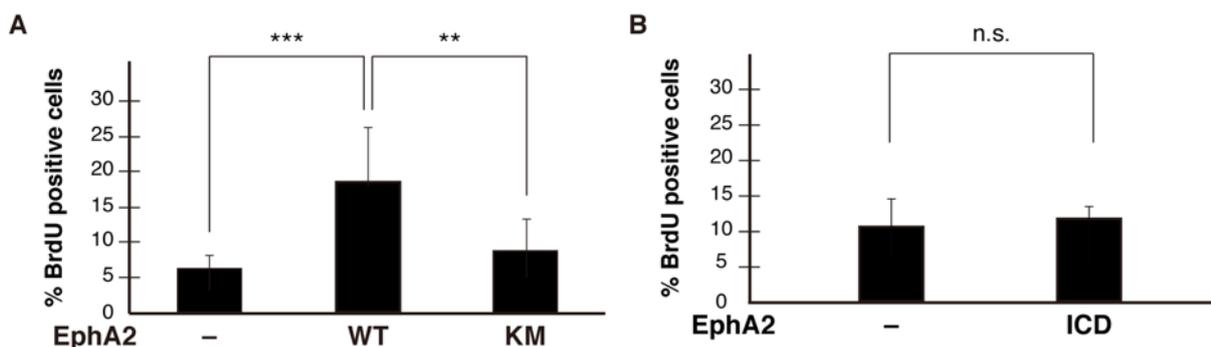


図 2-4 EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介してグリオブラストーマ細胞の増殖が促進される

(A) (B) A172 細胞に関して、YFP と共に表記のプラスミドをトランスフェクションし、BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した後、抗 GFP 抗体と抗 BrdU 抗体で標識した。BrdU、YFP 陽性細胞の数をカウントし、全 YFP 陽性細胞に対する BrdU 陽性の YFP 陽性細胞の割合を算出した (BrdU+YFP+/YFP+)。グラフは 3-7 回の実験の平均値  $\pm$  標準偏差で表記した (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s., not significant, one-way ANOVA, Tukey's HSD post hoc test)。

### 【考察】

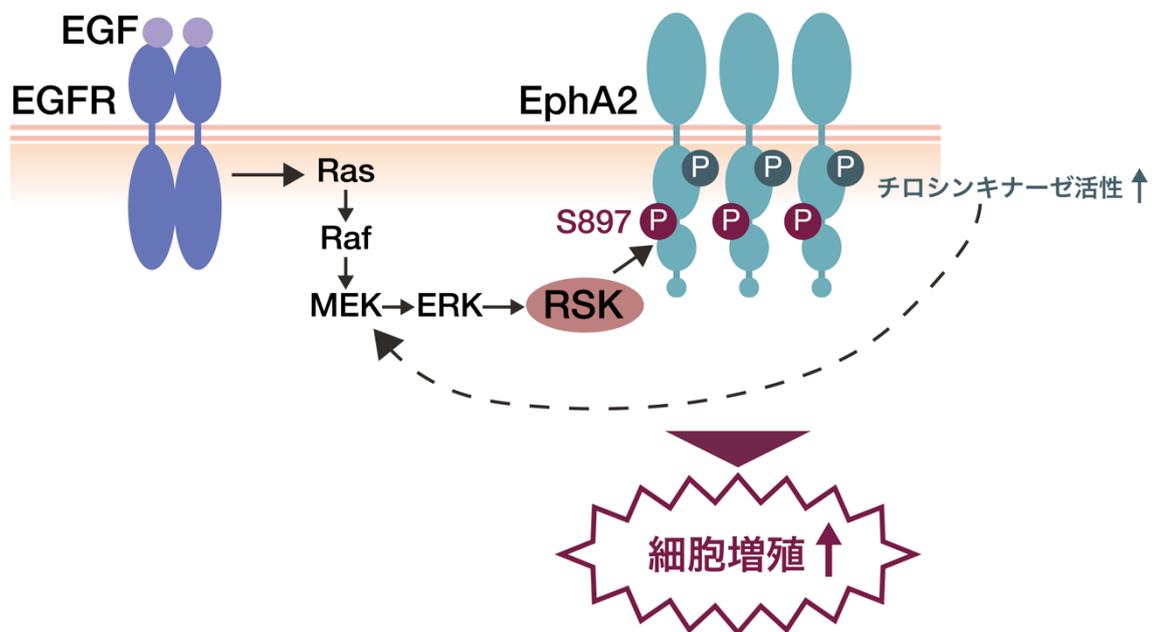
本章において、私は EphA2 の過剰発現がチロシンキナーゼ活性を介して MEK-ERK 経路の活性化を促進し、さらに EphA2 の S897 リン酸化を促進することにより細胞増殖を促進することを見出した (図 2-5)。EphA2 のキナーゼ活性が、がん細胞でどのような役割を持つのかに関して、キナーゼ活性欠損変異体を用いた検証がいくつか報告されている。例えば、EphA2 のキナーゼ活性が乳がん細胞の増殖促進及び浸潤性の促進に必要であるという報告がある (Fang *et al.*, 2005)。また、HER2 の阻害薬トラスツズマブに対する乳がん細胞の耐性獲得や、EGFR の阻害薬エルロチニブに対する肺がん細胞の耐性獲得に EphA2 のチロシンキナーゼ活性を介したシグナルが関与しているという報告がある (Zhuang *et al.*, 2010; Amato *et al.*, 2016)。本章では、ERK 活性化、S897 リン酸化、細胞増殖の促進に EphA2 のキナーゼ活性が促進的に働くことを明らかにした。今回の検証から、EphA2 が過剰発現しているがんで、増殖因子の刺激が無い状況でも S897 リン酸化が起こる可能性が考えられる。

一方、EphA2-ICD の過剰発現では、S897 リン酸化や ERK のリン酸化は促進されなかった。EphA2 野生型と EphA2-ICD では EphA2 の局在が異なると考えられ、EphA2 による ERK 活性化に EphA2 の細胞膜への局在が必要である可能性が考えられる。一方、MT1-MMP による EphA2 の細胞外ドメインの切断が RhoA の活性化を引き起こし、乳がん細胞の浸潤能を促進していることが報告されている (Sugiyama *et al.*, 2013)。このことから EphA2 の細胞外ドメインの有無によって下流のシグナル伝達が異なる可能性が考えられる。

EphA2 は、Ras/Raf/MEK/ERK 経路を介して転写を活性化することが乳がん細胞に関して報告されている (Macrae *et al.*, 2005)。本章において、EphA2 が過剰発現するこ

とにより EphA2 のキナーゼ活性を介して ERK が活性化された。グリオブラストーマ細胞に関して、Ras/Raf/MEK/ERK 経路により EphA2 の発現が亢進し、Ras/Raf/MEK/ERK 経路が活性化するという正のフィードバック機構が働いている可能性が考えられる。

図 2-5 EphA2 の過剰発現による EphA2 S897 リン酸化促進を介したグリオブラストーマ細胞増殖制御機構



### 第3章

## Filamin A は EphA2 と複合体を形成し、S897 リン酸化を促進してグリオブラストーマ細胞の増殖を促進する

Filamin はアクチン結合タンパク質の一つであり、アクチンの三次元構造を制御している。Filamin はさまざまなタンパク質 (90 以上) と結合することが報告されており、膜貫通タンパク質とアクチン骨格との結合を制御することや、様々なタンパク質の局在を制御することが報告されている(Feng and Walsh 2004; A. X. Zhou *et al.*, 2010)。また、filamin 結合タンパク質の中には、がん化やがんの浸潤転移との関連が報告されているものも数多く存在する(Nakamura, Stossel and Hartwig, 2011)。Filamin ファミリーには filamin A、B、C の 3 つのアイソフォームが存在する。Filamin A、B はさまざまな組織に発現しており、filamin C は筋組織のみに発現する。Filamin A の発現は、前立腺がん、乳がん、アストロサイトーマ、肺がんなどの様々なヒトのがん組織で上昇していることが報告されている(Shao *et al.*, 2016)。しかしながら、がん組織における filamin A の役割や、関連する分子は不明な部分が多く残されていた。

EphA2 は、細胞膜近傍で FAK、PI3K と複合体を形成することや、細胞膜上で EGFR ファミリーに属する ErbB2、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 (LRP1) などと複合体を形成することが報告されている(Miao *et al.*, 2000)。グリオブラストーマに関して、LRP1 を介して血清刺激による細胞の運動性、浸潤性が促進され、LRP1 が EphA2 と複合体を形成することが報告されている(Gopal *et al.*, 2011)。

本章において、EphA2 の結合タンパク質を、質量分析法を用いて網羅的に解析し、同定された結合分子の中で filamin A に着目した。Filamin A は EphA2 と結合し、EphA2 の S897 リン酸化を促進してグリオブラストーマ細胞の増殖を促進することが明らかになった。

#### 【実験方法】

##### プラスミド

野生型 EphA2 (EphA2-WT)、EphA2 の C 末端側に Flag タグ配列を付加した配列 (Flag-EphA2) の発現には、その cDNA を pcDNA3 ベクターに組み込んだプラスミドを用いた。Myc タグを付加した filamin A 及び filamin A の C 末端 (filamin A-CT, 2282-2647 番目のアミノ酸をコードする塩基配列) は東京医科歯科大学の仁科博史先生より提供頂いた。YFP 発現ベクター(pCAG)は大阪大学の宮崎純一先生、千葉大学の斉藤哲一郎先生より提供頂いた。

