

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20013004

研究課題名（和文） 癌細胞の運動・接着と浸潤・転移におけるアクチン骨格制御系の機能

研究課題名（英文） Roles of actin cytoskeletal regulation system in tumor cell migration and invasion

研究代表者

水野 健作 (MIZUNO KENSAKU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70128396

研究成果の概要（和文）：

癌細胞の運動・接着や浸潤・転移においてアクチン骨格の制御系が果たす機能を解析し、コフィリンとその制御因子 LIM キナーゼ、Slingshot が、癌細胞の浸潤仮足の形成、間葉系細胞遊走からアメーバ様細胞遊走への運動様式の変換において重要な機能を持つことを解明した。また、Slingshot の活性制御因子として PKD1 を同定した。また、LIM キナーゼ阻害剤を開発し、癌細胞の浸潤阻害活性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the roles of actin cytoskeletal regulation in tumor cell migration and invasion and obtained the results, as follows: Cofilin and its regulatory enzymes, LIM-kinase and Slingshot, play critical roles in the invadopodium formation. LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition of tumor cells in 3D matrices. Protein kinase D1 regulates actin reorganization through Slingshot inactivation. We also developed inhibitors for LIM-kinase and found that these inhibitors suppressed tumor cell invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	0	8,000,000
2009 年度	8,000,000	0	8,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：癌、シグナル伝達、コフィリン、細胞運動、浸潤・転移、アクチン骨格、浸潤突起、LIM キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移の阻害は癌治療の最も重要な標的の一つであり、有効な治療法の開発のためには癌細胞の浸潤・転移能獲得の分子機構を解明することが必須である。癌細胞の浸潤過程において、癌細胞は invadopodia (浸潤仮足) とよばれる F アクチンに富む膜突起構造を形成し、周辺の細胞外マトリックスを溶解しながら仮足を伸長させる。また、生体内や3次元培養下の癌細胞では、浸潤突起を形成しメタロプロテアーゼ依存的に細胞外マトリックス中を移動する間葉系細胞遊走とよばれる運動様式から、球状で Rho 依存的に膜の泡状化(blebbing) が起こりプロテアーゼ非依存的なアメーバ様細胞遊走への変換(mesenchymal-amoeboid transition: MAT) が認められるが、各々の遊走機構は異なっており、遊走機構及び変換機構を解明することは生体内での癌細胞の浸潤機構を理解し、癌浸潤を阻害する上で非常に重要であると考えられる。アクチン骨格の再構築は、細胞運動、接着の制御における中心的な役割を担っており、癌細胞の浸潤・転移におけるこれらの細胞特性の変化(浸潤突起形成、MAT など)においても重要な役割を担っていると考えられる。

アクチン脱重合因子コフィリンはアクチン再構築を制御する主要因子であり、癌細胞の運動性、接着性や浸潤・転移における役割が強く示唆されている。私達は、コフィリンを不活性化するキナーゼとして LIM キナーゼを、また活性化するホスファターゼとして Slingshot を同定し、これらの活性を制御するシグナル伝達機構ならびに細胞運動における重要な役割を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

癌の悪性化に伴い、癌細胞は運動能を亢進し、接着性を変化させ、浸潤・転移能を獲得する。本研究では、アクチン骨格再構築の主要な制御系であるコフィリン制御系を中心に、癌細胞の運動・接着性の変化と浸潤・転移能の亢進におけるアクチン骨格制御系の

役割を解明することを目的とした。本研究では特に、(1)癌細胞の浸潤能と相関性の高い浸潤突起形成におけるコフィリン制御系の機能の解明、(2)3次元培養下における間葉系細胞遊走からアメーバ様遊走への転換(MAT)におけるコフィリン制御系の機能の解明を目的とした。また、(3)LIM キナーゼに対する特異的な阻害剤をスクリーニングし、癌細胞の運動性と浸潤に対する抑制効果を検討し、癌転移の阻害剤開発の基礎研究を実施する。さらに、(4)LIM キナーゼと Slingshot の新たな活性制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)浸潤突起形成におけるコフィリン制御系の機能:

MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞を FITC を結合したゼラチン状で培養し、FITC の蛍光消失とアクチン繊維の蓄積を共焦点顕微鏡により3次元的に観察し、浸潤突起形成をタイムラプス測定した。コフィリン/ADF、LIM キナーゼ、Slingshot の発現を shRNA により抑制したときの影響を測定した。

