

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04785

研究課題名(和文)細胞極性の形成における細胞膜張力の役割

研究課題名(英文)Role of plasma membrane tension in cell polarity

研究代表者

伊藤 俊樹 (Itoh, Toshiki)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：30313092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜にかかる物理的パラメータである「膜張力」に着目し、細胞の形態形成と生理機能に必須の役割を担う「細胞極性」の成立を司るメカノシグナリングの分子実体の解明を目的とした。メカノシグナル因子として細胞膜直下のアクチン細胞骨格を制御するイノシトールリン脂質に着目し、上皮細胞の癌化に伴う特徴的な局在現象を見出した。具体的にはPI3キナーゼ産物であるPI(3,4,5)P3が基底膜側で顕著に増加する一方、PI(4,5)P2はアピカル面に逸脱した癌細胞膜の全周に分布した。がん抑制遺伝子PTENが、上皮細胞の癌化に伴う浸潤現象に促進的に働く可能性を示唆する知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞の浸潤、転移現象は悪性腫瘍の治癒を困難にする主要因となっている。本研究では、癌細胞の運動を司る機構として、細胞膜に係る物理的な張力に着目することでその理解を目指した。その結果、癌遺伝子の活性化に伴い細胞膜直下のアクチン細胞骨格を制御するイノシトールリン脂質の劇的な変化が起こること、その分布が癌細胞の移動と密接に関連していることが明らかになった。また、イノシトールリン脂質を制御する酵素活性を有するがん抑制遺伝子であるPTENの欠損実験から、これまで知られていない成果が得られた。これらの知見により、悪性腫瘍の浸潤、転移現象に対する従来にない対策につながるものが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on the membrane tension which is a physical parameter related to the cell membrane. We aim to elucidate the molecular mechanism of mechano-signaling that controls "cell polarity" which plays an essential role in cell morphogenesis and physiological functions. By monitoring the intracellular localizations of inositol phospholipids that regulate the actin cytoskeleton, we found a characteristic localization of these lipids associated with epithelial cell carcinogenesis. Specifically, PI(3,4,5)P3, a PI3-kinase product, increased remarkably on the basal side of the plasma membrane, while PI(4,5)P2 was distributed all around the cancer cell membrane that deviated from the apical surface. Our findings also suggest that the tumor suppressor gene PTEN may play a role in the invasive phenomenon associated with epithelial cell carcinogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：イノシトールリン脂質 細胞膜 細胞骨格 細胞運動 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「細胞極性」は、個体を構成するさまざまな種類の細胞に固有の形態を付与するだけでなく、その機能発現においても重要な役割を担っている。例えば、上皮細胞は頂底方向の極性を伴う「円柱状」の形態をもち、管腔組織の形成と方向性のある分泌・吸収をおこなっている。神経細胞は一本の長い軸索を有する極性化した「樹状」の形態をとることで、効率的かつ複雑な神経伝達を可能にしている。また、上皮細胞における「頂底極性の崩壊」と「運動方向への前後極性の獲得」は腫瘍の悪性化と密接な関係にあり、臨床的な意義も大きい。このような細胞極性の成立と再構成の過程では、細胞の最外郭構造である細胞膜には「膜張力」と呼ばれる物理的な力がかかっている。膜張力は、(1)脂質二重層を水平方向に引っ張る「平面張力(planar tension)」と(2)細胞膜直下のアクチン骨格による「表層張力(cortical tension)」の総和であり、前者は主として細胞内外の浸透圧差が、後者は細胞膜と裏打ちタンパク質との相互作用が寄与している。近年の研究から膜張力は、細胞運動や極性形成、個体発生など、細胞のダイナミックな形態変化を伴うさまざまな生命現象における重要な物理的因子として捉えられるようになってきた。しかしながら、「膜張力の発生を制御しこれに応答する」機構、すなわち膜張力がどのようにして細胞の挙動を規定するのか、というメカニズムについてはその分子実体を含め、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでの実績に基づき、本研究においては「細胞極性の形成」における細胞膜の「膜張力」を介したメカノシグナリングの分子実体を明らかにすることを目的とする。特に、頂底方向への明確な細胞極性をもち上皮細胞を対象に、癌化に伴い活発な細胞運動能を獲得する「上皮間葉転換」における細胞膜張力の制御因子とセンサー因子を同定し、その作用機序を明らかにする。さらに、高度な運動能を獲得した癌細胞における、細胞膜直下のアクチン細胞骨格を制御するマスターレギュレーターとしてイノシトールリン脂質シグナリングに着目し、その機能を明らかにすることで、腫瘍悪性化の新たなメカニズムの導出を目指す。本研究によって得られる成果は、細胞極性の形成と制御に関わる全く新しい分子メカニズムの発見につながり、腫瘍悪性化の主因である浸潤・転移を引き起こす「上皮間葉転換」の新たな理解と、その予防・治療戦略に向けた従来になかった分子基盤をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