## 試薬、抗体

ephrinA1-Fc は R&D Systems 社のものを、組換え型ヒト EGF は Sigma 社のものを用いた。ウサギモノクローナル抗 EphA2 (D4A2) 抗体、抗 S897 phospho-EphA2 (D9A1) 抗体、抗 Y588 phospho-EphA2 (D7X2L) 抗体、抗 ERK (137F5) 抗体、抗 T202/Y204 phospho-ERK (D13.14.4E) 抗体、マウスモノクローナル抗 EphA2 (8B6) 抗体については Cell Signaling Technology 社のものを用いた。マウスモノクローナル抗 Flag (M2) 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin (137F5) 抗体は Merck Millipore 社のものを、マウスモノクローナル抗 BrdU (3D4) 抗体は BD Biosciences 社のものを用いた。マウスモノクローナル抗 filamin A (MAB1680)抗体については Merck Millipore 社のものを用いた。HRP 標識二次抗体は DAKO 社のものを、Alexa fluor 488 標識抗 GFP 抗体、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体は Thermo Fisher Scientific 社のものをそれぞれ用いた。

## 細胞培養およびトランスフェクション法

U-251、A172、HeLa、HEK293T 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、4 mM glutamine、100 units/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を含むダルベッコ変法イーグル培地を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。トランスフェクションには血清使用量低減培地である Opti-MEM (Life Technologies 社) を使用し、HEK293T 細胞には Polyethyleneimine MAX を、A172、HeLa 細胞には Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。ヒト filamin A に対する siRNA、及びコントロール siRNA は Silencer Select pre-designed siRNA の Thermo Fisher Scientific 社の siFilamin A (siFLNA#1, IDS5275; siFLNA#2, IDS5276)、Silencer Select Negative Control#1 を用いた。これらの siRNA のトランスフェクションには Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。EphA2 KO U251 細胞の作製は、CRISPR/Cas9 を用いて行った(Teramoto and Katoh 2019; Katoh et al. 2017)。

## BrdU の取り込みの定量

第 1 章、第 2 章と同様の手法で行った。

## MTT アッセイ

細胞増殖を 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイで定量した。U251 細胞に siControl または siFilaminA をトランスフェクションし、48 時間培養後、トランスフェクションした U251 細胞を 96 ウェルプレート上にまき (2500 細胞 /ウェル)、15 時間無血清の DMEM で培養した。その後、細胞に 100 ng/ml の組換え型ヒト EGF(Sigma 社)を添加し、48 時間培養した。48 時間培養後の MTT の添加、生成物の溶解及び吸光度の測定は第 1 章と同様の手法で行った。

## EphA2 の結合タンパク質の解析

Flag-EphA2 を HeLa 細胞にトランスフェクションした後、氷冷した cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % TritonX-100, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin) を用いて細胞を溶解し、氷上で 10 分間インキュベートした。細胞溶液を遠心分離 (16,000 x g, 4 °C, 10 分) し、上清に抗 Flag 抗体を加えて 2 時間、4 °C にてインキュベートした。その後、protein G Sepharose (GE Healthcare 社) を加えてさらに 2 時間、4 °C にてインキュベートした。ビーズを cell lysis buffer で洗浄した後、結合タンパク質を Laemmli sample buffer で溶出した。その後、結合タンパク質溶出液を SDS-PAGE、銀染色にて解析した。ゲルを細分し、トリプシン (Promega 社) 溶液で 37 °C にて 12 時間処置によりペプチドを抽出し、液体クロマトグラフ質量分析計 Q exactive Plus (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定を行った。スペクトルのデータは Mascot Server 2.5.1 (Matrix Science 社) により解析を行った。

## イムノブロットィング法

第 1 章と同様の手法で行った。

## データ解析

イムノブロットの画像のシグナル強度の解析は、Imager 600 analysis を用いて行った。グラフに表されているすべてのデータは、独立した最低 3 回以上の実験を測定しそれらの平均を表したもので、エラーバーは平均値の標準偏差を表示した。統計的有意差は、KaleidaGraph (version 4.5.2, Synergy Software 社) の Student の t 検定あるいは one-way ANOVA のあと Tukey 検定を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$  となったものを有意と判断した。

## 【実験結果】

### 第 1 節

#### Filamin A は EphA2 と複合体を形成する

EphA2 と結合する分子を探索するため、HeLa 細胞に EphA2 の C 末端に Flag タグを付加した EphA2-Flag を強制発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、質量分析法により結合タンパク質を解析した (表 3-1)。同定された結合分子の中で、私はタンパク質スコアの最も高い分子である filamin A に着目した。EphA2 と filamin A との結合を確認するため、HEK293T 細胞に EphA2-WT と myc タグを付加した filamin A (myc-filamin A) を強制発現させ、抗 myc 抗体で免疫沈降を行ったところ、EphA2 と

myc-filamin A との結合が確認された (図 3-1 A)。さらに、filamin A の C 末端領域 (2282-2647 残基) のみでも EphA2 との結合が確認された (図 3-1 B)。EphA2 を KO した EphA2 KO U251 細胞とコントロールの U251 細胞を用いて、抗 EphA2 抗体により免疫沈降を行った。その結果、内在性の EphA2 と filamin A との結合が確認された (図 3-1 C)。U251 細胞に filamin A に対する si RNA (siFLNA#1) またはコントロール si RNA (siControl) をトランスフェクションし、抗 EphA2 抗体と抗 filamin A 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡により局在を観察した。その結果、siControl をトランスフェクションした場合に、EphA2 と filamin A は細胞膜近傍で共局在している様子が観察された。一方、siFLNA をトランスフェクションした場合には、EphA2 の細胞膜近傍への集積は見られず、細胞質全体に EphA2 が分散して存在する様子が観察された (図 3-1 D)。これらの結果から、filamin A がその C 末端領域を介して EphA2 と結合し、EphA2 の局在を制御する可能性が考えられた。

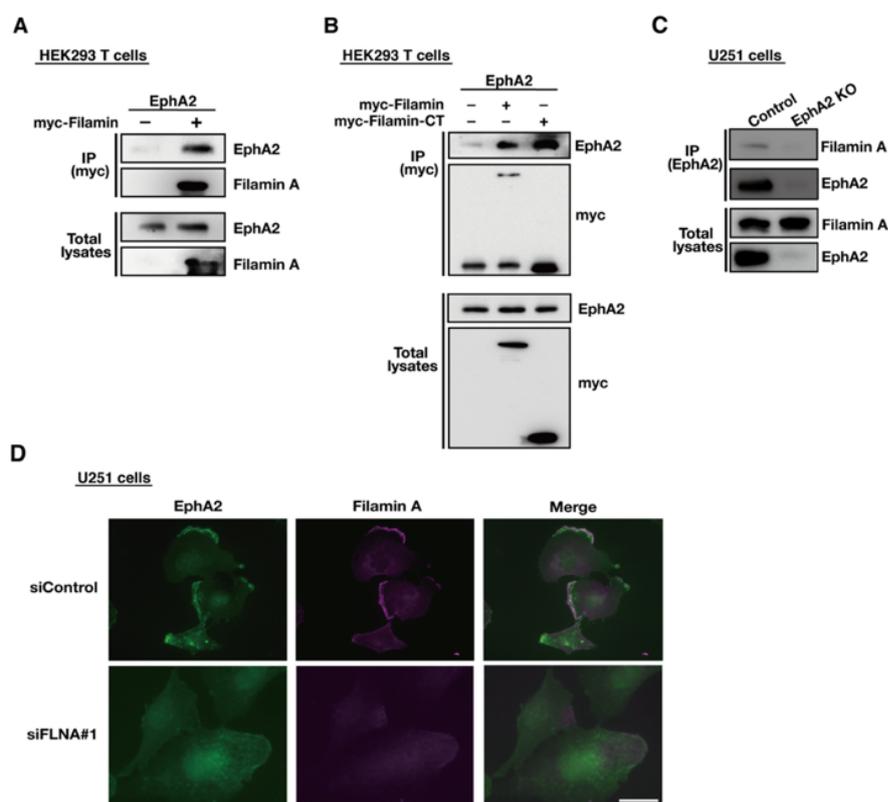


図 3-1 Filamin A は EphA2 と結合する

(A) HEK293T 細胞に関して、EphA2 のみまたは、myc-filamin A と EphA2 をトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、抗 myc 抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物と全細胞溶解液について、抗 EphA2 抗体、抗 filamin A 抗体を用いてイムノブロット法により解析した。(B) HEK293T 細胞に関して、EphA2 のみまたは、myc-filamin A と EphA2、myc-filamin CT と EphA2 をトランスフェクションし、細胞溶解液を回収後、抗 myc 抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物と全細胞溶解液について、抗 EphA2 抗体、抗 myc 抗体を用いてイムノブロット法により解析を行った。(C) コントロールの U251 細胞と EphA2 KO U251 細胞に関して、細胞溶解液を回収し、抗 EphA2 抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物と全細胞溶解液について、抗 EphA2 抗体、抗 filamin A 抗体を用いてイムノブロット法により解析を行った。(D) U251 細胞に関して、siControl または siFLNA#1 をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を固定した。細胞は抗 EphA2 抗体 (緑)、抗 filamin A 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。スケールバー、50  $\mu$ m

## 第2節

### Filamin A の発現抑制により EGF 刺激によるグリオブラストーマの細胞増殖の促進が抑制される

U251 細胞に 2 種の siFLNA (siFLNA#1, siFLNA #2) または siControl をトランスフェクションし、EGF 刺激による細胞数の変化を MTT assay を用いて検証した。siFLNA#1、siFLNA #2 どちらで処理した場合にも filamin A の発現は抑制され、それに伴って EGF 刺激を加えた際の細胞数の増加が siControl の場合と比較して抑制された (図 3-2A)。さらに、U251 細胞と、A172 細胞の 2 種類のグリオブラストーマ細胞株を用いて、siFLNA#1 を用いて EGF 刺激による BrdU を取り込んだ細胞の割合の変化を比較したところ、U251 細胞、A172 細胞どちらの場合にも、filamin A のノックダウンにより EGF 刺激による BrdU 取り込み細胞の割合の増加が抑制された (図 3-2 B)。これらの結果から、filamin A が EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖に関与していることが示唆された。

