

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15504

研究課題名（和文）Ror1-Rifシグナルによる血管擬態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of vascular mimicry by Ror1-Rif signaling

研究代表者

紙崎 孝基（Kamizaki, Koki）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00883448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：これまで肺腺がん細胞におけるWnt5a-Ror1シグナルの役割は不明であった。今回、我々は低分子量Gタンパク質RifがWnt5a-Ror1シグナルを制御し糸状突起形成に寄与することを見出した。また、RifおよびRor1の発現を抑制することで、肺腺がん細胞の増殖、浸潤、血管擬態形成能などが低下することを見出した。浸潤過程ではがん細胞の極性化や細胞外基質の分解に、血管擬態形成過程では細胞間張力にRor1シグナルが関与している可能性が示唆された。本解析から、Rif-Wnt5a-Ror1シグナルは糸状突起形成を介して、肺腺がん細胞の様々な機能において重要な役割を担っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでがん細胞の浸潤には浸潤突起が重要であるという報告が多かったが、今回の解析結果から浸潤突起とは異なる突起構造である糸状突起も浸潤に重要であることが明らかとなった。また、糸状突起は浸潤だけでなく、生存や増殖、血管擬態にも重要であることがわかり、がん細胞の多様な機能制御を担う新たな突起構造として明らかにできた点で学術的意義は大きい。今後、糸状突起の多様な機能について詳細に解析することで、将来的に新規がん治療薬の創出に繋がることが期待されるため、社会的意義も十分に有する研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Until now, the role of Wnt5a-Ror1 signaling in lung adenocarcinoma cells has been unknown. This study found that the small GTPase Rif regulates Wnt5a-Ror1 signaling and contributes to filopodia formation. We also found that suppression of Rif or Ror1 expression decreased lung adenocarcinoma cells' proliferation, invasion, and vascular mimicry. It was suggested that Ror1 signaling might be involved in extracellular matrix degradation during invasion and intercellular tension during vascular mimicry formation. This analysis indicates that Rif-Wnt5a-Ror1 signaling plays important roles in various functions of lung adenocarcinoma cells via filopodia formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Wnt5a-Ror1 肺腺がん 浸潤 血管擬態

1. 研究開始当初の背景

Ror ファミリー受容体である Ror1 は分泌性糖タンパク質である Wnt5a の受容体として機能することで、非古典的 Wnt 経路を活性化し、細胞の増殖や極性、移動などを制御する。Wnt5a-Ror1 シグナルは発生過程における組織・器官形成において重要であるが、正常な成体組織の多くでは Wnt5a および Ror1 の発現が低下する。しかし、がん細胞ではこれらの発現が上昇し、Wnt5a-Ror1 シグナルが活性化することで様々ながんの進展が促進される。Wnt5a および Ror1 の発現量は、肺腺がん患者の予後悪化とも相関することが報告されており、このことから Wnt5a-Ror1 シグナルが肺腺がんの進展に寄与する可能性が考えられていた。しかし、Wnt5a-Ror1 シグナルがどのようにして肺腺がんの進展を制御するか、その詳細な分子機構については不明であった。

我々はこれまでに、Ror1 がアクチン骨格からなる糸状突起と呼ばれる細胞膜突起構造の形成に重要であることを明らかにした。糸状突起の形成には低分子量 G タンパク質である Cdc42 と Rif (Rho in filopodia, RhoF ともいう) が中心的な役割を担うことが既に知られていたが、Ror1 によって形成される糸状突起は Rif によって形成される糸状突起と形態的に類似していることを見出した。さらに、Ror1 と Rif は結合すること、両者は糸状突起に共局在することを見出した。このため、Ror1 と Rif が機能的に関連している可能性が考えられたが、これまでに Ror1 と Rif の関係を示す報告は一切なかった。また、上述の通り肺腺がんの進展と Ror1 の関係を示す報告は既にあったものの、Rif と肺腺がんとの関連についてもこれまでに報告がなかった。このため、我々は肺腺がんにおける Ror1 および Rif の機能的連関について明らかにしたいと考えるに至った。