細胞膜張力のマスターレギュレーターであるイノシトールリン脂質に焦点を絞り、その細胞内局在を可視化する上皮細胞株の樹立を行う。まず、PI(4,5)P₂を認識するPLC 1のPHドメインにmCherryタグを付加した配列、およびPI(3,4,5)P₃を認識するAktのPHドメインにGFPタグを付加した配列を、IRES配列を挟んでタンデムにつないだ共発現コンストラクトを構築する。レトロウィルスベクターを用いて、このインサートをイヌ腎由来の上皮細胞であるMDCK細胞に安定的に導入し、2種類のイノシトールリン脂質分子種を同時にモニターするMDCK細胞株を樹立する。この細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、その局在を明らかにする。また、上皮細胞の癌化に伴う極性崩壊における脂質動態を観察するため、がん遺伝子を当該のMDCK細胞株に導入する。がん遺伝子発現によって誘導されるMDCK細胞の挙動を観察しながら、各イノシトールリン脂質の局在変化との相関関係を明らかにする。さらに、上皮細胞の癌化における浸潤能を評価するため、マトリゲルインベーションチャンバーを用いた浸潤アッセイを行う。癌細胞の浸潤性運動の過程における各イノシトールリン脂質の挙動を明らかにし、細胞膜張力の発生と組織内での細胞運動との相関関係について洞察を得る。次に、イノシトールリン脂質代謝酵素のノックダウン、あるいはノックアウト細胞を樹立し、癌化における浸潤能を検討する。影響が見られた場合はレスキュー実験を行い、イノシトールリン脂質代謝と癌細胞の浸潤性運動との相関を明らかにする。

4. 研究成果

まず、イノシトールリン脂質の細胞内局在を可視化する上皮細胞株の樹立を試みた。研究計画に従い、mCherryおよびGFPタグをそれぞれPI(4,5)P₂を認識するPLC 1のPHドメインおよびPI(3,4,5)P₃/PI(3,4)P₂を認識するAktのPHドメインに付加し、IRES配列を挟んでタンデムに持つコンストラクトを構築した。作製した組換えレトロウィルスをイヌ腎由来の上皮細胞であるMDCK細胞に安定的に導入し、約100株の耐性細胞株をスクリーニングしたところ、両方の蛍光タンパク質を発現する細胞は得られなかった。そこで、P2A配列を挟んでこれらのプロンプト遺伝子をタンデムに配置し、piggybacトランスポゾン法を用いて安定発現株を得たところ、2種類のイノシトールリン脂質分子種を同時にモニターするMDCK細胞株を樹立することに成功した(図1)。この細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、従来の報告に合致するように、PI(4,5)P₂はアピカル面の細胞膜に、PI(3,4,5)P₃/PI(3,4)P₂はバソラテラル面の細胞膜に選択的に局在している様子が認められた。