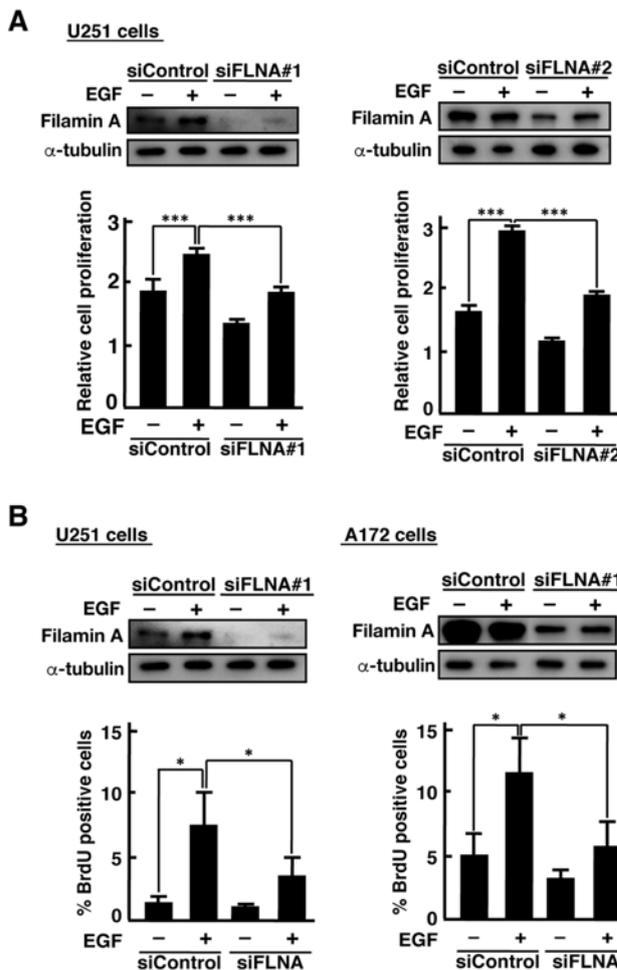


図 3-2 Filamin A のノックダウンにより EGF 刺激によるグリオブラストーマ細胞の増殖が抑制される

(A) U251 細胞に関して、siControl あるいは siFLNA#1、siFLNA#2 をトランスフェクションし、48 時間後に EGF (100 ng/ml) を加え、0 時間及び 48 時間後の細胞数を MTT アッセイにより定量した。生細胞数と比例する 595 nm の吸光度 ( $A_{595\text{nm}}$ ) を 0 時間、48 時間処理後のサンプルにおいて測定し、0 時間の  $A_{595\text{nm}}$  に対する 48 時間後の  $A_{595\text{nm}}$  の比率を算出した。グラフは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準偏差で表記した (\*\*\*)  $p < 0.001$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。また、細胞溶解液を回収し、抗 filamin A 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて filamin A と  $\alpha$ -tubulin の発現量をイムノブロット法にて解析した。

(B) U251 細胞、A172 細胞に関して、siControl あるいは siFLNA#1 をトランスフェクションし、48 時間後に EGF (100 ng/ml) を添加した。U251 細胞では 2 時間後、A172 細胞では 6 時間後に BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理した。細胞を固定後、抗 BrdU 抗体と Hoechst 33258 で標識した。BrdU 陽性の細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した。グラフは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準偏差で表記した (\*  $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。また、細胞溶解液を回収し、抗 filamin A 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて filamin A と  $\alpha$ -tubulin の発現量をイムノブロット法にて解析した。

## 第3節

### Filamin A のノックダウンにより EphA2 によるグリオブラストーマ細胞の増殖促進

## が抑制される

次に、EphA2 を介したグリオブラストーマ細胞の増殖促進と、filamin A との関連について検証した。A172 細胞に siFLNA#1 または siControl をトランスフェクションし、EphA2 を過剰発現させ、BrdU を取り込んだ細胞の割合により細胞増殖について評価した。その結果、siFLNA#1 により filamin A をノックダウンした場合に、EphA2 の過剰発現による BrdU 取込み細胞の割合の増加は抑制された (図 3-3 A)。HeLa 細胞を用いて同様に実験を行ったところ、filamin A のノックダウンにより EphA2 過剰発現による BrdU 取込み細胞の割合の増加は抑制された (図 3-3 B)。これらの結果から、filamin A が EphA2 によるグリオブラストーマ細胞の増殖に関与していることが示唆された。

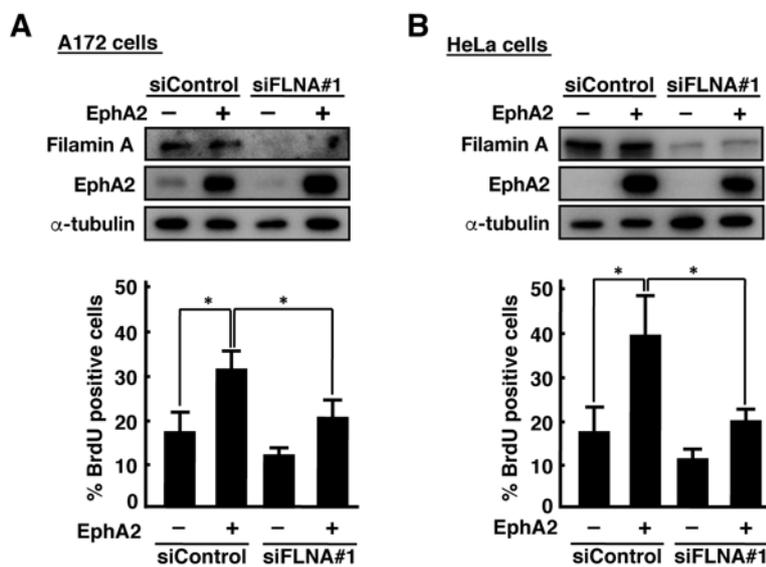


図 3-3 Filamin A のノックダウンにより EphA2 を介したグリオブラストーマ細胞の増殖が抑制される

(A) (B) A172 細胞 (A) または HeLa 細胞 (B) に関して、siControl あるいは siFLNA#1 をトランスフェクションし、48 時間後に EphA2 をトランスフェクションした。BrdU (10  $\mu$ M) を添加して 30 分間処理し、細胞を固定後、抗 BrdU 抗体と Hoechst 33258 で標識した。BrdU 陽性の細胞数をカウントし、全細胞数に対する割合を算出した。グラフは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準偏差で表記した (\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。また、細胞溶解液を回収し、抗 filamin A 抗体、抗 EphA2 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて filamin A、EphA2、及び  $\alpha$ -tubulin の発現量をイムノブロット法にて解析した。

## 第 4 節

### Filamin A のノックダウンにより EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化の促進が抑制される

次に、filamin A の発現と EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化の制御との関連について検証した。U251 細胞を用いて、siFLNA#1 により filamin A をノックダウンした後に EGF 刺激を加え、EphA2 の S897 リン酸化の変化を抗 S897 リン酸化 EphA2 (pS897-EphA2) 抗体を用いて調べた。その結果、filamin A のノックダウンにより、EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化レベルの上昇が抑制された (図 3-4 A)。一方で、EGF 刺激による ERK のリン酸化に関しては、filamin A をノックダウンしても変化は見られなかった (図 3-4 B)。また、EphA2 のリガンドの一つである ephrin A1 を加えることにより EphA2 の Y588 がリン酸化されるが、この Y588 リン酸化は filamin A のノックダウンによって変化しなかった (図 3-4 C)。これらの結果から、filamin A

は EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化を選択的に促進すると考えられた。

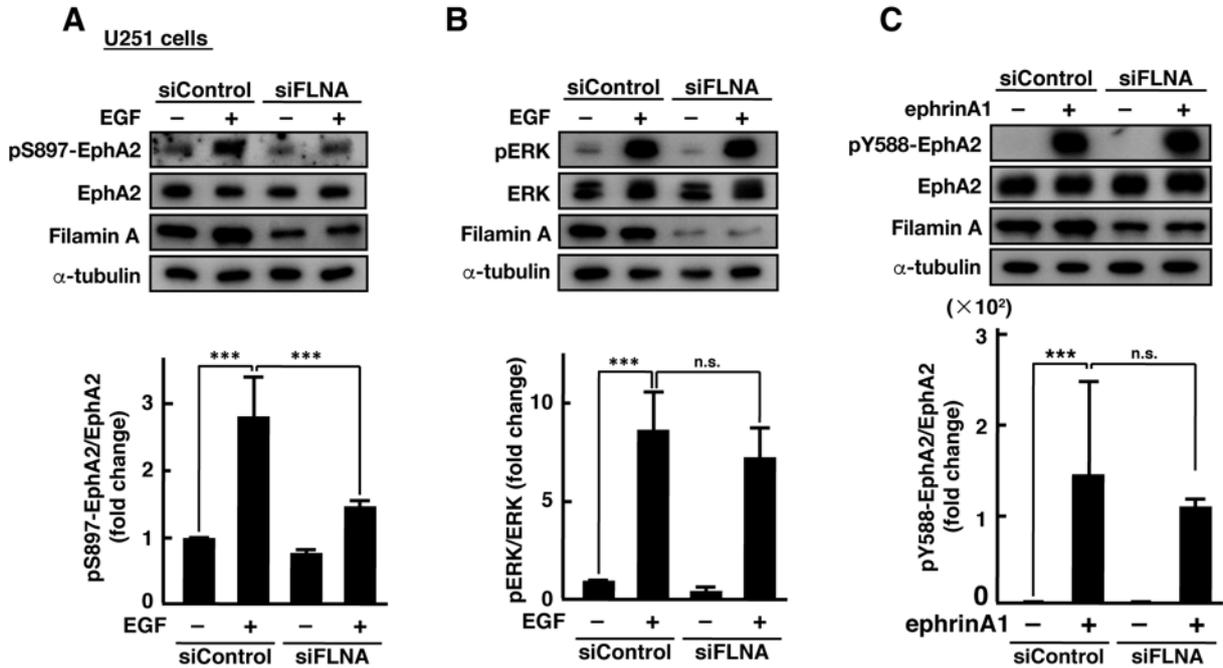


図 3-4 Filamin A のノックダウンにより EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化が抑制される