(2)3次元培養下における癌細胞のMATにおけるコフィリン制御系の機能:

HT1080 fibrosarcoma 細胞をコラーゲンゲル中で3次元培養し、プロテアーゼ阻害剤の有無、LIM キナーゼやコフィリンの過剰発現、発現抑制条件下における細胞形態と浸潤能を測定した。また、Rho や ROCK の活性型の発現による MAT が LIM キナーゼの発現抑制によって阻害されるかを検討した。

(3)LIMキナーゼ特異的阻害剤の開発と癌細胞浸潤に対する抑制効果の検討:

コフィリンとアクチンを YFP の N 末端、C 末端断片と連結したキメラ蛋白質を作製し、これらがコフィリンの非リン酸化型依存的に蛍光発色するシステムを構築した。次に、これらをプローブとして、LIM キナーゼ存在下では発色しないが、同時に LIM キナーゼ阻

害剤が共存すると発色する阻害剤スクリーニング系を構築し、約 1000 種の化合物を測定した。得られた阻害剤の阻害定数を計測し、癌細胞の運動性や浸潤に対する効果を測定した。

(4) LIM キナーゼと Slingshot の新たな活性制御機構：

カルシウムシグナルの下流でアクチン骨格の再編成が起こり、細胞運動や細胞形態の変化が生じることが知られている。カルシウムイオノフォアによる LIM キナーゼの活性化に注目し、阻害剤を用いた解析により LIM キナーゼ上流因子を解析した。また、Slingshot は Ser-978 のリン酸化依存的に 14-3-3 蛋白質と結合し、それによってアクチン繊維による活性化が阻害されることを以前に見出しているが、そのリン酸化酵素を同定するため、リン酸化部位特異的抗体を用いて発現クローニングを行った。

(5) NDR1 による染色体整列の制御機構：

NDR1 は酵母からヒトまで保存されたプロテインキナーゼで、ハエでは Slingshot 変異体と類似した表現型を示すことから、アクチン骨格の制御に関与すると考え、研究を開始した。HeLa 細胞において、NDR1 とその活性制御因子である MST2, Furry の発現を shRNA により抑制し、表現型の解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、コフィリン制御系が癌細胞の運動能の制御、浸潤・転移能の獲得において果たす役割を解明することを目的として研究を行い、以下の研究成果を得た。

(1) 浸潤突起形成におけるコフィリン制御系の機能：

癌細胞の浸潤過程において、癌細胞は浸潤仮足を形成するが、コフィリン/ADF、Slingshot-1/2、LIM キナーゼ 1 の発現を shRNA により抑制すると、MDA-MB-231 乳癌細胞の浸潤仮足の形成、膜型マトリックスメタロプロテアーゼ MT1-MMP の集積、および浸潤活性が抑制されることを見出した。

(2) 3次元培養下における癌細胞の MAT にお

けるコフィリン制御系の機能：

HT1080 fibrosarcoma 細胞は 3 次元培養下では、プロテアーゼ阻害剤によって間葉系細胞遊走からアメーバ様細胞遊走への運動様式の変換 (MAT) をすることが知られているが、MAT において LIM キナーゼが活性化されること、その活性化は Rho-ROCK 経路の下流で生じることを見出した。また、LIM キナーゼの shRNA による発現抑制によって MAT が阻害されることを見出した。

(3) LIM キナーゼ特異的阻害剤の開発と癌細胞浸潤に対する抑制効果の検討：

BiFC 法によりコフィリンのリン酸化依存的に蛍光発色が阻害される YFP 断片とコフィリン及びアクチンのキメラ蛋白質の組合わせを開発した。これをプローブとして、LIM キナーゼに対する低分子阻害剤をスクリーニングし、阻害活性を示す 2 種の化合物を見出した。さらに、これらの化合物が LIM キナーゼの阻害を介して、癌細胞の運動と浸潤を阻害することを見出した。

(4) LIM キナーゼと Slingshot の新たな活性制御機構：

LIM キナーゼの新たな活性化機構として、カルシウムシグナルの下流で、CaMK-IV によって LIM キナーゼがリン酸化、活性化されることを見出した。また、Slingshot の活性を制御するキナーゼとして PKD1 を同定した。PKD1 は RhoA の下流で活性化され、Slingshot の C 末端領域をリン酸化することで 14-3-3 に対する結合力を増加させ、アクチン繊維による Slingshot の活性化を阻害することを見出した。この結果、PKD1 はコフィリンのリン酸化を促進し、癌細胞の運動能を抑制することを明らかにした。