血管擬態はがん細胞が血管様の管腔構造を形成し、血液の通り道を作ることで、腫瘍組織に栄養分を供給する現象のことであり、がん細胞が血管新生阻害薬に対する耐性を獲得するメカニズムのひとつであると考えられている。培養下でがん細胞株を Matrigel 上に播種することで、がん細胞が網目状に整列することがあり(図1)、これが生体におけるがん細胞の血管擬態形成能と相関すると考えられている。血管擬態は肺腺がんでも認められる現象であるが、Ror1 や Rif と血管擬態との関連についてはこれまでに報告がなかった。また、培養下で認められる網目構造がどれほど生体における血管擬態形成能を反映しているかは議論の余地があり、生体における血管擬態形成能の評価方法の確立が急務であった。

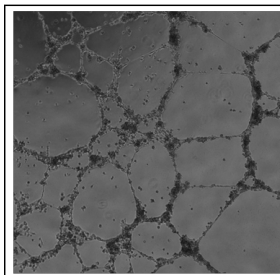


図1. 培養下での血管擬態の例
PC9細胞を分厚くコーティングしたMatrigelの上に播種した際の位相差顕微鏡での観察結果。PC9細胞が整列する様子が認められ、この形成能は生体での血管擬態形成能の指標として用いられている。

2. 研究の目的

本研究では、肺腺がん細胞の増殖や浸潤、血管擬態などにおける、Ror1 と Rif の相互作用の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では主に肺腺がん細胞株である PC9 細胞および HCC827 細胞を使用した。両細胞は 10%FBS を含む RPMI で培養した。各肺腺がん細胞における Ror1 や Rif の発現を抑制するために、RNAiMAX を用いて Ror1 もしくは Rif に対する siRNA (Sigma Aldrich) をトランスフェクションした。

肺腺がん細胞株の増殖能を解析するために、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) による WST-8 アッセイを用いて解析した。具体的には、肺腺がん細胞と各 siRNA および RNAiMAX を 96-well plate に播種し(1000~2000 cells / well)、翌日 Cell Counting Kit-8 の溶液を培地で 10 倍希釈し、細胞に添加した。この時を 0 日目として、3 日目まで同様の解析を行い、0 日目の測定結果を 1 とした時の、各時点での測定値の相対値を算出した。

浸潤能への影響について解析するために、トランズウェルを用いた浸潤アッセイを実施した。8 μ m pore size のトランズウェルの上側を、血清不含 RPMI で 10 倍希釈した Matrigel でコーティングした。その後、トランズウェルの下層には 10%FBS 含有 RPMI を、上層には血清不含 RPMI で懸濁した肺腺がん細胞を播種した。12 時間インキュベートした後、トランズウェルを 4% PFA で固定し、DAPI でトランズウェルの下層に移動した細胞の核を染めた。下層に移動した細胞数を ImageJ で計測し、Ror1 や Rif の発現抑制によって、肺腺がん細胞の浸潤能がどのような影響を受けるか解析した。

浸潤過程における細胞形態を観察するために、マトリゲル上に播種した PC9 細胞を 4%PFA で固定した後、クライオスタットで切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて糸状突起の形態について解析した。

浸潤過程における細胞外基質の分解能について評価するために、分解されると蛍光を発するDQ-コラーゲンを25 μ g/mLになるようにMatrigelで懸濁し、ガラス状にコーティングした。その上にPC9細胞を播種し2時間ほど経過した後、4% PFAで固定して、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得した後、分解されたDQ-コラーゲンの蛍光強度をImageJで計測した。

血管擬態形成能について解析するために、ガラス上にマトリゲルを分厚くコーティングし、その上に血清不含培地で懸濁した細胞を播種し、24時間以内にガラスを回収し形態を観察した。