(A) U251 細胞に関して、siControl あるいは siFLNA#1 をトランスフェクションし、48 時間後に EGF(100 ng/ml)を加えて 30 分間処理した。その後、細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。pS897-EphA2/EphA2 のシグナル強度の比を Amersham Imager 600 analysis を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した (\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。(B) U251 細胞に関して、siControl あるいは siFLNA#1 をトランスフェクションし、48 時間後に EGF(100 ng/ml)を加えて 30 分間処理した。その後、細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。pERK/ERK のシグナル強度の比を Amersham Imager 600 analysis を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した (\*\* $p < 0.001$ , n.s., not significant, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。(C) U251 細胞に関して、siControl あるいは siFLNA#1 をトランスフェクションし、48 時間後に ephrinA1-Fc (1  $\mu$ g/ml)を加えて 30 分間処理した。その後、細胞溶解液を回収し、表記された抗体を用いてイムノブロット法にて解析した。pY588-EphA2/EphA2 のシグナル強度の比を Amersham Imager 600 analysis を用いて算出した。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差で表記した (\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test)。

表 3-1 EphA2 結合タンパク質リスト

液体クロマトグラフ質量分析解析により検出された結合タンパク質をタンパク質スコアの (EphA2 発現-Control) の値の降順に並べた。

Uniprot アクセション番号	結合タンパク質名 ( Organism: OS, Gene Name: GN, Protein Existence: PE, Sequence Version: SV)	分子量 (Da)	タンパク質スコア		
			Control	EphA2	EphA2 - Control
P29317	Ephrin type-A receptor 2 OS=Homo sapiens GN=EPHA2 PE=1 SV=2	108197	0	2183	2183
Q5HY54	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=1	276378	0	823	823
Q43707	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2	104788	0	788	788
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	84607	365	1080	715
P07355	Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2	38580	0	546	546
P11021	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	72288	379	866	487
P68366	Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA4A PE=1 SV=1	49892	0	478	478
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	36030	0	361	361
P14625	Endoplasmic reticulum chaperone protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	92411	0	318	318
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	83212	757	1039	282
F8VU65	60S acidic ribosomal protein P0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1	27170	0	252	252
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2	41976	0	247	247
J3QS39	Polyubiquitin-B (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=1 SV=1	10463	0	245	245
P27348	I4-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1	27747	0	240	240
P04792	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2	22768	89	317	228
P24534	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=1 SV=3	24748	0	208	208
A0A0B4J269	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=1	88324	215	409	194
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2	36615	0	191	191
P27824	Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2	67526	0	183	183
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	89266	0	173	173
H9KV75	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=1	94766	162	330	168
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	61016	378	546	168
J3KPF3	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=1	68059	0	166	166
P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2	23341	0	165	165
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	36665	111	275	164
Q5JP53	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=1	47736	296	449	153
P04083	Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2	38690	0	148	148
P54753	Ephrin type-B receptor 3 OS=Homo sapiens GN=EPHB3 PE=1 SV=2	110259	0	148	148
J3KPX7	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2	33219	40	181	141
P31946	I4-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3	28065	113	254	141
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	73635	0	140	140
M0R1V7	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBA52 PE=1 SV=1	7128	0	139	139
P35579	Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	226392	231	370	139
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2	10925	0	136	136
A0A096LNZ9	Ubiquitin-like protein ISG15 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ISG15 PE=1 SV=4	15552	0	134	134
F5H5D3	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1	57693	539	673	134
H0YH81	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=1	38226	140	273	133
F8WE65	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=1	13013	0	124	124
I3L3D5	Profilin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=1	17506	0	116	116
Q5TCU3	Tropomyosin beta chain OS=Homo sapiens GN=TPM2 PE=1 SV=1	32795	0	114	114
A0A087WZH7	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=1	31577	0	111	111
P31947	I4-3-3 protein sigma OS=Homo sapiens GN=SFN PE=1 SV=1	27757	0	110	110
Q95816	BAG family molecular chaperone regulator 2 OS=Homo sapiens GN=BAG2 PE=1 SV=1	23757	0	109	109
E7EQR4	Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=3	69329	141	248	107
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3	82652	0	107	107
Q32Q12	Nucleoside diphosphate kinase OS=Homo sapiens GN=NME1-NME2 PE=1 SV=1	32621	0	102	102
P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3	11730	79	177	98
P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	95277	76	171	95
P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	57900	483	577	94
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2	70984	252	346	94
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A PE=1 SV=3	57988	0	93	93
H3BQN4	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=1	39315	189	278	89
P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7	32831	111	200	89
P60174	Tricarboxylate isomerase OS=Homo sapiens GN=TCPI1 PE=1 SV=3	30772	268	357	89
A0A0B4J1T8	Ephrin type-A receptor 6 OS=Homo sapiens GN=EPHA6 PE=1 SV=1	126480	0	83	83
P26641	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	50087	0	82	82
HTC4C8	T-complex protein 1 subunit theta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=1	35457	0	79	79
E7EX44	Caldesmon OS=Homo sapiens GN=CALD1 PE=1 SV=1	64131	0	78	78
P26639	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TARS PE=1 SV=3	83382	0	77	77
P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CPS1 PE=1 SV=2	164835	0	77	77
H0YFS2	4F2 cell-surface antigen heavy chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=1	26142	0	74	74
E7EX29	I4-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	28019	258	327	69
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=1 SV=3	47487	0	66	66

E7EW37	Transportin-1 OS=Homo sapiens GN=TNPO1 PE=1 SV=1	15539	0	65	65
J3QR48	Importin subunit beta-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=6	16388	0	62	62
Q95373	Importin-7 OS=Homo sapiens GN=IPO7 PE=1 SV=1	119440	0	62	62
A0A087WZ27	Zinc finger protein 90 OS=Homo sapiens GN=ZNF90 PE=4 SV=2	14386	0	61	61
Q16658	Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3	54496	0	61	61
B7ZAR1	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 PE=1 SV=1	55314	0	58	58
P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3	76568	0	58	58
Q43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSMD3 PE=1 SV=2	60939	0	55	55
A0A0A0MRQ5	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	10670	141	192	51
K7EJP1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=6	15258	0	51	51
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2	628699	0	51	51
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=1 SV=2	44938	0	51	51
H0Y8L7	40S ribosomal protein S3a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=1	22123	0	49	49
H0YN26	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN=ANP32A PE=1 SV=1	19985	0	46	46
K7EJ8	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KATNAL2 PE=1 SV=1	38097	0	46	46
Q55ZW8	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=1	20936	0	45	45
P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	32555	0	44	44
A0A0G2JW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1B PE=1 SV=1	70066	396	439	43
H0YGI8	Stress-induced phosphoprotein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STIP1 PE=1 SV=1	15946	41	83	42
K7ELL7	Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens GN=PRKGSH PE=1 SV=1	60154	0	42	42
F5H2F4	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=1	110544	0	41	41
F5H6X6	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=1	96156	0	41	41
J3KTE4	Ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1	23233	0	41	41
A0A087X1H6	Hsc70-interacting protein OS=Homo sapiens GN=ST13 PE=1 SV=1	28220	0	40	40
A0A087X1X7	Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D PE=1 SV=1	69240	80	120	40
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	70854	810	850	40
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Homo sapiens GN=SEC22B PE=1 SV=4	24578	0	38	38
S4R435	Protein RPS10-NUDT3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS10-NUDT3 PE=3 SV=1	32576	0	38	38
P15259	Phosphoglycerate mutase 2 OS=Homo sapiens GN=PAM2 PE=1 SV=3	28748	0	37	37
Q14247-2	Isoform 2 of Src substrate cortactin OS=Homo sapiens GN=CTTN	70915	0	37	37
Q6P126	Protein SHQ1 homolog OS=Homo sapiens GN=SHQ1 PE=1 SV=2	65084	0	37	37
A0A087X0X3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=1 SV=1	77518	0	36	36
A8MUF7	Hemoglobin subunit epsilon (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBE1 PE=1 SV=1	9464	0	36	36
H0Y3Z3	Protein disulfide isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=1	31524	0	36	36
H7BXK9	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ABCB6 PE=	77498	0	36	36
Q53FA3	Heat shock 70 kDa protein 1-like (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA1L PE=1 SV=1	70360	318	354	36
Q3V1N2	HCG1745306, isoform CRA a OS=Homo sapiens GN=HBA2 PE=1 SV=1	11940	0	35	35
H0Y8R5	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 S	15191	0	35	35
P51858	Hepatoma-derived growth factor OS=Homo sapiens GN=HDGF PE=1 SV=1	26772	0	35	35
A0A087WT11	Ras-related protein Rab-1B OS=Homo sapiens GN=RAB1B PE=1 SV=1	18666	0	34	34
A0A0A0MTS2	Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=1	64784	0	34	34
G3V196	Ras-related protein Rab-15 OS=Homo sapiens GN=RAB15 PE=1 SV=1	19220	0	34	34
H0YMA2	Tropomodulin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TMOD2 PE=1 SV=1	12384	0	34	34
J3KR73	Ras-related protein Rab-6B (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAB6B PE=1 SV=1	14320	0	34	34
M0QX72	Procollagen galactosyltransferase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=COLGALT1 PE=1 SV=1	25657	0	34	34
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJA1 PE=1 SV=2	44839	0	34	34
P35580	Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3	228858	0	34	34
Q9H082	Ras-related protein Rab-33B OS=Homo sapiens GN=RAB33B PE=1 SV=1	25701	0	34	34
A0A087WTP3	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=1	72982	0	33	33
P53396	ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY PE=1 SV=3	120762	0	32	32
A0A0A0MSJ8	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPP6R2 PE	59330	0	31	31
F5H793	L-lactate dehydrogenase B chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=1	10800	65	96	31
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	41710	735	766	31
Q9NRF8	CTP synthase 2 OS=Homo sapiens GN=CTPS2 PE=1 SV=1	65636	0	31	31
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PRKDC PE=1 SV=3	468788	0	30	30
Q5TOS3	Adenylyl cyclase-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=1	15306	0	30	30
G3XAL0	Malate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=1	24579	101	117	16
Q9H853	Putative tubulin-like protein alpha-4B OS=Homo sapiens GN=TUBA4B PE=5 SV=2	27534	102	117	15
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 OS=Homo sapiens GN=EEF1AIP5 PE=5 SV=1	50153	484	497	13
R4GN98	Protein S100 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=S100A6 PE=1 SV=1	9675	79	89	10
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2	76102	68	75	7
Q86Y23	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2	282228	34	41	7
Q5T6W2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPK PE=1 SV=1	41781	100	106	6
H0Y143	Myosin light polypeptide 6 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1	9244	46	51	5
P0C055	Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2	13545	44	49	5
Q43150	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ASAP2 P	111581	43	46	3
A2A2D0	Stathmin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STMN1 PE=1 SV=6	9787	30	32	2
F5H006	Lymphoid-restricted membrane protein OS=Homo sapiens GN=LRMP PE=1 SV=1	50394	31	33	2
K7EKQ2	Hsp90 co-chaperone Cdc37 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CDC37 PE=1 SV=1	41633	49	51	2
A0A087WWD8	Transmembrane protease serine 13 OS=Homo sapiens GN=TMPRSS13 PE=3 SV=1	61043	41	42	1
H0YK20	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=1 SV=1	10809	43	44	1
Q5D862	Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1	247928	126	127	1
A0A087WTS8	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=1	52566	0	0	0