次に、この細胞株を用いて、がん遺伝子発現に伴う極性崩壊における脂質動態を観察した。がん遺伝子としてRasの恒常的活性化型変異体(RasG12V)を選択し、MDCK細胞株に遺伝子導入を行った。その結果、細胞は上皮間葉転換を起こしながら基質面方向へ活発に運動する様子が認められた。高倍率観察を行うと、細胞膜が激しく波打つラッフル形成が認められるとともに、

PI(3,4,5)P3/PI(3,4)P2 が集積した。遺伝子発現から 48 時間後には、RasG12V を発現する MDCK 細胞は既報通り上皮細胞層から逸脱したが、その際、細胞辺縁の細胞膜には PI(4,5)P2 が高度に集積することが明らかとなった。一方で、PI(3,4,5)P3/PI(3,4)P2 は細胞内部のマクロピノソーム膜上に特異的に蓄積しており、細胞膜上からは失われていた。

RasG12V を上皮細胞株 MDCK に発現すると、活発な細胞運動が観察されたことから、当該癌細胞の浸潤能を評価するため、マトリゲルインベーションチャンバーを用いた浸潤アッセイを行った。その結果、予想通り高度な浸潤能が観察された。次に、Ras 活性化によるイノシトールリン脂質 PI(3,4,5)P3 の増加に着目し、PI(3,4,5)P3 脱リン酸化酵素でありがん抑制遺伝子として知られる PTEN に着目した。CRISPR-Cas9 を用いて PTEN 遺伝子を欠損する MDCK 細胞株を樹立し、RasG12V 発現における浸潤能を検討した。すると驚くべきことに、PTEN 遺伝子欠損により、Ras 依存的な浸潤活性が著しく低下することが観察された(図2)。この現象は野生型 PTEN 遺伝子により回復したが、PI(3,4,5)P3 ホスファターゼ活性を失った変異体では回復しなかった。

