

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15084

研究課題名（和文）1分子構造変化をターゲットとしたがん浸潤・転移の克服に向けた診断・治療戦略

研究課題名（英文）A novel therapeutic strategy targeted the conformational plasticity of a single molecule for cancer cell invasion and metastasis

研究代表者

佐々木 卓也（SASAKI, Takuya）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学系）・教授

研究者番号：40241278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、がんの治療戦略として集団的浸潤に注目した研究を進めた。集団的浸潤の制御系としてRab13-JRABに注目し、まずこれまで不明だったJRABのRab13依存的な構造変化モデルを提示した。さらに、JRABの構造変化が時間や場所に応じたアクチン細胞骨格の再編成を制御し、その結果、細胞集団の局所での方向性や速度、集団の先頭で生み出される牽引力を調節することを明らかにした。すなわち、JRABの構造の可塑性が、集団的浸潤における「秩序や法則性」を生み出すことを示すことができ、JRABというたった1分子の構造変化をターゲットにしたがん浸潤・転移の制御に向けた戦略開発に繋がることが期待された。

研究成果の概要（英文）：We generated a structural model of JRAB/MICAL-L2 through a combination of bioinformatic and biochemical analyses and thereby revealed how JRAB/MICAL-L2 interplays with Rab13 and how its conformational change occurs. In addition, we elucidated that the conformational plasticity in JRAB/MICAL-L2 causes spatiotemporal actin cytoskeletal rearrangement to control direction and speed of cell movement and traction force of the cell population through a robust approach combining cell biology, live imaging, computational biology, and biomechanics. Moreover, we showed that JRAB/MICAL-L2 conformational plasticity is necessary for migration of cell group under 3D environment. These findings suggest that the conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 generates 'low and order' in the cancer cell invasion. Thus, our multidisciplinary approach will bring a novel therapeutic strategy targeted the conformational plasticity of a single molecule for cancer cell invasion and metastasis.

研究分野：生化学

キーワード：がん浸潤・転移 集団的浸潤 Rab13 JRAB 構造変化

### 1. 研究開始当初の背景

がんが転移する際には、がん原病巣から、一部のがん細胞が上皮間葉転換 (EMT) を起こし、細胞間の接着能を失うことで運動能を獲得して周囲組織に浸潤し、さらには、血管内へ移行して遠隔臓器に転移する。一方で、最近、肺がんや乳がん等の一部のがん細胞では、EMT を起こさずに、1つの集団を形成してまとめて浸潤する病理像 (集団的浸潤) が観察され、予後や悪性度といった点からも注目されている。この集団的浸潤については、細胞間での接着を維持したまま集団で動くという複雑さからその分子基盤の解明は立ち後れている。集団的浸潤では、細胞集団の先頭の一部の細胞において集団をある方向に牽引するのに必要な強い力が生み出され、その一方で、後方の大多数の細胞において、隣の細胞と離れないようにしっかりと接着を維持しながら細胞間でのコミュニケーションをはかることにより、集団としての振る舞いが可能となる。そこには何らかの秩序や法則性が存在すると予想されるが、その本体は、個々の細胞の運動と細胞-細胞間接着形成を連動させるアクチン細胞骨格の時空間制御機構と考えられる。研究代表者は、これまでに上皮細胞において細胞間接着分子の輸送を介して細胞間接着形成を制御する系として Rab13 低分子量 G 蛋白質とその標的蛋白質 JRAB を同定していたが、最近、この Rab13-JRAB 系が、アクチン細胞骨格の再編成を時空間的に制御することを見出したことから、この系が集団的浸潤の秩序と法則性を生み出す本体となり得るという着想に至った。実際に、これまでに研究代表者が行った生化学的解析からは、JRAB が Rab13 との相互作用によって closed form から open form へと構造を変化させることが示唆されており、さらに、新たに見出した open form や closed form に固定され構造変化できない変異体を発現させたがん細胞の集団移動には異常が認められることから、JRAB の構造変化ががん細胞の集団的浸潤において重要な役割を果たすことが予想される。