A0A087WVQ6	Clathrin heavy chain OS=Homo sapiens GN=CLTC PE=1 SV=1	191936	0	0	0
A0A087WVQ9	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	47853	0	0	0
A0A087WZ24	Protein NLRC3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NLRC3 PE=1 SV=1	20424	0	0	0
A0A0A0MSI0	Peroxiredoxin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	18964	0	0	0
A0A0A0MSM0	Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 PE=1 SV=1	88786	0	0	0
A0A0A0MSS4	Nuclear migration protein nudC (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1	15287	0	0	0
A0A0B4JIR6	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=1	49879	0	0	0
A0A0C4DGL3	DUTP pyrophosphatase, isoform CRA.c OS=Homo sapiens GN=DUT PE=1 SV=1	15386	0	0	0
A0A0G2J36	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-A PE=1 SV=1	34195	0	0	0
A6NL76	Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=1 SV=3	28147	0	0	0
A8MUD9	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1	24417	0	0	0
B1AJQ5	Protein FAM76A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FAM76A PE=1 SV=1	14184	46	46	0
B3EWG3	Protein FAM25A OS=Homo sapiens GN=FAM25A PE=3 SV=1	9314	0	0	0
B3KQ25	Proteasome activator complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSME3 PE=1 SV=1	22441	0	0	0
B4DLN1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	48069	0	0	0
D6R909	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=1	12904	0	0	0
D6R9F8	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TARS PE=1 SV=1	14116	0	0	0
D6RF62	Multifunctional protein ADE2 OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=1 SV=1	37088	0	0	0
E7END7	Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens GN=RAB1A PE=1 SV=1	19006	0	0	0
E7ESE2	Prohibitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=2	22385	0	0	0
E7ETR0	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1	34760	0	0	0
E9PEB5	Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=FUBP1 PE=1 SV=1	68861	0	0	0
E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	68763	0	0	0
E9PKZ0	60S ribosomal protein L8 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=1	22375	0	0	0
E9PLK3	Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS PE=1 SV=1	102922	0	0	0
E9PS42	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=CSR1 PE=1 SV=1	16569	0	0	0
F5GWF6	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=2	56771	0	0	0
F5GX11	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1	26488	0	0	0
F5H157	Ras-related protein Rab-35 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAB35 PE=1 SV=1	21201	0	0	0
F8VVM2	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLC25A3 PE=1 SV=1	36138	0	0	0
F8WAM2	T-complex protein 1 subunit eta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CCT7 PE=1 SV=1	10488	0	0	0
G3V1V0	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=1	18026	0	0	0
G3V461	Creatine kinase B-type (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	14212	0	0	0
H0Y2V1	Microtubule-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=1 SV=1	48617	0	0	0
H0Y8C6	Importin-5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=1	123779	0	0	0
H0YB22	40S ribosomal protein S14 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=1	12935	0	0	0
H0YCU9	Transgelin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAGLN PE=1 SV=1	16833	0	0	0
H0YEN5	40S ribosomal protein S2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=1	21140	0	0	0
H0YFC6	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=1	11672	35	35	0
H0YHX9	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NACA PE=1 SV=1	22930	0	0	0
H0YK48	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=1 SV=1	28563	0	0	0
H0YKT8	Proteasome subunit beta type (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSMA4 PE=1 SV=6	19949	0	0	0
H3BNV2	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 OS=Homo sapiens GN=NQO1 PE=1 SV=1	28476	0	0	0
I3L0K7	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=1 SV=1	57184	75	75	0
I3L398	Protein disulfide-isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=1	22991	0	0	0
I3L3E9	Flap endonuclease 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FEN1 PE=1 SV=1	17899	0	0	0
J3KMX5	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=1	16722	0	0	0
J3KN67	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1	33202	0	0	0
J3KQE5	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=1	26799	0	0	0
J3KTJ3	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1	8894	0	0	0
J3QRS3	Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=1 SV=1	20444	0	0	0
K7EJ99	Calreticulin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	28414	0	0	0
K7EJT5	60S ribosomal protein L22 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=1	5080	0	0	0
K7EL96	Perilipin-3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PLIN3 PE=1 SV=6	17951	0	0	0
M0QY43	Myosin-14 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MYH14 PE=1 SV=6	113712	0	0	0
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens GN=PSMD11 PE=1 SV=3	47434	0	0	0
O00299	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4	26906	0	0	0
P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2	11133	0	0	0
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3	56525	0	0	0
P08758	Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2	35914	0	0	0
P09382	Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2	14706	0	0	0
P0CG38	POTE ankyrin domain family member 1 OS=Homo sapiens GN=POTE1 PE=3 SV=1	121205	0	0	0
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1	17138	0	0	0
P18206	Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL PE=1 SV=4	123722	0	0	0
P21709	Ephrin type-A receptor 1 OS=Homo sapiens GN=EPHA1 PE=1 SV=4	108058	0	0	0
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 PE=1 SV=3	117774	0	0	0
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1	17287	0	0	0
P26038	Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3	67778	0	0	0
P30101	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	56747	0	0	0
P31949	Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2	11733	0	0	0
P32119	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5	21878	0	0	0
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=1 SV=1	189134	0	0	0
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4	60495	0	0	0

