

平成22年12月17日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014018

研究課題名（和文） がん細胞の細胞運動とその制御機構

研究課題名（英文） Migration of cancer cells and its regulatory mechanism

研究代表者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA, TADAOMI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：40101315

研究成果の概要（和文）：

アクチン重合を促進する WASP/WAVE が細胞先端部で活性化され、アクチン線維を構築して、葉状仮足形成を起し駆動力を発生し、がん細胞の浸潤、転移を行なっている事を明らかにした。更に3次元培養において、細長い間葉系形態を示す細胞は突起を形成して動き、突起形成には Rac-WAVE 系が必須であった。しかし、丸いアメーバ状の細胞は突起形成をせず、膜ブレbbingを起して運動を行なった。この形態の運動には WAVE は関与せず、Rho-actomyosin 系で運動していた。Fer は tyrosine kinase 活性を有する oncogene である。Fer には F-Bar, FX ドメインという脂質結合、膜変形活性ドメインと tyrosine kinase ドメインが存在する。FX ドメイン単独で phosphatidic acid (PA) に強く結合し、この結合によって tyrosine kinase 活性が促進されその基質である Cortactin や RacGEF である VAV2 のリン酸化を促進した。その結果、葉状仮足形成を促進し、浸潤能を更新すると考えた。

研究成果の概要（英文）：

WASP/WAVE, which induces actin polymerization is activated at the leading edge and forms lamellipodia, which generates driving force and then induces invasion and metastasis of cancer cells. Under 3 dimensional culture, elongated mesenchymal cells move with protrusion, which is dependent on Rac-WAVE system. In contrast, round amoeba like cells move with blebbing without protrusion, which is dependent on Rho-actomyosin system. Fer is an oncogene which has tyrosine kinase activity. Fer has lipid binding domain, F-Bar and FX domain and tyrosine kinase domain. F-Bar and FX domain bind to PA and its binding activates tyrosine kinase and induces the phosphorylation of Cortactin and Vav2, resulting in lamellipodia formation and invasion.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	34,100,000	0	34,100,000
2006年度	34,500,000	0	34,500,000
2007年度	44,300,000	0	44,300,000
2008年度	50,000,000	0	50,000,000
2009年度	50,000,000	0	50,000,000
総計	212,900,000	0	212,900,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：癌・細胞運動・シグナル伝達・葉状仮足

1. 研究開始当初の背景

がんの重篤さはできたがんが原発巣から遠隔地に浸潤、転移していくことにある。癌の浸潤転移を抑制できれば癌は重篤な病気ではなくなる。しかしがん細胞がいかに運動性を獲得して浸潤、転移していくのかの機序は分かっていない。我々は細胞の運動に関与する蛋白質、N-WASP や WAVE を見だし、細胞運動時の細胞先端で生じる糸状仮足や葉状仮足に関与している事やがん細胞の浸潤転移においてもこれらの蛋白質が重要な役割を果たしている事を見つけていた。

2. 研究の目的

WASP/WAVE の活性化機序を明らかにする。そして WASP/WAVE ががん細胞の運動にどのように関与しているかを明らかにする。上皮系組織形態での多細胞の動きや単細胞として間葉系細胞や、アメーバ様細胞の動きなどの運動形態の違いを明らかにして、それらのがん細胞が浸潤、転移する機序について解明する。がん遺伝子 Fer の活性か機序と浸潤促進機序を明らかにする。

3. 研究の方法

さまざまながん細胞を3次元培養をして、WASP や WAVE の変異体を導入したり、Rac や Rho シグナルを制御して細胞運動がどのように変化するかを調べる。さらに Fer をの脂質結合活性やチロシンキナーゼ活性化機序を様々な発現タンパクや細胞に発現させて調べる。