### 2. 研究の目的

がん細胞の集団的浸潤においては、統率のとれた集団としての振る舞いを可能とするなんらかの秩序や法則性が生み出されると予想されるが、その本体は、個々の細胞の運動と細胞-細胞間接着形成を連動させるアクチン細胞骨格の時空間制御機構と考えられる。上述したように、Rab13-JRAB 系は接着分子の輸送を介して上皮細胞間接着形成を制御するだけでなく、アクチン細胞骨格の再編成を時空間的に制御している。さらに、これまでに研究代表者は生化学的解析を行って、JRAB が Rab13 との相互作用によって closed form から open form へと構造変化を引き起こすことを示唆する結果を得ている。また、新たに見出した open form や closed form

のまま構造変化できない変異体を発現させたがん細胞の集団移動で異常を見出し、細胞集団の移動において Rab13 との結合に依存した JRAB の構造変化が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。そこで、本研究では、JRAB というたった 1 分子の構造変化をターゲットにしたがん浸潤・転移の制御に向けた戦略を見出すことを試みた。

### 3. 研究の方法

がん細胞の集団的浸潤においては、様々な細胞外環境の変化に対応しながら集団としての統率のとれた振る舞いを可能とする「秩序や法則性」が存在すると考えられる。研究代表者は、これまでのがん細胞株を用いた wound healing assay の解析結果に基づいて JRAB の構造変化がその「秩序や法則性」を生み出す本体であるという仮説を提唱している。しかし、実際に JRAB の構造変化をターゲットにしてがん細胞の集団的浸潤への臨床応用を目指す場合、JRAB の構造変化そのものを認識する手法が必須となる。そこで、本研究では、バイオインフォマティクスと生化学の融合研究により、JRAB の構造変化の実体を明らかにするとともに、そこで得られた情報を基に構造変化を感知できる抗体や構造変化を阻害するペプチドの作製を試みた。

#### (1) JRAB の構造変化モデリング

JRAB の Rab13 依存的な構造変化は、主に生化学的解析から提唱したモデルであったため、その実態を明らかにするために JRAB 単独および Rab13-JRAB 複合体の結晶化解析を試みたが、JRAB 全長のリコンビナント蛋白質の精製が非常に困難であり、これまでのところ成功していない。そこで、医薬基盤研の水口賢司博士のグループとの共同研究で、バイオインフォマティクスの手法を用いた JRAB の構造モデリングを行った。in silico の立体構造モデリングの各過程で、検証のために生化学的実験を行って得られたモデルに修正を加えるという作業を繰り返し、Rab13-JRAB 複合体の構造モデルの構築を試みた。

#### (2) 細胞集団内での JRAB の時空間構造変化の証明

JRAB の N 末端側と C 末端側の結合・非結合を感知するシステムである JRAB の FRET プローブを恒常的に発現させた細胞株を用いて実際に動く細胞集団内において JRAB の構造の時空間変化が起こっているか否かを調べた。

#### (3) 細胞集団の動きにおける JRAB の構造変化の重要性の証明

研究代表者は、これまで、JRAB が open form や closed form に固定された変異体を発現した細胞株を用いて創傷治癒アッセイを行い、

JRAB の構造変化の阻害が細胞集団の動きの異常につながることを見出ししていた。その際、得られたライブイメージングの動画をもとに理化学研究所の横田秀夫博士のグループとの共同研究で、ポリウムレンダリング、オプティカルフロー等のコンピュータサイエンスの手法により各変異体のライブイメージング像の特徴を抽出してそれらの定量化を行った。さらに、名古屋工業大学(現大阪大学)の出口真次博士との共同研究で、バイオメカニクス的手法を用いた力学的解析を行った。

(4) 細胞集団の動きを支えるアクチン細胞骨格の時空間制御における JRAB の構造変化の役割の証明

動く細胞集団において JRAB の open form と closed form が担う各々の役割を明らかにすることを試みた。(3)と同様に JRAB が open form および closed form の変異体を発現した細胞株を用いた創傷治癒アッセイを行って細胞集団の先頭に位置する細胞と後方の細胞において見られるアクチン細胞骨格の再編成を解析した。

(5) 3次元での細胞集団の動きにおける JRAB の構造変化の重要性の証明

研究代表者は、JRAB が open form や closed form に固定された変異体を発現した MDCK 細胞を作製し、北海道大学の芳賀永教授の開発した3次元培養系を用いて各々のコラーゲンゲル内での細胞集団運動に基づく管腔形成過程を解析し、JRAB の構造変化の3次元環境下での重要性を明らかにすることを試みた。

