

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02683

研究課題名(和文) 癌におけるカベオラを基軸とした生体膜ダイナミクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of ROR1-mediated caveolae function in cell membrane organization and dynamics

研究代表者

山口 知也 (YAMAGUCHI, Tomoya)

熊本大学・大学院先端機構・准教授

研究者番号：70452191

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)：リネジ生存癌遺伝子であるTTF-1によって転写活性化される受容体型チロシンキナーゼであるROR1は、「カベオラ」と呼ばれる生体膜ドメインの形成に関与することで、肺腺癌における重要な生存シグナルを担っている。そこで本研究では、生体膜でのカベオラの詳細な生成過程や生理機能、更にはカベオラに規定される生存・増殖シグナリングの区画化などの解明を目的とした。これまでの研究成果により、ROR1はCAVIN3と結合することで、カベオラ依存的なエンドサイトーシスを制御し、細胞内で生じたエンドソーム上で、生存シグナルを惹起し、癌細胞にとって重要な生存シグナルを、経時的かつ空間的に制御していることが分かってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ROR1がカベオラ形成を介した細胞膜の構造と生理機能を調節する、腫瘍生物学における新たな制御機構の解明につながる可能性があり、その一端を明らかにすることができ、学術的意義を有していると思われる。また今後の研究によっては、カベオラと呼ばれる生体膜の制御因子として重要な機能発現に関わるROR1分子の作用機序とその破綻による疾患との関連性が明らかになることで、生体膜や脂質異常に伴う多種の疾患や、がんの発生・進展等の分子機序解明とそれに基づく治療法の開発にも大きくつながり、医学領域にも大いに貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：ROR1 is a transcriptional target of the lineage-survival oncogene TTF-1 in lung adenocarcinomas. Here, we report that ROR1 possesses a novel scaffold function indispensable for efficient caveolae-dependent endocytosis. CAVIN3 was found to bind with ROR1 at a site distinct from sites for CAV1 and CAVIN1, a novel function required for caveolae-dependent endocytosis, but not caveolae formation itself. Furthermore, evidence of a mechanistic link between ROR1-CAVIN3 interaction and consequential caveolae trafficking, which was found to utilize a binding site distinct from those for ROR1 interactions with CAV1 and CAVIN1, with RTK-mediated pro-survival signaling towards AKT in early endosomes in lung adenocarcinoma cells was also obtained. The present findings warrant future study to enable development of novel therapeutic strategies for inhibiting the multifaceted scaffold functions of ROR1 in order to reduce the intolerable death toll from this devastating cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌細胞 カベオラ エンドサイトーシス ROR1 細胞膜 カベオリン 生体膜ダイナミクス メンブレントラフィック

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、研究者個人に帰属します。

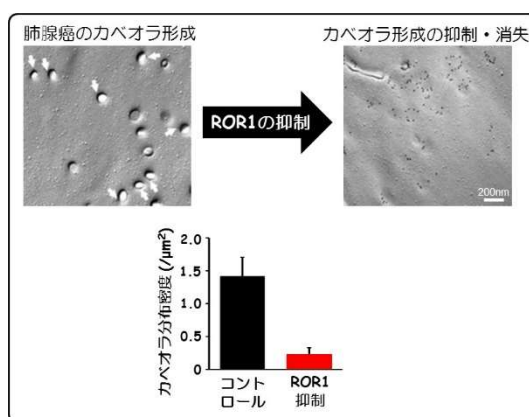
1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者らは、ROR1 がキナーゼ活性非依存的に、カベオラ構成分子である CAV1 や cavin-1 と相互作用するスキヤフォールド蛋白質として機能することで、カベオラ形成の安定化を促し、カベオラに集積する EGFR や MET、IGF-IR など様々な RTK の活性化を維持することで、肺腺癌細胞の生存シグナルを担うことを明らかにしてきた。カベオラとは、細胞膜に存在する直径約 100nm のフラスコ状の窪みであり、CAV1 を骨格とした構造物であるとともに、コレステロールやスフィンゴ脂質に富み、脂質等の取り込みやシグナル伝達、形態維持等に深く関与している。また様々なシグナル伝達に関わる受容体やチャンネル等の集積する場でもあり、効率的にシグナルを伝えるためのプラットフォームとしての機能が知られている。しかしながら、カベオラ構造自体は様々な手法で観察されているにもかかわらず、細胞内におけるカベオラの詳細な生成・崩壊過程のメカニズムや、実際の生理機能についても、正常と癌との相違や癌組織における相反する機能を有することなど、未だ不明な点が非常に多い。