4. 研究成果

(1) WASP/WAVE によるアクチン重合促進とがん細胞の運動浸潤への影響

WASP や WAVE は共に Arp2/3 複合体を介してアクチンの核化を促進し、cortical なアクチン線維の構築に重要な働きをする。WASP 及び WAVE ファミリータンパク質の活性化機序とそのアクチン線維構築について明らかにした。(A) WASP ファミリータンパク質は通常 WIP タンパク質などと複合体を形成し、アクチン重合マシーナリー Arp2/3 複合体を結合する VCA 領域がマスクされ、非活性型となっている。外部から刺激が入り、PIP2 の増加や Cdc42 の活性化が生じると膜に行き、F-Bar ドメインを有する膜変形タンパク質に結合し、VCA 領域が露出して Arp2/3 複合体が活性化してアクチン線維を作り、糸状仮足や浸潤班 (invadopodia) を形成する。(B) WAVE ファミリータンパク質は WAVE1-3 と三種存在する

が WAVE2 が大量かつ普遍的に発現し、葉状仮足形成に必須である。通常 WAVE2 は Sra1/Nckap/Abi/HSPC300 と複合体を形成している。この複合体の1つのタンパク質でも欠けると、WAVE2 はプロテアソームにより分解されてしまう。WAVE2 も非活性化状態では VCA 領域がマスクされている。刺激が入ると PIP3 の生成、Rac の活性化を受け、WAVE2 複合体は膜に行き、I-Bar ドメインを有する膜変形タンパク質と結合し、VCA 領域が露出すると Arp2/3 複合体が結合し、アクチンの重合を引き起こす。その結果、葉状仮足形成がおこる。この系によるアクチン線維構築の特徴は運動している細胞の先端部で見られるメッシュ状のアクチン網を作る事のできる唯一の系であることである。

WASP/WAVE のがん細胞運動、浸潤への関与を調べ以下のことを明らかにした。WASP ファミリータンパク質はがん細胞の浸潤班形成に必須で、浸潤班にメタロプロテアーゼなどを集めて、がん細胞の浸潤を促進する。一方 WAVE ファミリーの中心的役割を果たす WAVE2 は間葉系がん単細胞の運動を亢進し、浸潤転移を促進する。しかし細胞間接着を持つ上皮系組織においては細胞間接着の形成や安定化に働き EMT を阻害し、浸潤転移を抑制する。実際、人の転移を起こし易いがんでは WAVE2 と複合体を作る Sra が欠損している症例が多く見つかかり、WAVE2 の量も激減し、細胞間接着が弱まっていることが報告されている。WAVE3 は正常の上皮系細胞には殆ど発現していないが、がん化した細胞では発現が見られ、作用的に WAVE2 と拮抗する。そのため、WAVE3 の発現は上皮系細胞の細胞間接着の安定性を弱め、EMT が起こり易くなり、がん細胞の浸潤、転移を促進することが示唆された。

(2) がん細胞運動の制御機構

ほとんどのがんは上皮系組織で生じる。その後、原発巣から離脱し浸潤、転移していく。原発巣から離脱する際に、上皮-間葉移行が起こり、単細胞がんとなり、更には間葉-アメーバ移行が生じ、更に浸潤、転移をし易くなると言われる。しかし、どのような機序でがん細胞がこれらの形質転換を起こすのか明らかではない。

3次元マトリクス中でのがん細胞の運動には2種類ある。細長い細胞の間葉系細胞様の運動と丸い細胞のアメーバ様運動である。アメーバ様運動はアクトミオシンによる収縮が

運動の動力発生で mRho/ROCK で制御されている。一方、細長い間葉系の細胞の運動機序は明らかではなかった。我々は間葉系細胞の運動は Rac で制御され、WAVE2/Arp2/3 による葉状仮足形成がその駆動力になっている事を明らかにした。Rac シグナルの細胞運動への関与も 3 次元中で細長い形の間葉系細胞でも、まちまちであった。U87MG グリオブラストーマでは、ほとんどが間葉系細胞様の動きをした。この細胞の Rac のシグナルを抑制すると細胞の浸潤は阻害された。HT1080 細胞はその形が細長いのと丸いとの混合で、混合型の細胞運動を示した。Rac シグナルの抑制は間葉系の細胞からアメーバ様の細胞へとの移行を生じ、細胞の浸潤は抑制されなかった。しかし、HT1080 細胞の Rac と Rho の両シグナルを抑制すると浸潤は著明に阻害された。これらの結果から細胞の浸潤は Rac 系と Rho 系の両方のシグナルで制御され、がん細胞は状況に応じて間葉系からアメーバ様にまたアメーバ様から間葉系にその運動形式を変える事ができることを明らかにした。

(3)がん遺伝子 Fer の活性化機序の解明

初期頃の発ガン遺伝子探しのなかで Fes/Fer は見つけれられた。しかし tyrosine kinase 活性を有するものの、正常な Fes/Fer がいかにして活性化され、癌を誘導するのかについては全く分かっていなかった。Fes/Fer のうち普遍的に発現している Fer を取り上げ、tyrosine kinase 活性化機序や生理機能について明らかにしようとした。Fer は N-末に F-Bar ドメインという我々が見いだした脂質結合、膜変形活性ドメインを有し、C-末側に tyrosine kinase ドメインがある。まず F-Bar ドメインの脂質結合活性を調べた。発現させて精製した F-Bar ドメインを用いて酸性リン脂質を網羅的に解析したが、著明に結合する脂質は見られなかった。そこで Fer のアミノ酸配列をよく見ていると F-Bar ドメインのすぐ後に非常に Fes/Fer 間で保存されている部位がある事に気づいた。この部位を FX ドメインと名付け、この部位 FX 及び F-Bar+FX の脂質結合活性を調べた。すると FX ドメイン単独でも F-Bar+FX ドメインでも phosphatidic acid (PA) にもっとも強く結合した。次にこの結合が tyrosine kinase 活性を活性化するかどうか全長の Fer に PA を含むリポソームを加えて調べた。Tyrosine kinase 活性は PA の含まれる量に従って活性化された。更に PA の付加により Fer の重要な基質だと考えられている Cortactin のリン酸化や RacGEF である VAV2 のリン酸化を促進するかどうか確かめたところ、PA の付加でこれらの蛋白質のリン酸化が

促進された。なお tyrosine kinase 活性を有さない Fer 変異体はリン酸化を起こさずまた、Fer をロックダウンした細胞に、tyrosine kinase dead の Fer の Fer を発現させてもリン酸化は戻らなかった。一方 Fer のロックダウンで葉状仮足形成は完全に阻害された。これらのことから細胞が活性化を受け PLD が活性化され、PA が産生される。その結果、Fer が活性化され、Cortactin や VAV3 の活性化を起こし、葉状仮足形成に至るという一連のシグナル伝達が明らかになった。

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 28 件) (総計 56 件)

1. Takano K, Takano H, Suetsugu S, Kurita S, Tsujita K, Kimura S, Karatsu T, Takenawa T, and Endo T. Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF1-induced sarcomeric actin filament formation Science (査読あり) 330: 1536-1540 (2010)
2. Kurisu S, and Takenawa T. WASP and WAVE family proteins: Friends or foes in cancer invasion? Cancer Sci. (査読あり) 101: 2093-2104 (2010)
3. Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, and Sasaki T. The PtdIns(3,4)P2 phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. Nature. (査読あり) 465: 497-501 (2010)
4. Tsujita K, Itoh T, Kondo A, Oyama M, Kozuka-Hata H, Irino Y, Hasegawa J, and Takenawa T. Proteome of acidic phospholipid-binding proteins: Spatial and temporal regulation of coronin 1A by phosphoinositid. J Biol Chem. (査読あり) 285: 6781-6789 (2010)
5. Itoh T, Hasegawa J, Tsujita K, Kanaho Y, and Takenawa T. The tyrosine kinase Fer is a downstream target of the PLD-PA pathway that regulates cell migration. Sci Signal. (査読あり) 2: ra52. (2009)
6. Fujita A, Cheng J, Tauchi-Sato K, Takenawa T, and Fujimoto T. A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読あり) 106: 9256-9261 (2009)
7. Yamazaki D, Kurisu S, and Takenawa T. Involvement of Rac and Rho signaling in

- cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene* (査読あり) 28: 1570-1583 (2009)
8. Oikawa T, Itoh T, Takenawa T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* (査読あり) 182: 157-169 (2008)
 9. Ijuin T, Yu Y.E, Mizutani K, Pao A, Tateya S, Tamori Y, Bradley A, and Takenawa T. Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol. Cell Biol.* (査読あり) 28: 5184-5195 (2008)
 10. Kanzaki N, Ogita H, Komura H, Ozaki M, Sakamoto Y, Majima T, Ijuin T, Takenawa T, and Takai Y. Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. *J. Cell Sci.* (査読あり) 121: 2008-2017 (2008)
 11. Tokuda E, Fujita N, Oh-Hara T, Sato S, Kurata A, Katayama R, Itoh T. Takenawa T, Miyazono K, and Tsuruo T. Casein Kinase 2 Interacting Protein-1, a Novel Akt Pleckstrin Homology Domain-Interacting Protein, Down-regulates PI3K/Akt Signaling and Suppresses Tumor Growth In vivo. *Cancer Res.* (査読あり) 67: 9666-9676 (2007)
 12. Eto K, Nishikii H, Ogaeri T, Suetsugu S, Kamiya A, Kobayashi T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T, and Nakauchi H. The WAVE2/Abi1 complex differentially regulates megakaryocyte development and spreading: implications for platelet biogenesis and spreading machinery. *Blood.* (査読あり) 110: 3637-3647 (2007)
 13. Suetsugu S, Banzai Y, Kato M, Fukami K, Kataoka Y, Takai Y, Yoshida N, and Takenawa T. Male-specific sterility caused by the loss of CR16. *Genes Cells.* (査読あり) 12: 721-733 (2007)
 14. Yanagida-Asanuma E, Asanuma K, Kim K, Donnelly M, Young Choi H, Hyung Chang J, Suetsugu S, Tomino Y, Takenawa T, Faul C, and Mundel P. Synaptopodin Protects Against Proteinuria by Disrupting Cdc42:IRSp53:Mena Signaling Complexes in Kidney Podocytes. *Am. J. Pathol.* (査読あり) 171: 415-427 (2007)
 15. Yokoyama T, Takano K, Yoshida A, Katada F, Sun P, Takenawa T, Andoh T, and Endo T. DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* (査読あり) 177: 781-793 (2007)
 16. Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, Azkasaka R, Nishino Y, Toyama M, Chen L, Sugano S, Shirouzu M, Nagayama K, *Takenawa T, and *Yokoyama S.(Correspondent author) Curved EFC/F-Bar domein dimmers are jointed end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell.* (査読あり) 129: 761-772 (2007)
 17. Park S.J, Suetsugu S, Sagara H, and Takenawa T. HSP90 cross-links branched actin filaments induced by N-WASP and the Arp2/3 complex. *Genes to Cells.* (査読あり) 12: 611-622 (2007)
 18. Takenawa T, and Suetsugu S. Cordinated regulation of membrane and cytoskeleton by WASP/WAVE family proteins and their binding partoners. (Review) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (査読あり) 8: 37-48 (2007)
 19. Yamazaki D, Oikawa T, and Takenawa T. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* (査読あり) 120: 86-100 (2007)
 20. Suetsugu S, Murayama K, Sakamoto A, Hanawa-Suetsugu K, Seto A, Oikawa T, Mishima C, Shirouzu M, Takenawa T, and Yokoyama S. The RAC-binding domain/IRSP53-MIM homology domain of IRSP53 induces RAC- dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem.* (査読あり) 281: 35347-35358 (2006)
 21. Suetsugu S, Kurisu S, Oikawa T, Yamazaki D, Oda A, and Takenawa T. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J. Cell Biol.* (査読あり) 173: 571-585 (2006)
 22. Tsujita K, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Suetsugu S, and Takenawa T. Coordination between actin cytoskeletal reorganization and the membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of the PCH protein family involved in endocytosis *J. Cell Biol.* (査読あり) 172: 269-279 (2006)
 23. Sawa M, and Takenawa T. Caenorhabditis elegans WASP-interacting protein WIP-1 is involved in morphogenesis through maintenance of WSP-1 protein levels *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (査読あり) 340: 709-717 (2006)
 24. Kawano Y, Yoshimura T, Tsuboi D, Kawabata S, Kaneko-Kawano T, Shirataki H, Takenawa T, and Kaibuchi K. CRMP-2 is involved in kinesin-1-dependent transport of the Sra-1/WAVE1 complex and axon formation *Mol. Cell Biol.* (査読あり) 25: 9920-9935. (2005)
 25. Yamazaki D, Kurisu S, and Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* (査読あり) 96: 379-386 (2005)
 26. Park S. J, Suetsugu S, and Takenawa T. Interaction of HSP90 to N-WASP leads to