(6) がん転移における JRAB の構造変化の役割の個体レベルでの解明

本研究では、ヒトの高転移性肺がん細胞株を用いて Rab13 との相互作用による JRAB の構造変化が、実際に生体内でのがんの浸潤・転移において重要な役割を果たしているかを調べた。具体的には、蛍光蛋白質を融合させた JRAB の構造変異体および Rab13 の活性変異体を発現させたヒト肺がん細胞株を作製して免疫不全マウスに接種し、その転移巣の時間経過を in vivo イメージャーによって追跡するとともに、転移の病理切片も作製してその病理像を詳細に解析することにより、個体レベルでのがんの浸潤・転移における JRAB の構造変化の重要性を証明することを試みた。

#### 4. 研究成果

がん細胞の集団的浸潤の過程では、個々の細胞の運動と細胞-細胞間接着形成を連動させるアクチン細胞骨格の時空間制御機構が非常に重要な役割を担っている。本研究は、JRAB というたった1分子の構造変化をターゲットにしたがん浸潤・転移の制御に向けた

戦略を見出そうと試みる大胆かつ斬新な発想に基づき、まず、Rab13 を介した JRAB の構造変化の実体を証明し、さらに、得られた構造情報を基に JRAB の構造変化を感知する抗体や阻害するペプチドの作製を目指したものである。

これまでに、バイオインフォマティクスと生化学を組み合わせた手法によって JRAB の立体構造における Rab13 の結合領域が明らかになるとともに、JRAB の分子内結合が Rab13 との相互作用により解除されて構造変化 (closed form から open form) が引き起こされるといった JRAB の Rab13 依存的な構造変化モデルを提示することができた。さらに、JRAB の FRET プローブを用いた解析によって細胞が集団で動く際、JRAB は時間や細胞集団内での位置に依存してその構造を変化させていることを証明した。本研究では、上皮細胞を用いてライブイメージング、コンピュータサイエンスやバイオメカニクスを駆使した多角的解析を展開した。ポリウムレンダリング、オプティカルフローといったコンピュータサイエンスの手法を用いた解析によって JRAB の構造の可塑性が細胞集団局所での方向性や速度を調節することによって効率の良い細胞集団の動きを可能にすることを証明できた。さらには、バイオメカニクス的手法を用いた力学的解析によって JRAB の構造変化が細胞集団の先頭で生み出される牽引力を調節していることを明らかにした。また、JRAB の open form または closed form を発現した細胞集団におけるアクチン細胞骨格の再編成を詳細に解析し、closed form の JRAB が細胞集団の自由縁でアクチン線維の束の形成を促進し、open form の JRAB が細胞間接着部位でのアクチン線維の安定化を制御していることで効率の良い細胞集団の動きが実現していることを示した。コラーゲンゲル内の3次元環境下においても JRAB の構造変化の阻害による細胞集団の動きの異常に基づく管腔形成の異常が認められた。したがって、生理的環境に近いコラーゲンゲル内の3次元環境下での細胞運動における JRAB の構造変化の重要性を明らかにすることができた。さらに、個体レベルでのがん転移における重要性を証明するため、JRAB の構造変異体を発現させた肺がん細胞を作製し、マウス個体を用いたがん転移実験を開始したが、本研究期間中には最終的な結論を得るには至らなかった。また、本研究では、JRAB の構造変化を感知できる抗体や JRAB と JRAB 結合分子群の蛋白質間相互作用を阻害する抗体、ペプチドの産生を目指したが、これらについても本研究期間中には十分な成果が得られなかったため、今後も継続してチャレンジしていきたい。

#### 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 1 件)

Sakane, A., Yoshizawa, S., Nishimura, M., Tsuchiya, Y., Matsushita, N., Miyake, K., Horikawa, K., Imoto, I., Mizuguchi, C., Saito, H., Ueno, T., Matsushita, S., Haga, H., Deguchi, S., Mizuguchi, K., Yokota, H. and \*Sasaki, T.

Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides ‘law and order’ in collective cell migration.

*Mol. Biol. Cell*, 27(20), 3095-3108 (2016)  
(査読有)

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース(徳島大学、理化学研究所、  
医薬基盤・健康・栄養研究所同時発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 卓也 (SASAKI Takuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：40241278