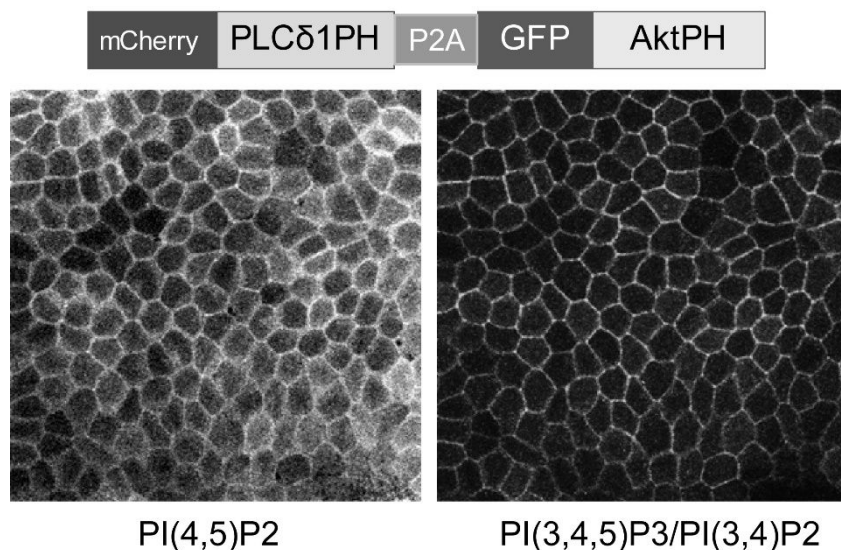


図1 イノシトールリン脂質 PI(4,5)P2 (左) と PI(3,4,5)P3/PI(3,4)P2 (右) を同時にモニターする MDCK 細胞株の樹立。

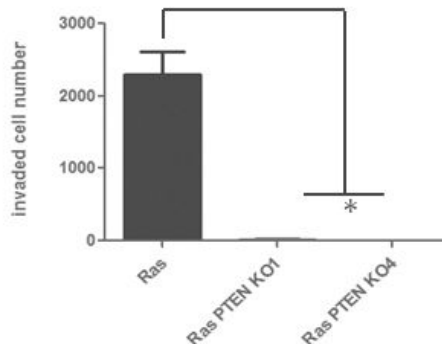
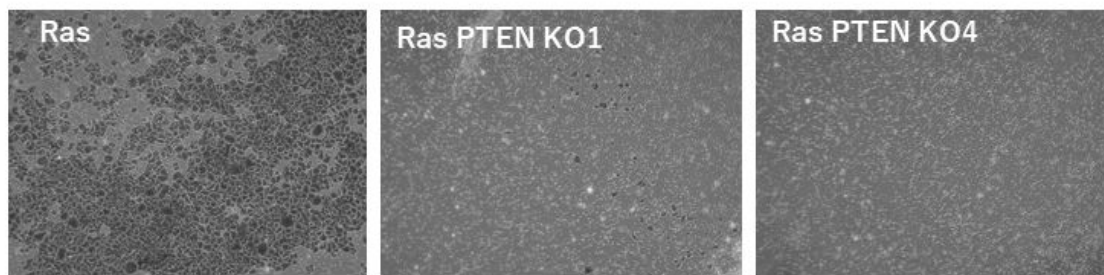


図2 PTEN ノックアウト MDCK 細胞における Ras 活性化依存的な浸潤能の抑制。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto, H., Kondo, A., Itoh, T.	4. 巻 495
2. 論文標題 A curvature-dependent membrane binding by tyrosine kinase Fer involves an intrinsically disordered region.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1522-1527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakaguchi Kana, Shirai Yasuhito, Itoh Toshiki, Mizuno Masashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Lentian Exerts its Anti-Inflammatory Activity by Suppressing TNFR1 Transfer to the Surface of Intestinal Epithelial Cells through Dectin-1 in an in vitro and mice model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunome Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/1745-7580.1000165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuda Toshihiro, Baba Kentarou, Nomura Takeshi, Tsujita Kazuya, Murayama Tomo, Itoh Toshiki, Takatani-Nakase Tomoka, Sokabe Masahiro, Inagaki Naoyuki, Futaki Shiroh	4. 巻 2
2. 論文標題 An influenza-derived membrane tension-modulating peptide regulates cell movement and morphology via actin remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0486-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Junya, Jebri Imen, Yamamoto Hikaru, Tsujita Kazuya, Tokuda Emi, Shibata Hideki, Maki Masatoshi, Itoh Toshiki	4. 巻 132
2. 論文標題 SH3YL1 cooperates with ESCRT-I in the sorting and degradation of the EGF receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.229179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤俊樹
2. 発表標題 Zドリフトコンペンセーターを用いた細胞膜辺縁部の動態観察
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤俊樹
2. 発表標題 細胞膜変形タンパク質によるアクチン重合と細胞運動の制御
3. 学会等名 第122回日本解剖学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤俊樹
2. 発表標題 Role of membrane-bending proteins and tyrosine kinase in cell migration
3. 学会等名 The 1st Biosignal Research Center International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 間 露、伊藤俊樹
2. 発表標題 The Dynamic Changes in PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 are Required for the Elimination of RasG12V Transformed Cells by Cell Competition
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻田和也、伊藤俊樹
2. 発表標題 メカノバイオロジー研究の新展開 "力"による生命現象制御の理解深化に向けて
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ジェブライメン、伊藤俊樹
2. 発表標題 Myosin IIA And Pi3k Are Important For The Basal Protrusion Of Nrk52e RasV12 Cells During Cell Competition
3. 学会等名 2019 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤俊樹
2. 発表標題 細胞膜変形タンパク質による細胞運動の極性制御機構
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤俊樹
2. 発表標題 細胞競合における細胞膜張力の役割
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	辻田 和也 (TSUJITA Kazuya)		