

令和元年6月12日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19041

研究課題名(和文)細胞極性タンパクaPKCによる乳腺組織幹細胞の増殖分化制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulation of mammary stem/progenitor cells by aPKC polarity protein

研究代表者

佐々木 和教 (Sasaki, Kazunori)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50438131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス乳腺初代培養細胞のin vitro培養系を用いて幹細胞解析を行い、細胞極性タンパクaPKCが乳腺の幹細胞機能に関与することを明らかにした。さらに、その分子メカニズムとして、aPKCが幹細胞関連因子を直接リン酸化し、遺伝子発現の調節に関与することを明らかにした。これらの結果は、aPKCを構成因子とするリン酸化シグナル伝達経路が、乳腺の幹細胞において重要な役割を担うことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、乳がんの罹患率及び死亡する女性の数は増加傾向にあり、新しい早期診断法や治療法の開発が求められている。本研究では、乳がん発生の母地となる乳腺上皮組織に着目し、乳腺幹細胞を制御する新しい経路を見出した。この経路の異常が、乳がんの発生や進展とどのように関連しているかを明らかにすることで、診断マーカーや分子標的薬の開発につながることを期待される。また、細胞極性は多くの上皮組織で観察されるため、本成果は他の組織幹細胞への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to explore the molecular mechanisms regulating the stem/progenitor properties of mammary gland using in vitro culture system of mouse mammary primary epithelial cells as an experimental model. This study was designed to assess the roles of aPKC polarity protein in mammary stem/progenitor function and revealed that aPKC-mediated phosphorylation of a stem cell factor is involved in mammary stem function.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：組織幹細胞 シグナル伝達 リン酸化 細胞極性 aPKC オルガノイド 乳腺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の上皮組織は、3次元の上皮管腔を形成し、生理機能を発揮する。組織幹細胞が自己更新しつつ前駆細胞を産出し、前駆細胞は微小環境に応じて上皮細胞に分化する。それら上皮細胞群が形態形成を行い、上皮管腔組織が構築される。この過程で、上皮細胞は内腔側にアピカル膜、基質側にベーサル膜という細胞極性を確立する。多くのがんは、上皮組織を発生源とし、細胞極性の消失を特徴とする。そのため、上皮管腔における細胞極性の役割を精査することは、がん疾患を理解する切り口の1つとなる。

これまでに我々は、細胞極性タンパク質 aPKC (atypical protein kinase C) を軸に、上皮細胞の極性化機構を解析してきた。そして、細胞極性タンパク質群の正常な働きが破綻すると、細胞の極性が失われ、上皮管腔構造が異常となることを明らかにしてきた。この異常は、組織幹細胞から前駆細胞や分化細胞を産出する過程が異常となった際にも認められ、がんなどの疾患との関連性が報告されてきた。これらを踏まえ、細胞極性が組織幹細胞の自己複製や分化の過程にどのような役割を果たしているのか、細胞のがん化において細胞極性が消失する事は幹細胞機能にどのような病態的影響を与えるのかという着想に至り、本計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス乳腺上皮組織を幹細胞系のモデルとし、細胞極性タンパク質 aPKC による乳腺幹細胞の増殖・分化の統御機構を解析することを目的とする。そして、この aPKC 機能の異常が乳がんの発生・進展に対してどのように寄与するかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス乳腺初代培養細胞を用いた解析

マウス乳腺初代培養細胞を用いたマンモスフィアアッセイと3次元オルガノイドアッセイにより幹・前駆細胞の出現頻度を検証し、さらに各マーカー抗体による免疫染色も行い、幹・前駆細胞の増殖能や分化能を評価した。そして、マウス乳腺初代培養細胞においてレンチウイルス shRNA 発現系により aPKC を抑制し、その効果をこれらアッセイ系で調べた。

(2) aPKC による幹細胞関連因子のリン酸化

幹細胞関連因子のリコンビナントタンパク質を用いたキナーゼアッセイと培養細胞を用いたウエスタンブロット解析を行い、aPKC が幹細胞関連因子をリン酸化する可能性を検証した。

(3) 新規 aPKC 結合タンパク質の同定

タグ付き aPKC を発現させた細胞から、タグを用いて aPKC を精製し、質量分析による aPKC 結合タンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス乳腺初代培養細胞を用いた解析

表面抗原マーカーのラベリングとセルソーターを用いて乳腺幹細胞分画及び管腔前駆細胞分画を分取する方法、幹・前駆細胞を評価するマンモスフィアアッセイと3次元オルガノイドアッセイの培養条件、といった計画遂行に必要な培養系の諸条件を決定した。次に、タイターの高いレンチウイルス発現系の作製法、初代培養細胞への効率的な感染条件等も決定し、乳腺幹細胞又は管腔前駆細胞における遺伝子操作を可能にした。これらの実験系を用いて、乳腺幹細胞及び管腔前駆細胞での解析を進め、aPKC の機能が乳腺幹細胞と管腔前駆細胞で異なるという

結果を得た。

(2) aPKC による幹細胞関連因子のリン酸化

乳腺幹細胞における分子メカニズムに迫るため、ある幹細胞関連因子が aPKC の予想リン酸化サイトを有することに着目した。まず、候補分子を乳腺幹細胞分画でノックダウンし、3次元オルガノイドアッセイを行ったところ、aPKC のノックダウンと同様な表現型を示した。次に、aPKC が幹細胞関連因子をリン酸化するかを、リコンビナントタンパク質を用いた in vitro キナーゼアッセイと培養細胞を用いたウエスタンブロット解析にて検証し、aPKC が幹細胞関連因子を直接リン酸化することを見出した。そして、aPKC の上流に位置する低分子量 GTPase が aPKC を活性化して幹細胞関連因子のリン酸化を誘導することを見出した。さらに、このリン酸化が、幹細胞関連因子による遺伝子発現調節に関与することを見出した。

(3) 新規 aPKC 結合タンパク質の同定

aPKC シグナル伝達的一端を明らかにするため、aPKC をベイトとした結合タンパク質の探索を試みた。まず、精製用のタグを付加した aPKC 発現ベクターを細胞に導入し、タグ付き aPKC を安定的に発現する株を樹立した。次に、この安定発現株を大量培養し、細胞抽出液を調整した。そして、精製用のタグを用いてタグ付き aPKC を細胞抽出液から精製した。得られた精製分画を電気泳動し、ベイト及び共精製された結合タンパク質の存在を確認し、質量分析にて結合タンパク質の同定を試みた。その結果、新たな aPKC 結合タンパク質をいくつか見出すことに成功した。結合タンパク質と aPKC との結合は、イムノブロット法にて確認した。

以上の結果は、aPKC を構成因子とするリン酸化シグナル伝達経路が、乳腺の幹細胞において重要な役割を担うことを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tokenaga-Uchiyama A., Mizushima T., Akimoto K., Nagashima Y., **Sasaki K.**, Nakaya M., Ohashi K., Kubota K., Maruyama Y., Kato H., Hirahara F., Miyagi E., Ohno S., Asai-Sato M. Aberrant nuclear localization of aPKC / is associated with poorer prognosis in uterine cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol.* (in press) 査読有

Mizushima T., Asai-Sato M., Akimoto K., Nagashima Y., Taguri M., **Sasaki K.**, Nakaya M., Asano R., Tokenaga A., Kiyono T., Hirahara F., Ohno S., Miyagi E. Aberrant expression of the cell-polarity regulator aPKC / is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a possible marker for predicting CIN prognosis. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 35, 106-117, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

佐々木和教, 麴谷典子, 廣瀬博子, 吉濱陽平, 高柳亜由美, 山下暁朗, 中谷雅明, 平野久, 高橋秀尚, 大野茂男 新規aPKC結合タンパクp200による上皮細胞極性の調節機構 第2回東京理科大学-横浜市立大学合同シンポジウム, 2018年

佐々木和教, 麴谷典子, 廣瀬博子, 吉濱陽平, 高柳亜由美, 山下暁朗, 平野久, 大野茂男 細胞極性における新規 aPKC 結合タンパクの機能解析 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会, 2017年

佐々木和教、麴谷典子、廣瀬博子、吉濱陽平、高柳亜由美、山下暁朗、平野久、大野茂男 新規 aPKC 結合タンパク p200 による上皮細胞極性の調節機構 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<https://ycu-molecularbiology.jp/>

6 . 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。