2. 研究の目的

これまでに私たちは、リネジ生存癌遺伝子である TTF-1 によって転写活性化される ROR1 が EGFR からの肺腺癌の生存シグナルの維持に必要な受容体型チロシンキナーゼ(RTK)であることを見出し⁽¹⁾⁽²⁾、また近年、ROR1 がカベオラ形成を安定化させ、カベオラに集積する様々な RTK の活性化の維持に寄与することで、肺腺癌にとっての重要な生存シグナルを担うことを明らかにした⁽³⁾。肺腺癌細胞での ROR1 の抑制によりカベオラ構造が有意に消失することから(右図)、ROR1 がカベオラ形成を介した普遍的な細胞膜の構造と生理機能を調節する新規制御分子であると考えられる。

そこで本研究では、カベオラ制御分子として見出した ROR1 を基軸とした新しい脂質二重膜のダイナミクス制御の全貌を解き明かすことを目的とし、これまで多くの謎に包まれてきた細胞膜でのカベオラの生理機能の解明を行った。



3. 研究の方法

1) 免疫沈降法による ROR1 新規結合タンパク質としての CAVIN3 の同定

これまでの研究から ROR1 は、カベオラ形成分子である CAV1 や CAVIN1 と相互作用し、カベオラ形成に関与することが分かっていたが、他の CAVIN ファミリーと結合するかどうかについて、肺腺癌細胞株 NCI-H1975 を用いて免疫沈降法を行った。実験には 60mM のオクチルグルコシドバッファーを用いて、内因性のタンパク質同士の結合を評価した。

2) 免疫細胞染色法による ROR1 と CAVIN3 の細胞内局在観察

次に肺腺癌細胞株 NCI-H1975 を用いて、細胞内での ROR1 と CAVIN3 の局在について観察を行った。ROR1 および CAVIN3 の各々の抗体を使用し免疫細胞染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

3) アクチンフィラメントにおける ROR1 と CAVIN3 の共局在の観察

CAVIN3 はアクチンフィラメントにも存在していることが報告されているが、同様に免疫細胞染色法によって ROR1 と CAVIN3 の共局在(構造物)がアクチンフィラメントに存在しているかどうか検討を行った。ROR1 および CAVIN3 の各々の抗体、さらにファロイジンを用いて免疫細胞染色を行い、超高解像度共焦点レーザー顕微鏡 (LSM880) を用いて各々の細胞内局在の詳細な観察を行った。

4) ROR1 の CAVIN3 結合部位の同定

ROR1 受容体は、細胞外領域に、Ig ドメイン、システインリッチドメイン、Kringle ドメインを有しており、細胞内領域には、キナーゼドメインと2つのセリン・スレオニンリッチドメインとプロリンリッチドメインを有している。CAVIN3 が ROR1 のどの領域と相互作用しているかを調べるために、ROR1 のそれぞれのドメインを欠損させた欠損変異体を作製し、COS-7 細胞に発現させることで CAVIN3 との結合について免疫沈降法により評価を行った。

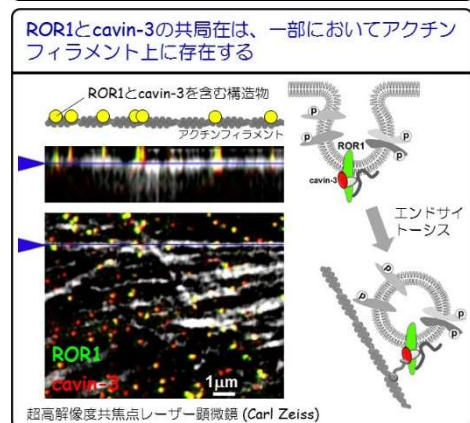
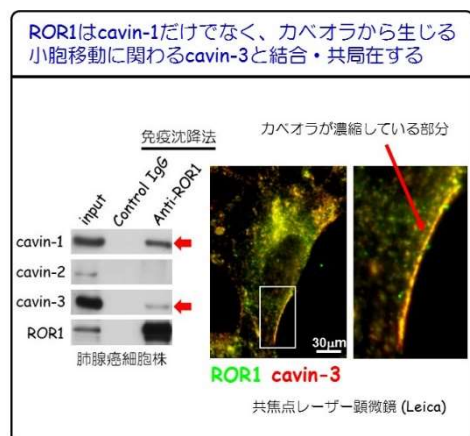
5) Internalization assay によるカベオラ依存的なエンドサイトーシスの評価

次に、ROR1 の CAVIN3 結合部位がカベオラ依存的なエンドサイトーシスに影響を与えるかどうかについて、蛍光標識させたコレラトキシンのサブユニット B (CTB-488) を用いて細胞内への取り込みを顕微鏡によって観察した。使用した細胞は ROR1 の野生型、あるいは CAVIN3 が結合できない ROR1 欠損変異体を肺腺癌細胞株 PC-9 に発現させ、siROR1 で処理を行った細胞を用いた (それぞれの ROR1 発現プラスミドには siROR1 に対する silent mutation を加えており、内因性の ROR1 は抑制させた)。4°C に置いた細胞株に対して CTB-488 を添加し、37°C に移すことで細胞内への取り込みを開始した。その後、15 分後に各々の細胞株を固定し、反応を停止させた。細胞内への取り込みについては、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

1) 肺腺癌細胞における ROR1 と CAVIN3 の相互作用

肺腺癌細胞において ROR1 は CAVIN1 と結合することから、他の CAVIN ファミリーと相互作用するかどうかについて免疫沈降法を用いて検討を行った結果、ROR1 はカベオラ形成に関わる CAVIN1 以外に CAVIN3 とも結合し、CAVIN2 とは結合しないという、非常に特異性を持った相互作用を示すことが分かった。また、肺腺癌細胞を用いた免疫細胞染色の結果から、内因性の ROR1 と CAVIN3 は一部において細胞膜、および細胞質で共局在を示すことが分かり、細胞膜でのカベオラが集積している領域においても ROR1 と CAVIN3 は共局在していることが分かった (右図)。次に、CAVIN3 は細胞内において MYO1C と相互作用することでアクチンフィラメントに存在していることが分かっている。そこで、肺腺癌細胞において、実際に ROR1 と CAVIN3 の共局在 (構造物) がアクチンフィラメントに存在しているかどうかについて検討を行った。超高解像度共焦点レーザー顕微鏡 (LSM880) を用いて詳細な観察を行ったところ、一部において ROR1-CAVIN3 複合体がアクチンフィラメントに存在していることが判明した (右図)。これらの結果から、肺腺癌細胞の細胞膜において ROR1 は CAVIN3 と相互作用するとともに、細胞内におけるアクチンフィラメントにおいても ROR1 と CAVIN3 は相互作用していることが分かり、細胞膜のカベオラからのエンドサイトーシス、およびカベオラから生じた小胞の輸送・移動に関与している可能性が考えられた。



2) ROR1 の CAVIN3 結合部位の同定とカベオラ依存的なエンドサイトーシスへの影響

肺腺癌細胞において ROR1 と CAVIN3 が結合することから、CAVIN3 が結合する ROR1 の結合領域の同定を行った。様々な ROR1 の機能的なドメインを欠損させた ROR1 変異体を作製し、これらの変異体と CAVIN3 を発現させることで COS-7 細胞で免疫沈降法を行った結果、CAVIN3 は ROR1 のキナーゼドメイン内の N 末から 1/3 の領域と相互作用することが分かり、これまで分かっていた CAVIN1 や CAV1 が結合する領域とは別の部位で CAVIN3 は ROR1 と結合していることが判明した (CAVIN1 は ROR1 のキナーゼドメイン内の C 末から 2/3 の領域と結合する。また、CAV1 は ROR1 の C 末側のセリン・スレオニンリッチドメインと結合することが、これまでの私たち

の研究から分かっている。) (右図)。

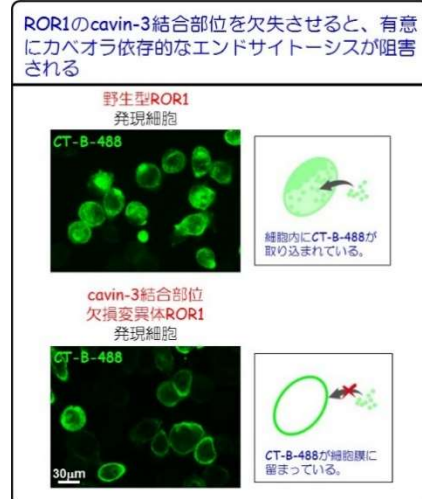
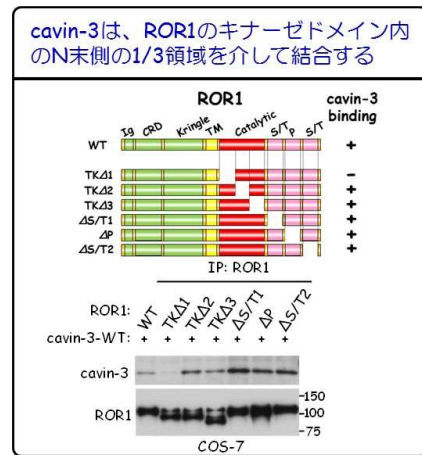
そこで私たちは、ROR1 の CAVIN3 が結合する領域を欠損させた ROR1 欠損変異体を作製し、肺腺癌細胞に発現させることでこの結合領域が与えるカベオラ依存的なエンドサイトーシスへの影響について検討を行った。内因性の ROR1 の発現の影響を抑えるために、発現させる野生型の ROR1、および CAVIN3 が結合できない欠損変異体の ROR1 には silent mutation (siROR1 に対する抵抗性) を加えたコンストラクトを作製し、細胞に発現させた後、siROR1 処理を行い、内因性の ROR1 の発現を抑制させた。カベオラ依存的なエンドサイトーシスの指標にはコレラトキシンのサブユニット B に蛍光標識させたもの (CTB-488) を用い、細胞内への取り込みについて評価を行った。その結果、野生型の ROR1 を発現させた細胞では細胞内に CTB-488 の取り込みが観察されるのに対して、CAVIN3 が結合できない ROR1 欠損変異体を発現させた細胞では、CTB-488 が細胞膜に留まり、細胞内への取り込みが阻害される傾向にあることが判明した (右図)。

<引用文献>

(1) Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H and Takahashi T: NKX2-1/TTF1/TTF-1-induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. **Cancer Cell**, 21, 348-361 (2012).

(2) Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K and Takahashi T: NKX2-1/TTF-1: An enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. **Cancer Cell**, 23, 718-723 (2013).

(3) Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T and Takahashi T: ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. **Nat Commun**, 7, 10060 (2016).



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi T, Hayashi M, Ida L, Yamamoto M, Lu C, Kajino T, Cheng J, Nakatochi M, Isomura H, Yamazaki M, Suzuki M, Fujimoto T and Takahashi T	4. 巻 38
2. 論文標題 ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5142-5157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0785-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yamaguchi T, Hayashi M, Ida L, Yamamoto M, Lu C, Kajino T, Cheng J, Nakatochi M, Isomura H, Yamazaki M, Suzuki M, Fujimoto T and Takahashi T
2. 発表標題 ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaguchi T and Takahashi T
2. 発表標題 ROR1 sustains caveolae function and pro-survival signaling in lung cancer
3. 学会等名 EMBO Workshop, Caveolae and nanodomains: Translating structural principles and dynamics into function（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口知也、林美優、井田梨沙、Can Lu、梶野泰祐、Jinglei Cheng、磯村久徳、鈴木元、藤本豊土、高橋隆
2. 発表標題 肺腺がんでのROR1によるカベオラ依存のエンドサイトーシスを介した生存シグナル制御機構
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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 分 担 者	細野 祥之 (HOSONO Yasuyuki) (60820363)	愛知県がんセンター(研究所)・がん標的治療TR分野・ユ ニット長 (83901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------