P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GD12 PE=1 SV=2	50631	0	0	0
P50991	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4	57888	0	0	0
P56524	Histone deacetylase 4 OS=Homo sapiens GN=HDAC4 PE=1 SV=3	118966	0	0	0
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1	46125	0	0	0
P62258	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1	29155	0	0	0
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2	29579	0	0	0
P62857	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1	7836	0	0	0
P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	27728	0	0	0
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3	28504	0	0	0
Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=NSUN2 PE=1 SV=2	86416	0	0	0
Q13395	Probable methyltransferase TARBP1 OS=Homo sapiens GN=TARBP1 PE=1 SV=1	181559	0	0	0
Q14974	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2	97108	0	0	0
Q15208	Serine/threonine-protein kinase 38 OS=Homo sapiens GN=STK38 PE=1 SV=1	54155	42	42	0
Q58FF8	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 OS=Homo sapiens GN=HSP90AB2P PE=1 SV=2	44321	0	0	0
Q5H8X8	Urotensin-2 OS=Homo sapiens GN=UTS2 PE=1 SV=1	16266	31	31	0
Q5HY57	Emerin OS=Homo sapiens GN=EMD PE=1 SV=1	24923	0	0	0
Q5JNZ5	Putative 40S ribosomal protein S26-like 1 OS=Homo sapiens GN=RPS26P11 PE=5 SV=1	12994	0	0	0
Q5VVC8	60S ribosomal protein L11 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=1 SV=1	19939	0	0	0
Q60FE5	Filamin A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=1	278053	0	0	0
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens GN=EIF3M PE=1 SV=1	42476	0	0	0
Q8WXQ8	Carboxypeptidase A5 OS=Homo sapiens GN=CPA5 PE=2 SV=1	49005	30	30	0
Q92526	T-complex protein 1 subunit zeta-2 OS=Homo sapiens GN=CCT6B PE=1 SV=5	57785	0	0	0
Q92688	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens GN=ANP32B PE=1 SV=1	28770	0	0	0
Q92973	Transportin-1 OS=Homo sapiens GN=TNPO1 PE=1 SV=2	102289	0	0	0
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1	38219	47	47	0
S4R2X2	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens GN=SFN1 PE=1 SV=1	19905	0	0	0
U3KQR5	60S ribosomal protein L6 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=1	17917	0	0	0
X1W122	GTP-binding protein SAR1a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SAR1A PE=1 SV=5	5753	0	0	0
B1AKD8	Rootletin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CROCG PE=1 SV=2	149087	41	40	-1
P06702	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	13234	40	39	-1
Q9HD20	Manganese-transporting ATPase 13A1 OS=Homo sapiens GN=ATP13A1 PE=1 SV=2	132870	36	35	-1
Q9NQH7	Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 OS=Homo sapiens GN=XPNPEP3 PE=1 SV=1	56997	34	33	-1
A0A0J9YWE8	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=1	17399	80	78	-2
A0A075B6S2	Protein IGKV2D-29 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV2D-29 PE=1 SV=1	13135	121	118	-3
H0YDD8	60S acidic ribosomal protein P2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL2 PE=1 SV=1	9091	46	43	-3
H3BQ34	Pyruvate kinase OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=1	30701	42	38	-4
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PP1B PE=1 SV=2	23728	155	151	-4
A0A0A0MRJ6	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=1	30296	43	38	-5
I3L397	Eukaryotic translation initiation factor 5A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=6	16009	48	43	-5
A0A087WV01	Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	46331	57	50	-7
B1AHC9	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=1	64243	45	38	-7
F5H0C8	Enolase OS=Homo sapiens GN=ENO2 PE=1 SV=1	34741	179	168	-11
A0A075B6Z2	Protein TRAJ56 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TRAJ56 PE=4 SV=1	2220	56	42	-14
A0A087X027	Protein SETSIP OS=Homo sapiens GN=SETSIP PE=3 SV=1	33625	95	79	-16
P80723	Brain acid soluble protein 1 OS=Homo sapiens GN=BASP1 PE=1 SV=2	22680	197	178	-19
Q9Y490	Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3	269599	110	89	-21
H0YCU7	40S ribosomal protein S3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=1	14994	80	51	-29
B2R4S9	Histone H2B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BE PE=2 SV=1	13898	30	0	-30
H0Y645	Casein kinase I isoform epsilon (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CSNK1E PE=1 SV=1	31274	30	0	-30
H0YK49	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ETFPA PE=1 SV=1	24145	30	0	-30
H7C055	Tetratricopeptide repeat protein 7A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TTCT7A PE=1 SV=1	36841	30	0	-30
P55060	Exportin-2 OS=Homo sapiens GN=CSE1L PE=1 SV=3	110346	30	0	-30
Q6ZWH5	Serine/threonine-protein kinase Nek10 OS=Homo sapiens GN=NEK10 PE=2 SV=3	133176	30	0	-30
Q96M42	Putative uncharacterized protein encoded by LINC00479 OS=Homo sapiens GN=LINC00479 PE=5 SV=2	15199	30	0	-30
A0A087WTA0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 11 OS=Homo sapiens GN=USP17L11 PE=4 SV=1	63115	31	0	-31
J3KPD9	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1	22408	31	0	-31
Q75792	Ribonuclease H2 subunit A OS=Homo sapiens GN=RNASEH2A PE=1 SV=2	33374	31	0	-31
Q8WU76	Sec1 family domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=SCFD2 PE=1 SV=2	75079	31	0	-31
A0A087WT15	Putative bifunctional UDP-N-acetylglucosamine transferase and deubiquitinase ALG13 OS=Homo sapiens GN=ALG13 PE=1 SV=1	6873	33	0	-33
A0A087X004	Glutaminase 2 (Liver, mitochondrial), isoform CRA d OS=Homo sapiens GN=GLS2 PE=1 SV=1	37069	33	0	-33
A0A0A0MSQ0	Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 PE=1 SV=1	69291	33	0	-33
P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	11360	82	49	-33
H0YB39	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1	30476	35	0	-35
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2	34237	35	0	-35
A0A0C4DQB6	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=1	69181	81	41	-40
A0A087WVY3	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=1	245697	121	79	-42
A8MX94	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=1	19468	42	0	-42
Q8T7F2	Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2	216724	42	0	-42
Q95969	Secretoglobin family 1D member 2 OS=Homo sapiens GN=SCGB1D2 PE=2 SV=1	9918	43	0	-43
P23526	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4	47685	44	0	-44
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2	49510	44	0	-44
P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens GN=SNRPD3 PE=1 SV=1	13907	46	0	-46
A0A087WVU8	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=1	26404	170	122	-48

P81605	Dermeidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	11277	396	348	-48
E7EQG2	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens GN=EIF4A2 PE=1 SV=1	41264	163	114	-49
F6RFD5	Destrin OS=Homo sapiens GN=DSTN PE=1 SV=1	15387	49	0	-49
F8WE04	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=1	20394	51	0	-51
X6RJP6	Transgelin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=1	21073	59	0	-59
P12273	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1	16562	155	87	-68
A0A0C4DG17	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=1	33293	70	0	-70
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	59714	70	0	-70
P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	10828	73	0	-73
G3V1A4	Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA a OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=1	16801	135	61	-74
B8ZZL8	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=1	10683	75	0	-75
P30041	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3	25019	170	88	-82
M0R1M6	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBA52 PE=1 SV=1	12795	83	0	-83
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2	37474	92	0	-92
P20930	Filaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3	434922	146	50	-96
P50454	Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	46411	201	103	-98
P31151	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4	11464	177	53	-124
G3V210	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1	18259	127	0	-127
P00558	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3	44586	281	116	-165
P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	47139	740	572	-168
P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	15045	176	0	-176
E9PG15	14-3-3 protein theta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1	17038	177	0	-177
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	18001	217	0	-217
P29401	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	67835	531	284	-247
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein OS=Homo sapiens GN=ANXA2P2 PE=5 SV=2	38635	274	0	-274
E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=1	27853	288	0	-288

## 【考察】

本章において私は、アクチン結合タンパク質である *filamin A* が細胞膜近傍で EphA2 と複合体を形成し、EphA2 の S897 リン酸化を促進することでグリオブラストーマ細胞の増殖を促進することを見出した (図 3-5)。

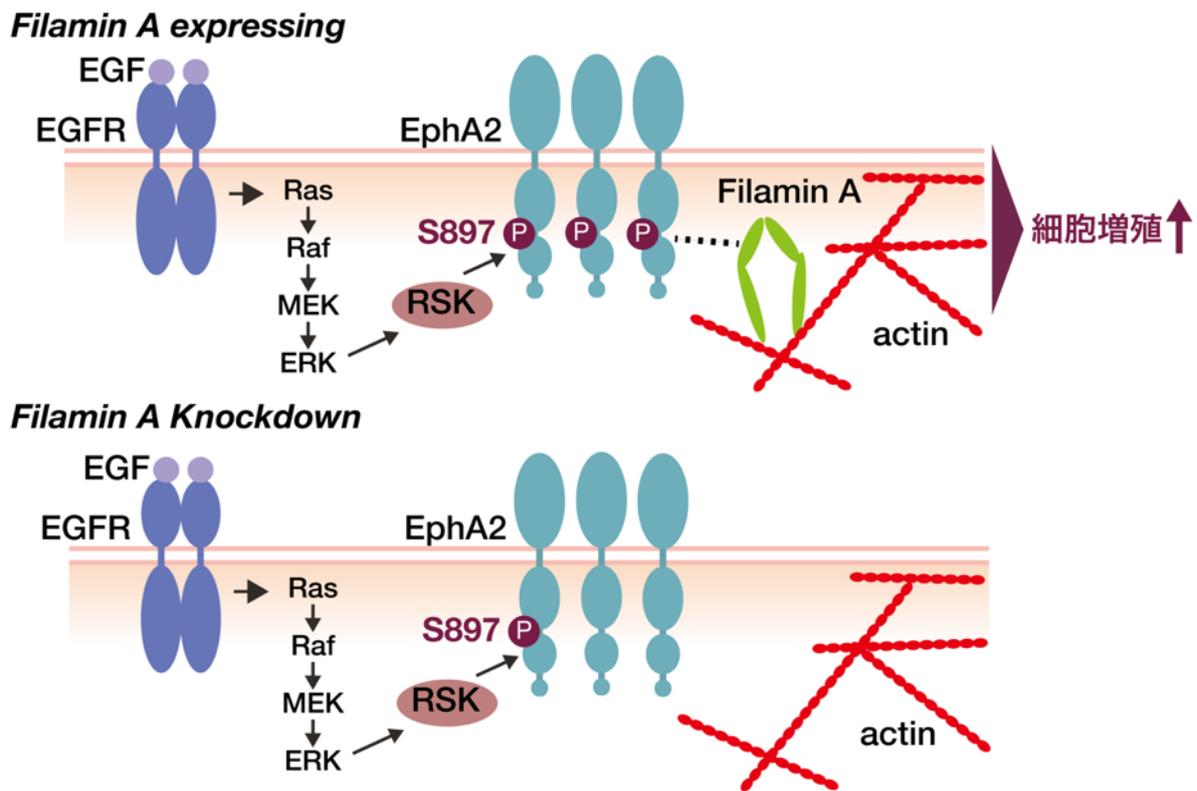
がんにおける *filamin A* と EGFR シグナルとの関連に関しては、*filamin A* が K-Ras による肺がん細胞の増殖促進に必要であること (Nallapalli *et al.*, 2012)、*filamin A* が EGFR のキナーゼ活性を上昇させ、下流の Ras/Raf/MEK/ERK 経路の活性化を促進することで、メラノーマ細胞の増殖を促進することが報告されている (Zhang *et al.*, 2014)。本章において、*filamin A* のノックダウンにより、EGF 刺激による EphA2 の S897 リン酸化が抑制されたのに対して、*ephrin A1* 刺激による Y588 リン酸化、ERK リン酸化は変化しなかった。*Filamin A* がどのようにして EphA2 S897 リン酸化を選択的に促進するのかに関してはさらに検証が必要である。