(5) NDR1 による染色体整列の制御機構：

当初アクチン骨格制御因子として研究を開始した NDR1 キナーゼの細胞機能を解析する過程で、NDR1 の発現抑制によって細胞分裂期中期の紡錘体形成と染色体整列の異常が観察された。NDR1 の活性制御因子である Furry や上流キナーゼである MST2 によっても同様な現象が観察され、これらのシグナル経

路が細胞分裂時の染色体整列において重要な機能を持つことが明らかになった。

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 8 件)

(ここに記入した発表論文は全て査読有り)

- ① Mishima, T., Naotsuka, M., Horita, Y., Sato, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392, 577-581 (2010).
- ② Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I. K., Kitatani, K., Mizuno, K., and Storz, P. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through Slingshot. *Nat. Cell Biol.*, 11 (5), 545-556 (2009).
- ③ Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Curr. Biol.*, 19 (8), 675-681 (2009).
- ④ Takemura, M., Mishima, T., Wang, Y., Kasahara, J., Fukunaga, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM-kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 284, 28554-28562 (2009).
- ⑤ Toshima, J. Y., Nakanishi, J., Mizuno, K., Toshima, J., and Drubin, D. G. Requirements for recruitment of a G protein-coupled receptor to clathrin-coated pits in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*, 20(24), 5039-50. (2009).
- ⑥ Kurita, S., Watanabe, Y., Gunji, E., Ohashi, K., and Mizuno, K. Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated

activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *J. Biol. Chem.*, 283, 32542-32552 (2008).

⑦ Kato, A., Kurita, S., Hayashi, A., Kaji, N., Ohashi, K., and Mizuno, K. Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. *Biochem. J.*, 414, 261-270 (2008).

⑧ Kim, Y. B., Choi, S., Choi, M. C., Oh, M. A., Lee, S. A., Cho, M., Mizuno, K., Kim, S. H., and Lee, J. W. Cell adhesion-dependent cofilin serine 3 phosphorylation by the integrin-linked kinase/c-Src complex. *J. Biol. Chem.*, 283, 10089-10096 (2008).

[学会発表] (計 26 件)

1. 池田 真教, 千葉 秀平, 大橋 一正, 水野 健作: Mitotic activation of NDR1 kinase and its role in chromosome alignment. 第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、横浜
2. 佐上 彩, 太田 裕作, 栗田 宗一, 大橋 一正, 水野 健作: Identification of filamin A as the Slingshot-binding protein. 第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、横浜
3. 三嶋 利明, 直塚 萌, 堀田 祐司, 大橋 一正, 水野 健作: A critical role of LIM-kinase in Mesenchymal-amoeboid transition of cancer cell migration. 第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、横浜
4. 東海林 和康, 大橋 一正, 三瓶 かおり, 木内 泰, 水野 健作: High-throughput screening for low-molecular weight inhibitors of protein-protein interactions using BiFC probes. 第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、横浜
5. S. Chiba, M. Ikeda, K. Ohashi, K. Mizuno: MST-2 and Furry-mediated Activation of NDR1 Kinase Is Critical for Precise Alignment of Mitotic Chromosomes. 第49回米国細胞生物学会会議、2009. 12. 4-11、サンディエゴ (米国)
6. 辻拓史, 太田裕作, 菅野祐哉, 大橋一正, 水野健作: Identification of Rho-GEFs that mediate RhoA activation and neurite