- activation and protection from proteasome-dependent degradation. EMBO J. (査読あり) 24: 1557-1570 (2005)
27. Kurisu S, Suetsugu S, Yamazaki D, Yamaguchi H, and Takenawa T. Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells. Oncogene (査読あり) 24: 1309-1319 (2005)
28. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, and Condeelis J. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. J. Cell Biol. (査読あり) 168: 441-452 (2005)

[学会発表] (計 11 件) (総計 61 件)

1. Takenawa T. :Mechanism of cell movement: Disruption of regulatory mechanism for movement in cancer cells. F-Bar and Bar domain, 29 March 2010 Griffith Univ. Queensland, Australia
2. Takenawa T. :Interface proteins between membrane and actin cytoskeleton. Membrane deforming Proteins, 15 March 2010 Madrid, Spain
3. Takenawa T. :Phosphoinositide-binding proteins that induce membrane deformation. Second International Conference on F-BAR Proteins, 1-3 October 2009 Stockholm, Sweden
4. Takenawa T. :WASP/WAVE proteins are involved ion invasion and metastasis of cancer cells. Physiological Meeting, 22-23 Oct 2008 Seoul, Korea
5. Takenawa T. :Phosphoinositide-binding proteins that induce membrane deformation with N-WASP/WAVE proteins. 2nd Singapore Lipid Symposium, 5-7 March 2008 Singapore
6. Takenawa T. :WAVEs regulate lamellipodia formation and the movement of cancer cells with high Rac activity 4th international Symposium on Functional molecules linked to neurodegeneration and oncogenesis, 25-26 October 2007 Nagoya
7. Ijuin T, Takenawa T. :Specific regulation of insulin signaling in skeletal muscle by the PIP3 phosphatase, SKIP 2nd International Symposium on the 21st century COE program, Akita Univ, School of Medicine, 23-25 June 2006 Akita
8. Takenawa T, Yamazaki D, Suetsugu S. :Role of WAVE2 in Collective migration of epithelial cells. 20th IUBMB International Conference of Biochemistry and Molecular Biology, 18-23 June 2006 Kyoto
9. Takenawa T. :Detection of a trace amount of phosphoinositides by phosphoinositide-binding domains Inositol

- Phosphates and Lipids Regulation and Functions, 60th Harden Conference, Ambleside, 13-18 August 2005 UK
10. Takenawa T. :Reconstitution of Rac-mediated actin assembly by the WAVE2 complex, IRSp53 and PIP3 for lamellipodia formation ASCB Summer Meeting, 27-30 July 2005 Seattle, USA)
 11. Takenawa T. :Activation mechanism of WAVE family proteins Gordon Conference, Mechanism of cell signaling, 12-17 June 2005 Hong Kong,

[図書] (計 2 件)

1. 竹縄 忠臣 : 編集 脂質生物学 実験医学 28, 3201-3437 総 237P (2010)羊土社
2. 竹縄 忠臣 : 第 3 章細胞骨格 医学細胞生物学 総 356P(2009)東京化学同人

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/lipid/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA TADAOMI)
神戸大学・大学院医学研究科・特命教授
研究者番号 : 40101315

(2) 研究分担者

末次 志郎 (SUETSUGU SHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師
研究者番号 : 70345031
(2005-2006 年度)

伊集院 壮 (IJUIN TAKESHI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 00361626
(2005-2007 年度)

(3) 連携研究者

伊集院 壮 (IJUIN TAKESHI)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 00361626
(2008-2009 年度)

山崎 大輔 (YAMAZAKI DAISUKE)

神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 50422415
(2008-2009 年度)