血管擬態形成過程を模倣する数理モデルを構築するために、実際の細胞の整列画像を元に、Mathematicaを用いて血管擬態を点と線で作図し、Vertex modelを適応させることで、血管擬態形成過程の一部の細胞の挙動のモデル化を試みた。

免疫不全マウス (NOG マウスもしくはヌードマウス) の皮下に、マトリゲルに懸濁したコントロールもしくはRor1欠失PC9細胞、Rif欠失PC9細胞を移植し、28日後に腫瘍組織を摘出し、その重量を測定した。

生体での血管擬態形成能を評価する実験系の確立を目的として、免疫不全マウスの皮下に、マトリゲルに懸濁したPC9細胞を移植した。2週間後に移植したPC9細胞およびマトリゲルを取り出し、ビブラトームで切片を作製し、染色後共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

肺腺がん細胞株 PC9 細胞および HCC827 細胞に Ror1 および Rif に対する siRNA をトランスフェクションした。ウェスタンブロットで siRNA の処理により各タンパク質の発現が抑制されたことを確認した上で、まずは WST-8 アッセイを用いて増殖能への影響について解析した。その結果、Ror1 および Rif の発現を抑制することで増殖能が低下することが明らかとなった(図2)。次に、浸潤能への影響を解析するために、トランズウェルを用いた浸潤アッセイを行ったところ、Ror1 や Rif の発現を抑制することで浸潤能が顕著に抑えられることが明らかとなった(図3)。また、浸潤過程における PC9 細胞の形態を解析したところ、Ror1 および Rif の発現を抑制することで浸潤方向に極性をもって形成されていた糸状突起が、形成されなくなることが明らかとなった(図4)。さらにこのとき、DQ-コラーゲンを用いて細胞外基質の分解について解析したところ、Ror1 および Rif の発現を抑制することで糸状突起形成が阻害されるとともに、細胞外基質の分解も抑えられることが明らかとなった(図5)。この際に、PC9 細胞の浸潤方向への極性化が抑制されていることも確認されており、糸状突起は浸潤中のがん細胞の極性を制御することで細胞外基質の分解に寄与している可能性が考えられた。また、血管擬態への影響についても解析したところ、Ror1 や Rif の発現抑制によって血管擬態形成能が抑制されることが明らかとなった。血管擬態形成時には、まずは Matrigel 上にランダムに配置した細胞が整列し網目構造を形成した後、その網目構造が徐々に変形していく。この後半の網目構造の変形過程については、数理モデルから細胞間ではたらく張力が網目構造の変形には重要であることが示唆された。

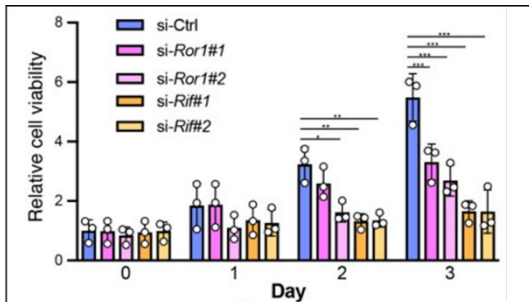


図2. Ror1およびRifは肺腺がん細胞の増殖を制御する
PC9細胞に各種siRNAを導入したのち、Cell Counting Kit-8を用いて増殖能について解析した結果。
* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, Dunnett's test

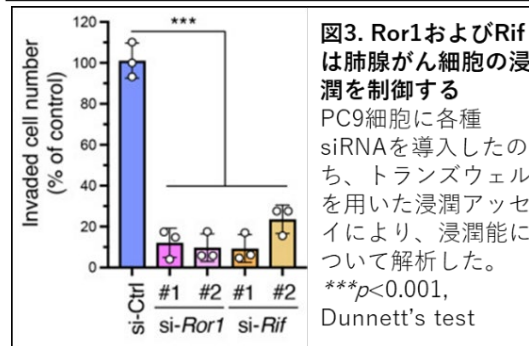


図3. Ror1およびRifは肺腺がん細胞の浸潤を制御する
PC9細胞に各種siRNAを導入したのち、トランズウェルを用いた浸潤アッセイにより、浸潤能について解析した。
*** p <0.001, Dunnett's test

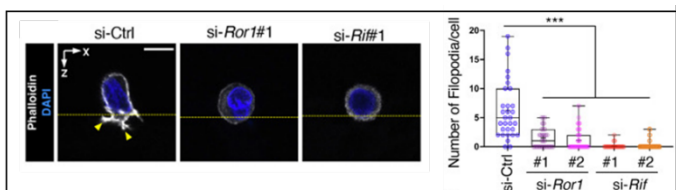


図4. Ror1およびRifは浸潤時の糸状突起形成に重要である
PC9細胞に各種siRNAを導入した後にMatrigel上に播種し、細胞形態を解析した。グラフは細胞あたりの糸状突起数を示す。
*** p <0.001, Dunnett's test

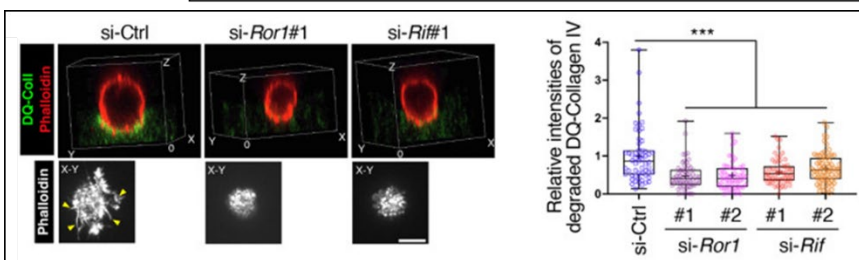


図5. Ror1およびRifは浸潤時の細胞外気質の分解に重要である
PC9細胞に各種siRNAを導入した後にDQ-Collagen含有Matrigelの上に播種し、細胞形態ならびに分解されることで生じるDQ-Collagenの蛍光強度を解析した。グラフは細胞あたりのDQ-Collagenの相対蛍光強度を示す。
*** p <0.001, Dunnett's test

CRISPR-Cas9 システムを用いて Ror1 あるいは Rif を欠失させた PC9 細胞を作製した。この細胞をマトリゲルに懸濁してヌードマウスの背部皮下に移植したところ、コントロール細胞に比べて Ror1, Rif 欠失細胞は小さな腫瘍しか形成しなかった(図6)。このことから、Ror1 と Rif は生体での肺腺がんの増殖に重要であることが示唆された。また、PC9 細胞をマトリゲルに懸濁し、免疫不全マウスの背部皮下に移植すると、特定の条件下では PC9 細胞が整列するような傾向が観察された。この現象は培養下で認められる血管擬態と類似している点から、生体での血管擬態形成能の評価系として利用できる可能性が考えられる。



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 0件）

1. 著者名 Nishita Michiru, Kamizaki Koki, Hoshi Kyoka, Aruga Kana, Nishikaku Ikumi, Shibuya Hiroshi, Matsumoto Kunio, Minami Yasuhiro	4. 巻 299
2. 論文標題 Rho family small GTPase Rif regulates Wnt5a-Ror1-Dvl2 signaling and promotes lung adenocarcinoma progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105248 ~ 105248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.105248	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koki Kamizaki, Michiru Nishita, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Rif regulates Wnt5a-Ror1 signaling to induce filopodia-mediated progression of lung adenocarcinoma cells.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紙崎 孝基、南 康博、西田 満
2. 発表標題 Ror1-Rif signaling mediates filopodia formation to promote invasion and vasculogenic mimicry of lung adenocarcinoma cells.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙崎 孝基、佐事 武、南 康博、西田 満
2. 発表標題 Wnt5a-Rorシグナルが制御する細胞膜突起形成とがん細胞浸潤
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------