- retraction in the Wnt-PCP pathway. 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸
7. 永井友朗, 木内泰, 大橋一正, 水野健作: Development of FDAP time-lapse imaging for spatiotemporal measurement of cytoplasmic G-actin concentration and important roles of cofilin and G-actin in lamellipodium formation. 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸
8. 水野健作, 千葉秀平, 池田真教, 大橋一正: Regulation mechanism of NDR1 kinase and its role in mitotic chromosome alignment. 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸
9. 大橋一正, 水野健作: Cofilin phosphatase Slingshot: regulation mechanism and role in polarized cell migration and cytokinesis. 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸
10. Kazumasa Ohashi, Naoto Uchiumi, Kaori Sanpei, Mami Nakagawa and Kensaku Mizuno : Effects of novel LIM-kinase-specific inhibitors on migration and invasion of tumor cells. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009.10.1-3、横浜
11. 千葉秀平, 池田真教, 勝沼功吉, 大橋一正, 水野健作: MST2 と Furry による NDR1 の活性化は分裂期染色体の赤道面への整列に必要である 第 61 回日本細胞生物学会大会ワークショップ、2009.6.2-4、名古屋
12. 北谷佳那恵, 堀田祐司, 大橋一正, 水野健作: invadopodia 形成におけるコフィリンリン酸化制御の機能 日本生化学会東北支部例会、2009.5.9、仙台
13. 永井友朗, 木内泰, 大橋一正, 水野健作: Dronpa を用いた細胞内 G-アクチン濃度の経時測定によるコフィリンの機能解析 日本生化学会東北支部例会、2009.5.9、仙台
14. 水野健作 : 細胞骨格制御とがん細胞の運動、分裂 がん研究特定領域 5 領域合同シンポジウム、2009.2.2-2.3、東京
15. Otsuki, M., Ikebe, C., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Phosphorylation of Slingshot-1 by Polo-like kinase-1. The 48th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, 2008.12.13-12.17 San Francisco, 16. 永井友朗, 木内泰, 大橋一正, 水野健作 : ラメリポディア形成過程における細胞内 G-アクチン濃度のタイムラプスイメージングーDronpa-アクチンの FDAP 解析を用いてー BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会、2008.12.9-12.12、神戸
17. 林文, 黒沢豪, 梶紀子, 大橋一正, 鎌倉幸子, 住本英樹, 水野健作 : 哺乳類細胞の対称分裂における紡錘体位置決定タンパク質の局在とアクチン骨格の関与 BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会、2008.12.9-12.12、神戸
18. 池田真教, 千葉秀平, 勝沼功吉, 大橋一正, 水野健作 : MST2, MST3 による NDR1 の活性制御と細胞分裂の制御 BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会、2008.12.9-12.12、神戸
19. Mizuno, K. : Molecular mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1 and its roles in cell migration and invasion. International Phosphatase Conference, 2008.11.12-14, Maebashi
20. Kensaku Mizuno, Tai Kiuchi, Souichi Kurita, and Kazumasa Ohashi : Role of cofilin in actin filament assembly and disassembly during lamellipodium formation and extension. 2nd International Symposium on Bio-nanosystems, 2008.10.31-11.2, Tokyo
21. Ohashi, K., Horita, Y., and Mizuno, K. : Cofilin phospho-regulation plays a critical role in tumor cell motility and invasion. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008.10.28-30、名古屋
22. 栗田宗一, 堀田祐司, 大橋一正, 水野健作 : Phospho-regulation of cofilin in cell migration and tumor cell invasion がん若手ワークショップ、2008.9.3-9.6、蓼科
23. Tsuji, T., Ohta, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Identification of Rho-GEFs

that mediate Dishevelled-induced RhoA activation. 第 60 回日本細胞生物学会大会、2008. 6. 29-7. 1、横浜

24. Kitatani, K., Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Involvement of cofilin/ADF, Slingshot and LIM-kinase in invadopodium formation of tumor cells. 第 60 回日本細胞生物学会大会、2008. 6. 29-7. 1、横浜

25. Otsuki, M., Kaneto, K., Ikebe, C., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Phosphorylation of Slingshot-1 by Polo-like kinase-1. 第 60 回日本細胞生物学会大会、2008. 6. 29-7. 1、横浜

26. Ohashi, K., Horita, Y., Kiuchi, T., and Mizuno, K. : Roles of cofilin phospho-regulation in tumor cell migration and invasion. 第 60 回日本細胞生物学会大会、2008. 6. 29-7. 1、横浜

〔図書〕 (計 2 件)

1. 栗田宗一、水野健作 : 細胞骨格、細胞運動、細胞接着を制御するシグナル伝達機構、生体の科学、59 (5), 420-421 (2008) 医学書院

2. 木内泰、水野健作 : Dronpa を用いたアクチン動態のライブイメージング、実験医学増刊「生命現象の動的理解を目指すライブイメージング」、実験医学、26 (17), 2748-2754 (2008) 羊土社

〔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.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/ohashi1234/Top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 健作 (MIZUNO KENSAKU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号 : 70128396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし