

機関番号：32203

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590314

研究課題名 (和文) 細胞内小胞輸送系分子タキシリンの腫瘍形成における発現と機能に関する解析

研究課題名 (英文) Analyses of a vesicular transport protein taxilin in tumorigenesis

研究代表者

伊藤 雅彦 (ITO MASAHIKO)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70270486

研究成果の概要 (和文) : 細胞内で物質の輸送に関わると予想されるタンパク質タキシリンは大腸および直腸内の神経内分泌細胞、膵臓ランゲルハンス島の内分泌細胞、唾液腺の漿液性細胞、胃の主細胞等、分泌性の細胞に強く発現する一方で、神経膠芽腫、骨肉腫やメラノーマなど間葉系細胞由来の腫瘍全般、また、大腸・前立腺・乳腺などの上皮細胞由来腫瘍において発現の亢進が認められた。タキシリンを高発現する転移性のヒト乳癌細胞株においてその発現を抑制すると、増殖速度および浸潤能の低下、抗癌剤への感受性上昇が生じたことから、特定のタイプの癌における機能的な関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : A putative vesicular transport protein, taxilin, is expressed in secreting cells such as neuroendocrine cells in the normal colon and rectum. On the other hand, its expression appeared to be elevated in the colon cancer, prostate cancer, and breast cancer as well as in glioblastoma, osteosarcoma, and melanoma cells. The suppression of taxilin in the metastatic breast cancer cell line induced the reduction of cell growth and invasiveness and upregulated the susceptibility to anti-cancer drug, suggesting its functional implication in the specific type of cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌、転移、浸潤、細胞増殖、小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物体の正常な形成と維持には、細胞の増殖・分化のみならず接着・運動・輸送・極性など、細胞内および細胞間の様々なプロセス個々の正確な制御と相互間の協調が必須である。

これらプロセスの破綻が細胞の癌化に結びつくものと考えられるが、癌の大多数を占める上皮癌においては上皮細胞が構成する秩序だった組織構築の変化が癌の発症および悪性化と密接に関連すると予想される。

細胞接着・極性の制御が組織構築の形成と維持に関わる多くのプロセスの中でも重要な要素であることがこれまで多くの報告によって示されている。その一方で、細胞内小胞輸送系が組織構築の形成と腫瘍形成における構造変化に結びつくことを示唆する報告は数少なく(Lu and Bilder, *Nature Cell Biol.* 7(12): 1232-1239, 2005)、機能的な関与の有無や詳細な分子機構については不明な点が多く残された状態にあった。

2. 研究の目的

上皮細胞の Basolateral 膜への小胞輸送に働く SNARE 系の構成分子 Syntaxin-4 に対する結合タンパク質として同定されたタキシリンは複数の上皮癌組織において発現増加が認められる。

一方で、タキシリンはアクチンおよび微小管細胞骨格系の構築や細胞極性・細胞運動などに関わる可能性も示唆され、これらの細胞内プロセスの調節を通してタキシリン依存性の小胞輸送系が腫瘍形成に関与することも想定される。

そこで本研究では、腫瘍形成と組織構築変化に対する細胞骨格および小胞輸送系の関わりについて、主にタキシリンの機能と作用機序の解析を中心として解明を進めることを目的とする。また、細胞骨格と細胞接着を繋ぐ分子基盤に関する解析を併せて行い、上皮構築制御の分子メカニズムに関する理解を深めていく。

3. 研究の方法

(1) 正常および腫瘍組織におけるタキシリンの発現と局在：種々のヒト正常および腫瘍組織における発現・局在について解析し、タキシリンの過剰発現が特定の上皮癌で特異的に起きている現象なのか、上皮系全般もしくは上皮系以外の癌細胞においても起きている現象なのかを明らかにする。乳癌については病理的に様々なタイプの腫瘍組織につ

いて解析し、乳癌については前癌病変として認められる異型乳管過形成、非浸潤性乳管癌 ductal carcinoma in situ(DCIS)、浸潤性乳管癌 infiltrating ductal carcinoma、さらに DCIS の中でも Solid DCIS、Comedo DCIS など様々なサンプルについて系統的な解析を行い、癌の Grade・タイプに応じた違いなどについて明らかにする

(2) ヒト正常乳腺細胞・腫瘍細胞における発現と局在：ヒト乳癌由来の細胞株は数十種類以上が樹立され、悪性化の程度や癌遺伝子・癌抑制遺伝子ならびにホルモンレセプターの発現状態など、癌細胞としての特徴が分子レベルに到るまで詳しく解析されている。これらの細胞の中から、由来する病変状態が異なる癌細胞と正常細胞についてタキシリンの発現ならびに局在にどのような変化があるのか明らかにする。

(3) タキシリン過剰発現細胞・ノックダウン細胞の解析：発現変化が機能的な意味を持つのかどうか検討するため、乳癌細胞に RNAi を導入してタキシリンの発現抑制を行ったトランスフェクタント、および正常乳腺細胞に過剰発現させたトランスフェクタントを樹立し、増殖能・浸潤能などに及ぼす影響について明らかにする。

(4) 細胞骨格の調節を介して上皮組織構築制御に携わる分子基盤の解析：細胞骨格は細胞接着・極性・小胞輸送などに深く関わり、上皮組織構築において重要な役割を果たしているが、その調節分子機構の全容は未だ不明である。そこで、この点に関する新たな知見を得ることを目的として、細胞骨格の調節に働く新規分子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 正常および腫瘍組織におけるタキシリンの発現と局在：

① ヒト正常組織についてタキシリン発現部位の解析を詳細に行った。その結果、タキシリン分子の発現は特定の細胞群において強く認められることが明らかとなった。

最も高発現を示したのは大腸および直腸内の神経内分泌細胞であり、膵臓ランゲルハンス島の内分泌細胞も強陽性であった。また、唾液腺の漿液性細胞・胃の主細胞など、いずれも分泌性細胞がタキシリン陽性であり、生体内においてタキシリンが特定の分泌プロ

セスに關与することが強く示唆される結果となった。

②次いで Tissue-Array を利用して種々のヒト腫瘍組織について解析したところ、神経膠芽腫においてタキシリンの強い過剰発現が認められた。その他、骨肉腫やメラノーマなど間葉系細胞由来の腫瘍全般においてタキシリンは強く発現していた。また、大腸・前立腺・乳腺などの上皮細胞由来腫瘍においても発現亢進が認められた。さらに、タキシリン過剰発現が癌の進行や転移と関係しないか 50 例の乳癌サンプルを用いて解析を行った。その結果、悪性度の高い浸潤性乳管癌ばかりでなく非浸潤性乳管癌においても過剰発現が認められた。

以上①、②の結果から、タキシリン発現の亢進は様々なタイプの癌において起こり、また癌の早期においても変化が開始される可能性が高いものと考えられた。こうした発現亢進が、分泌過程を含めどのような細胞内プロセスを介して癌細胞にどのような影響を及ぼしているか、今後の検討課題の一つである。

(2) ヒト正常乳腺細胞・腫瘍細胞における発現と局在:

3 種類の正常乳腺細胞 (MCF-10A, MCF-12A, S1)、4 種類の非転移性乳癌細胞 (MCF7, T47D, T4-2, ZR-75)、4 種類の転移性乳癌細胞 (MDA-MB-231, BT-549, SK-BR-3, Hs280) を用いてタキシリンの発現と細胞内局在を解析した。その結果、正常乳腺細胞に比較して乳癌細胞において有意な発現上昇を認めたが、特に転移性乳癌細胞株におけるタキシリン発現の亢進が顕著であった。また、蛍光抗体法により細胞内局在を検討したところ、ほとんどが細胞質に存在したが一部は微小管形成に關与する中心体に存在し、その傾向は転移性乳癌細胞においてより明瞭であった。

(3) タキシリン過剰発現細胞・ノックダウン細胞の解析:

①上記の知見を基に、まず転移性乳癌細胞株 BT-549 においてタキシリンの発現抑制を試みた。タキシリン特異的な shRNA ベクターを構築して BT-549 細胞へ導入し、安定的にタキシリンの発現が抑制されている細胞 (タキシリン KD/BT-549) を樹立することに成功した。

細胞増殖について検討したところ、タキシリン KD/BT-549 細胞では元の BT-549 細胞に比較して明らかに増殖速度の低下が認められた。また増殖亢進と共に癌細胞の特徴である細胞死に対する抵抗性を調べるため、アポ

トーシスを誘導する抗癌剤の一つカンプトテシンでこれらの細胞を処理したところ、タキシリン KD/BT-549 では感受性の増進すなわち細胞死を起こしやすくなっていることが判明した。

BT-549 細胞は転移性乳癌から樹立された細胞株であり、高い細胞運動能を保持している。そこで Boyden chamber を用いて BT-549 細胞とタキシリン KD/BT-549 細胞を解析したところ、転移性癌細胞の特徴である浸潤能が抑制されることを見出した。

②一方、非転移性の乳癌細胞 MCF-7 についてもタキシリンの発現を抑制した細胞株を作製し (タキシリン KD/MCF-7) 同様の解析を行った。その結果、タキシリン KD/MCF-7 はコントロール MCF-7 細胞と比較して運動能、細胞増殖能、細胞死への感受性に有意な変化を示さなかった。

③最後に、タキシリンの発現亢進が乳腺細胞の腫瘍化を引き起こす主要因となりうるか否か明らかにするため、タキシリンを過剰発現したヒト正常乳腺細胞 MCF-12A を作製した。しかしながら、運動能、細胞増殖能、細胞死への感受性に変化は生じなかった。

これらの結果は、タキシリンの発現上昇そのものが正常細胞から癌細胞への形質転換に機能的に働きうるものではないこと、さらには、癌のタイプによってタキシリンの表現系への關与の有無が異なることを示唆している。

今後、より詳細な分子レベルの解析を行うことによって、癌細胞においてタキシリンが關わる経路を明らかにすることが可能になれば、特定のタイプの癌の診断およびタイプに適合した治療戦略に対して貢献しうる可能性があるのではないかと考える。

(4) 細胞骨格の調節を介して上皮組織構築制御に携わる分子基盤の解析:

細胞骨格の調節に small G タンパク質 Rho family が關与することがこれまでの多くの研究によって示されている。しかしながら、上皮組織を構築する上皮細胞内において、その活性が時空的にどのような制御を受けているのか不明な点が数多く存在している。

この点に関する新たな知見を得るために、上皮組織構築制御において重要な細胞間接着構造に局在する分子 ZO-1 と相互作用する Rho family およびその調節分子について解析を行った。その結果、およそ 60 種類存在する Rho GTP exchange factor の中の一つ ARHGEF11 が ZO-1 と直接結合することが明らかになった。ARHGEF11 は ZO-1 依存性に細胞間の接着部位に局在し、その場における RhoA

ならびに下流のミオシン軽鎖の活性化を誘導することで上皮構造の形成と維持に関わることが示唆された。

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 3 件)

- ① Itoh M, Tsukita S, Yamazaki Y, Sugimoto S. Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-Myosin II signaling. Proc Natl Acad Sci USA、査読有、2012、*in press*
DOI:10.1073/pnas.111506310
- ② Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S, Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. Mol Cell Biol. 査読有, vol. 29(9), 2009, pp. 2372-2389.
DOI: 10.1128/MCB.01505-08
- ③ Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Mol Biol Cell. 査読有, vol. 19(6), 2008, pp. 2465-2475.
DOI: 10.1091/mbc.E07-12-1215

[学会発表] (計 1 件)

伊藤雅彦、他、The G protein-coupled RhoGEF targets ZO-1 to regulate cortical actomyosin organization in polarized cells、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅彦 (ITO MASAHIKO)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70270486

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