がん細胞における *filamin A* の働きは、局在の違いによってがん促進的に働く場合と抑制的に働く場合があり、細胞質に存在する *filamin A* はがん促進的に働くのに対して、核内に移行した *filamin A* はがん抑制的に働くことが報告されている (Savoy and Ghosh, 2013)。本章において、*filamin A* が細胞膜近傍で EphA2 と共局在する様子が観察され、EphA2 を介したグリオブラストーマ細胞の増殖促進に *filamin A* が必要であることが示唆された。S897 リン酸化された EphA2 が、細胞膜に局在することがさまざまな組織の細胞に関して報告されている。例えば、MDCK 細胞に関して、HGF 刺激により EphA2 は S897 リン酸化され、S897 リン酸化 EphA2 が上皮管腔構造の先端部に局在すること (Harada *et al.* 2015)、グリオブラストーマ細胞に関して血清刺激により EphA2 の S897 リン酸化が誘導され、S897 リン酸化 EphA2 が浸潤突起の先端に局在することが報告されている (Miao *et al.*, 2009)。これらのことから、EphA2 の S897 リン酸化に細胞膜への EphA2 の局在が関与している可能性が考えられる。本章において、*filamin A* のノックダウンにより、細胞膜のラッフリング構造形成が抑制され、EphA2 の細胞膜への集積が抑制される様子が観察された。EphA2 と *filamin A* との相互作用により、細胞膜に EphA2 が局在することで S897 のリン酸化が促進される可能性が考えられる。

*Filamin A* の 20 番目のリピート構造内に存在する 2152 番目のセリン (S2152) 残基の近傍の配列は、AGC キナーゼの基質のリン酸化コンセンサス配列と一致しており、RSK、Pak1、Akt などによりリン酸化されることが報告されている (Ohta and Hartwig 1996; Vadlamudi *et al.*, 2002; Ravid *et al.*, 2008)。*Filamin A* の S2152 のリン酸化は、*filamin A* とインテグリンとの結合を促進し、インテグリンの活性を抑制し、細胞の接着を抑制することや (Vial and Mckeown-longo 2012; Gawecka *et al.* 2012)、がん細胞の運動性を促進すること (Ravid *et al.*, 2008)、細胞膜ラッフリング構造の形成を促進すること

(Vadlamudi *et al.*, 2002)などが報告されており、がんの悪性化との関連が伺える。EphA2、filamin A は共に RSK の基質であることから、EphA2 と filamin A が複合体を形成することにより RSK によるリン酸化を受けやすくなる可能性が考えられる。

図 3-5 Filamin A と EphA2 を介したグリオブラストーマ細胞の増殖制御機構

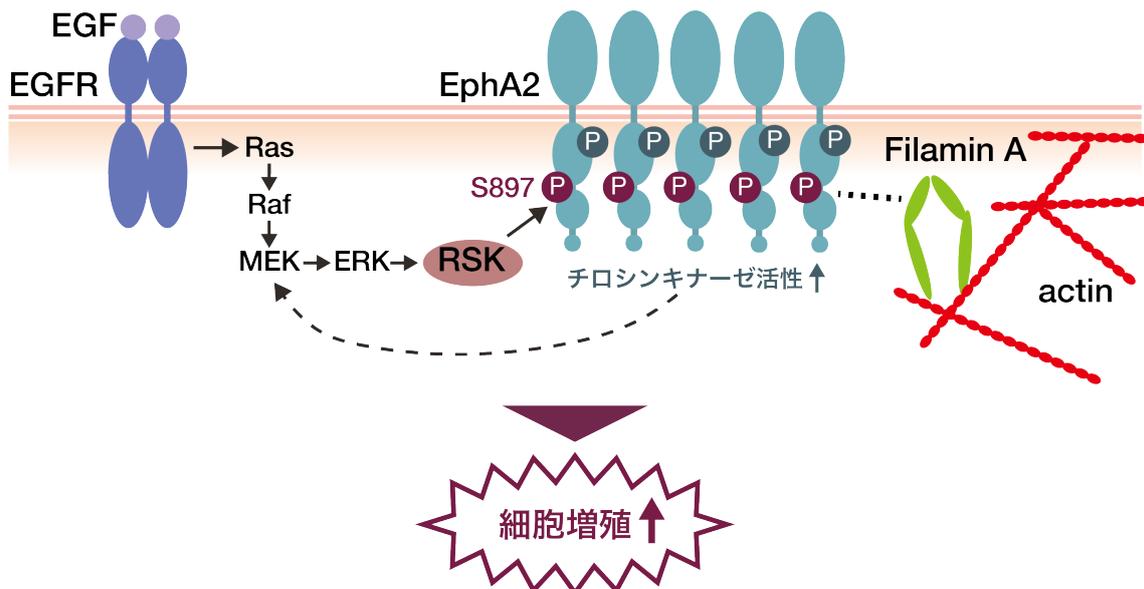


## 結論

本章において私は、グリオブラストーマにおける EphA2 の細胞増殖制御機構に関して検討を行い、以下の知見を得た。第一章では、EGF 刺激により MEK/ERK/RSK 経路を介して EphA2 の S897 がリン酸化されることで、細胞増殖が促進されることを見出した。第二章では、EphA2 が過剰発現すると、そのチロシンキナーゼ活性を介して ERK が活性化され、EphA2 の S897 のリン酸化が亢進して細胞増殖が促進されることを明らかにした。第三章では、EphA2 とアクチン結合タンパク質 Filamin A が複合体を形成することを明らかにし、Filamin A の発現が EphA2 の S897 リン酸化の促進、細胞増殖の促進において重要である可能性を示した。

以上、本研究の成果は、グリオブラストーマの細胞増殖制御において EphA2 が重要な役割を果たすことを示すものであり、EphA2 によるグリオブラストーマの細胞増殖制御に関連するシグナル経路や分子の一端を明らかにしたものである。これらの成果はまた、グリオブラストーマの新たな治療薬の創生にとって有用な知見を提供するものである（下図）。

図 グリオブラストーマにおける EphA2 の細胞増殖制御機構



## 略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ANOVA, analysis of variance

BSA, bovine serum albumin

BrdU, 5-bromo-2 deoxyuridine

cDNA, complementary DNA

CT, c-terminus

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

ECACC, European Collection of Cell Cultures

EGF, epidermal growth factor

EGFR, epidermal growth factor receptor

ERK, extracellular signal-regulated kinase

F-actin, filamentous-actin

FAK, focal adhesion kinase

FBS, fetal bovine serum

GAP, GTPase activating protein

GDP, guanosine diphosphate

GEF, guanine nucleotide exchange factor

GFP, green fluorescent protein

GRB, growth factor receptor-bound protein

GTP, guanosine triphosphate

HBSS, Hanks' balanced salt solution

HEK293 human embryonic kidney 293

HGF, hepatocyte growth factor

HRP, Horseradish peroxidase

ICD, Intercellular domain

LRP, low-density lipoprotein receptor-related protein

MAPK, mitogen-activated protein kinase

MDCK, Madin-Darby canine kidney

MEK, MAPK/ERK kinase

MT1MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase

MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

PBS, phosphate-buffered saline  
PFA, paraformaldehyde  
PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase  
PKA, protein kinase A  
PVDF, polyvinylidene difluoride  
Pak, p21-activated kinase  
RSK, P90 ribosomal S6 kinase  
SAM, sterile alpha motif  
SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
SHC, SH2-containing collagen-related proteins  
shRNA, short hairpin RNA  
siRNA, small interfering RNA  
TBS, Tris-buffered saline  
WT, wild type  
YFP, yellow fluorescent protein

## 謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 根岸学 教授、木村郁夫 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接丁寧な御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科 加藤裕教 准教授、京都薬科大学 田中智之 教授に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました兵庫県立大学大学院理学研究科 生沼泉 教授、京都大学大学院薬学研究科 北野（大植）隆司 助教、池田貴子 特定助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、ご協力をいただきました京都大学大学院生命科学研究所 渡邊裕三 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し多大なるご協力いただきました中溝悠太 修士をはじめ、本研究を通じて実験実施のご協力を頂き、研究の進捗に応じてご議論をして頂いた、京都大学大学院 薬学研究科 神経機能制御学分野の皆様にご心より感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました日本学術振興会に深く感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を温かく見守り、支えていただきました家族にご心より感謝いたします。

## 論文発表目録

本研究の成果は以下の論文に公表した。

1. EphA2 is a key effector of the MEK / ERK / RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation  
Yuho Hamaoka, Manabu Negishi, and Hironori Katoh  
2016年4月発行  
*Cellular Signalling* 第28巻, 937頁-945頁
2. Tyrosine kinase activity of EphA2 promotes its S897 phosphorylation and glioblastoma cell proliferation  
Yuho Hamaoka, Manabu Negishi, and Hironori Katoh  
2018年4月発行  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 第499巻, 920頁-926頁
3. Filamin A forms a complex with EphA2 and regulates EphA2 serine 897 phosphorylation and glioblastoma cell proliferation  
Yuho Tamura, Yuta Nakamizo, Yuzo Watanabe, Ikuo Kimura, and Hironori Katoh  
2022年1月発行  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 第597巻, 64頁-70頁

## 引用文献

1. Amato, K.R. *et al.* (2016) EPHA2 Blockade Overcomes Acquired Resistance to EGFR Kinase Inhibitors in Lung Cancer, *Cancer Res.*, 76, 305–319.
2. Anjum, R. and Blenis, J. (2008) The RSK family of kinases : emerging roles in cellular signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 747–758.
3. Barquilla, A. *et al.* (2016) Protein kinase A can block EphA2 receptor-mediated cell repulsion by increasing EphA2 S897 phosphorylation, *Mol. Biol. Cell*, 27, 2757–2770.
4. Beauchamp, A. and Debinski, W. (2012) Ephs and Ephrins in Cancer: Ephrin-A1 Signaling, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 23, 109–115.
5. Binda, E. *et al.* (2012) The EphA2 Receptor Drives Self-Renewal and Tumorigenicity in Stem-like Tumor-Propagating Cells from Human Glioblastomas, *Cancer Cell*, 22, 765–780.
6. Binns, K.L. *et al.* (2000) Phosphorylation of Tyrosine Residues in the Kinase Domain and Juxtamembrane Region Regulates the Biological and Catalytic Activities of Eph Receptors, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 4791–4805.
7. Boyd, A.W., Bartlett, P.F. and Lackmann, M. (2014) Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands, *Nat Rev Drug Discov*, 13, 39–62.
8. Brantley-sieders, D.M. *et al.* (2008) The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling, *J. Clin. Invest.*, 118, 64–78.
9. Brennan, C.W. *et al.* (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma, *Cell*, 155, 462–477.
10. Clark, D.E. *et al.* (2005) The Serine / Threonine Protein Kinase , p90 Ribosomal S6 Kinase , Is an Important Regulator of Prostate Cancer Cell Proliferation, *Cancer Res.*, 65, 3108–3116.
11. David, J. *et al.* (2005) Essential role of RSK2 in c-Fos – dependent osteosarcoma development, *J. Clin. Invest.*, 115, 664–672.
12. Davis, T.L. *et al.* (2008) Autoregulation by the Juxtamembrane Region of the Human Ephrin Receptor Tyrosine Kinase A3 (EphA3), *Structure*, 16, 873–884.
13. Fang, W. Bin *et al.* (2005) A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis, *Oncogene*, 24, 7859–7868.
14. Feng, Y. and Walsh, C.A. (2004) The many faces of filamin : A versatile molecular

- scaffold for cell motility and signalling, *Nat. Cell Biol.*, 6, 1034–1038.
15. Furnari, F.B. *et al.* (2015) Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma, *Nat. Rev. Cancer*, 15, 302–310.
  16. Gawecka, J.E. *et al.* (2012) RSK2 Protein Suppresses Integrin Activation and Fibronectin Matrix Assembly and Promotes Cell Migration, *J. Biol. Chem.*, 287, 43424–43437.
  17. Gopal, U. *et al.* (2011) A novel extracellular Hsp90 mediated co-receptor function for LRP1 regulates EphA2 dependent glioblastoma cell invasion, *PLoS One*, 6, 1–14.
  18. Harada, K. *et al.* (2011) Ephexin4 and EphA2 mediate resistance to anoikis through RhoG and phosphatidylinositol 3-kinase, *Exp. Cell Res.*, 317, 1701–1713.
  19. Harada, K., Negishi, M. and Katoh, H. (2015) HGF-induced serine 897 phosphorylation of EphA2 regulates epithelial morphogenesis of MDCK cells in 3D culture, *J. Cell Sci.*, 128, 1912–1921.
  20. Hiramoto-yamaki, N. *et al.* (2010) Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism, *J Cell Biol*, 190, 461–477.
  21. Houles, T. and Roux, P.P. (2018) Defining the role of the RSK isoforms in cancer, *Semin. Cancer Biol.*, 48, 53–61.
  22. Kang, S. *et al.* (2010) p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells, *J. Clin. Invest.*, 120, 1165–1177.
  23. Kania, A. and Klein, R. (2016) Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 240–256.
  24. Katoh, Y. *et al.* (2017) Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR / Cas9-mediated, homology-independent knock-in system, *Mol. Biol. Cell*, 28, 898–906.
  25. Kawai, H. *et al.* (2013) Ephexin4-mediated promotion of cell migration and anoikis resistance is regulated by serine 897 phosphorylation of EphA2, *FEBS Open Bio*, 3, 78–82.
  26. Lara, R., Seckl, M.J. and Pardo, O.E. (2013) The p90 RSK family members: Common functions and isoform specificity, *Cancer Res.*, 73, 5301–5308.
  27. Liu, F. *et al.* (2006) A genome-wide screen reveals functional gene clusters in the cancer genome and identifies EphA2 as a mitogen in glioblastoma, *Cancer Res.*, 66, 10815–10823.
  28. Macrae, M. *et al.* (2005) A conditional feedback loop regulates Ras activity

- through EphA2, *Cancer Cell*, 8, 111–118.
29. Mathew, L.K. *et al.* (2015) Feedback circuitry between miR-218 repression and RTK activation in Glioblastoma, *Sci. Signal.*, 8, ra42.
  30. Miao, H. *et al.* (2000) Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal- adhesion-kinase dephosphorylation, *Nat. Cell Biol.*, 2, 62–69.
  31. Miao, H. *et al.* (2001) Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras / MAPK pathway, *Nat. Cell Biol.*, 3, 527–530.
  32. Miao, H. *et al.* (2009) EphA2 Mediates Ligand-Dependent Inhibition and Ligand-Independent Promotion of Cell Migration and Invasion via a Reciprocal Regulatory Loop with Akt, *Cancer Cell*, 16, 9–20.
  33. Nakada, M., Hayashi, Y. and Hamada, J. (2011) Role of Eph/ephrin tyrosine kinase in malignant glioma, *Neuro. Oncol.*, 13, 1163–1170.
  34. Nakamura, F., Stossel, T.P. and Hartwig, J.H. (2011) The filamins: Organizers of cell structure and function, *Cell Adhes. Migr.*, 5, 160–169.
  35. Nallapalli, R.K. *et al.* (2012) Targeting filamin A reduces K-RAS – induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice, *Mol. Cancer*, 11(50).
  36. Ohta, Y. and Hartwig, J.H. (1996) Phosphorylation of Actin-binding Protein 280 by Growth Factors Is Mediated by p90 Ribosomal Protein S6 Kinase, *J. Biol. Chem.*, 271, 11858–11864.
  37. Ostrom, Q.T. *et al.* (2015) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012, *Neuro. Oncol.*, 17, iv1–iv62.
  38. Pasquale, E.B. (2010) Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond, *Nat. Rev. Cancer*, 10, 165–180.
  39. Pratt, R.L. and Kinch, M.S. (2002) Activation of the EphA2 tyrosine kinase stimulates the MAP/ERK kinase signaling cascade, *Oncogene*, 21, 7690–7699.
  40. Ravid, D. *et al.* (2008) Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration, *Exp. Cell Res.*, 314, 2762–2773.
  41. Romeo, Y. *et al.* (2013) RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth, *Oncogene*, 32, 2917–2926.
  42. Romeo, Y., Zhang, X. and Roux, P.P. (2012) Regulation and function of the RSK family of protein kinases, *Biochem. J.*, 441, 553–569.
  43. Roskoski Jr, R. (2014) The ErbB / HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, *Pharmacol. Res.*, 79, 34–74.

44. Sabet, O. *et al.* (2015) Ubiquitination switches EphA2 vesicular traffic from a continuous safeguard to a finite signalling mode, *Nat. Commun.*, 6, 8047.
45. Savoy, R.M. and Ghosh, P.M. (2013) The dual role of filamin A in cancer : can ' t live with ( too much of ) it , can ' t live without it, *Endocr. Relat. Cancer*, 20, 341–356.
46. Shao, Q. *et al.* (2016) Filamin A : Insights into its Exact Role in Cancers, *Pathol. Oncol. Res.*, 22, 245–252.
47. Stupp, R. *et al.* (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *N. Engl. J. Med.*, 352, 987–996.
48. Sugiyama, N. *et al.* (2013) EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion, *J. Cell Biol.*, 201, 467–484.
49. Taylor, O.G. *et al.* (2019) Glioblastoma Multiforme : An Overview of Emerging Therapeutic Targets, *Front. Oncol.*, 9(963).
50. Teramoto, K. and Katoh, H. (2019) The cystine / glutamate antiporter xCT is a key regulator of EphA2 S897 phosphorylation under glucose-limited conditions, *Cell. Signal.*, 62, 109329.
51. Vadlamudi, R.K. *et al.* (2002) Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1, *Nat. Cell Biol.*, 4, 681–690.
52. Vial, D. and Mckeown-longo, P.J. (2012) Epidermal Growth Factor (EGF) Regulates  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Activation State in Human Cancer Cell Lines through the p90RSK-dependent Phosphorylation of Filamin A, *J. Biol. Chem.*, 287, 40371–40380.
53. Walker-daniels, J., Ii, D.J.R. and Kinch, M.S. (2002) c-Cbl-Dependent EphA2 Protein Degradation Is Induced by Ligand Binding, *Mol. Cancer Res.*, 1, 79–87.
54. Wang, L. *et al.* (2008) Increased expression of EphA2 correlates with adverse outcome in primary and recurrent glioblastoma multiforme patients, *Oncol. Rep.*, 19, 151–156.
55. Wiesner, S. *et al.* (2006) A change in conformational dynamics underlies the activation of Eph receptor tyrosine kinases, *EMBO J.*, 25, 4686–4696.
56. Wybenga-groot, L.E. *et al.* (2001) Structural Basis for Autoinhibition of the EphB2 Receptor Tyrosine Kinase by the Unphosphorylated Juxtamembrane Region, *Cell*, 106, 745–757.
57. Wykosky, J. *et al.* (2005) EphA2 as a Novel Molecular Marker and Target in Glioblastoma Multiforme, *Mol Cancer Res*, 3, 541–551.
58. Wykosky, J. and Debinski, W. (2008) The EphA2 Receptor and EphrinA1 Ligand

- in Solid Tumors: Function and Therapeutic Targeting, *Mol Cancer Res*, 6, 1795–1806.
59. Yang, N. *et al.* (2011) Crosstalk of the EphA2 receptor with a serine / threonine phosphatase suppresses the Akt-mTORC1 pathway in cancer cells, 23, 201–212.
  60. Zhang, K. *et al.* (2014) Filamin A expression correlates with proliferation and invasive properties of human metastatic melanoma tumors : implications for survival in patients, *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 1913–1926.
  61. Zhou, A.X., Hartwig, J.H. and Akyürek, L.M. (2010) Filamins in cell signaling, transcription and organ development, *Trends Cell Biol.*, 20, 113–123.
  62. Zhou, Y. *et al.* (2015) Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2, *Nat. Commun.*, 6, 1–12.
  63. Zhou, Y. and Sakurai, H. (2017) Emerging and diverse functions of the EphA2 noncanonical pathway in cancer progression, *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 1616–1624.
  64. Zhu, P. *et al.* (2017) Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab : A population-based study, *Oncotarget*, 8, 44015–44031.
  65. Zhuang, G. *et al.* (2010) Elevation of Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy, *Cancer Res.*, 70, 299–308.