

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689020

研究課題名(和文)細胞融合メカニズムから迫る、ポドソーム形成の新たな意義

研究課題名(英文)A new role of podosome formation as a mediator of cell-cell fusion

研究代表者

及川 司(Oikawa, Tsukasa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：20457055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円、(間接経費) 5,790,000円

研究成果の概要(和文)：細胞融合は、多細胞生物における受精や胎盤、筋肉、骨などの器官形成において重要であるが、近年存在が示唆されているがん-血球系融合細胞が生じる分子機構や融合細胞の性質については不明な点が多い。本研究ではイノシトールリン脂質(PI)による極性形成が細胞融合に重要であることを明らかにし、その下流で働くアダプター分子Tks5が、破骨細胞どうしの融合だけでなく、がん-破骨融合細胞の形成にも関与していることを明らかにした。さらに融合細胞の性状解析を通し、がん-破骨またはがん-マクロファージ融合細胞が、がん悪性化に寄与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cell-cell fusion requires dynamic rearrangement of the plasma membrane and cytoskeleton, and this process involves numerous previously characterized factors. However, the mechanisms and consequences of cell-cell fusion remains obscure. This study revealed that an adaptor protein Tks5 is essential for both formation of circumferential podosomes and osteoclast fusion without altering osteoclast differentiation. As Tks5 is known to promote the formation of invadopodia in cancer cells, I tested if these cells also have the potential to fuse with osteoclasts. Among the cells tested, B16F0 melanoma cells formed circumferential invadopodia with Tks5 accumulation. Co-culture of B16F0 melanoma cells with osteoclasts in an inflammatory milieu promoted increased formation of melanoma-osteoclast hybrid cells. These results revealed a previously unknown mechanism of regulation of both circumferential podosomes/invadopodia formation and cell-cell fusion by Tks5.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：細胞融合 細胞極性 上皮-間葉転換

1. 研究開始当初の背景

自発的に起こる細胞融合は、多細胞生物における受精や胎盤、筋肉、骨などの器官形成において重要であり、細胞融合が起きる時期や場所は、厳密に制御されていると考えられる。マクロファージや破骨細胞の前駆細胞は、骨髄細胞から分化・成熟する過程で、繊維状アクチンからなるリング状構造(ポドソームまたはインベードポディア)を形成しながら細胞融合を経て多核化し、それぞれ炎症局所への浸潤、食作用や骨吸収作用といった生理機能を果たすようになる。一方でこうしたマクロファージや破骨前駆細胞の細胞融合活性、骨吸収活性は、がん細胞により悪用されているかもしれないという報告もある。すなわち、がん細胞はマクロファージや破骨前駆細胞と細胞融合することで、より高い運動能・浸潤能を獲得している可能性がある。しかしこうしたヘテロ融合細胞が生じるメカニズムやその性質については、ほとんど分かっていない。

研究代表者が所属していた研究グループはこれまで、細胞運動における細胞膜イノシトールリン脂質(PI)の関与について研究を行ってきた。PIのなかでも細胞外からの刺激に応じて産生されるPI(3,4,5)P3やPI(3,4)P2は細胞運動やがん細胞の浸潤に重要であるが、マクロファージや破骨細胞に見られるポドソームの形成過程でも、これらのPIは中心的役割を果たしていることを明らかにしてきた。そこで、破骨細胞の融合過程におけるPIの極性を観察すべく、細胞膜に普遍的に存在するPI(4,5)P2と上記PI(3,4,5)P3やPI(3,4)P2を同時に可視化するプローブを構築した。このプローブを発現させた破骨前駆細胞を、分化誘導因子であるRANKL存在下で破骨細胞へと分化させた時の様子をライブ観察すると、融合時には細胞膜の融合面にPI(3,4,5)P3やPI(3,4)P2が強く濃縮し、かつ細胞融合が頻繁に起こる時間帯(RANKL添加後48-72h)でAktのリン酸化が亢進することから、これらの産生量も増加していることがわかった。さらにRANKL添加後48-72hの間でPI3-kinaseを抑制すると、細胞融合も抑制された。従ってこの下流で働き、かつ細胞融合時やがんの悪性化プロセスで発現が増加する分子こそが、破骨細胞融合のみならず、がん細胞が関わるヘテロ細胞融合にも関与すると考え、本研究を進めることにした。

2. 研究の目的

骨格筋細胞や破骨細胞などに見られるホモ細胞融合では、それぞれ融合に必須の分子がいくつか同定されたが、骨髄由来細胞-がん細胞のようなヘテロ細胞融合までをも説明し得るメカニズムは全く分かっていない。研究代表者は、イノシトールリン脂質(PI)の極性形成と、それに伴うポドソーム形成が細胞融合に必須であるという新しい知見を得

た。そこで本研究では、PIの下流分子を探索して得られたアダプター分子、Tks5が細胞融合をドライブするメカニズム及び融合細胞の性状を明らかにすることを目的とした。さらに、破骨細胞特異的なTks5コンディショナルノックアウトマウスを作製し、*in vivo*におけるこの分子の重要性を検証することも目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、以下の三点を具体的な解決課題と位置づけて研究を行った。(1)破骨細胞でTks5が活性を持つために受けるリン酸化や複合体形成の制御を分子レベルで明らかにし、細胞融合するためにはTks5依存的なポドソーム形成が必要であるか否かを明らかにする。(2)がん細胞が、マクロファージや破骨細胞と融合するためには、Tks5に依存した浸潤が必要であるか否かを明らかにする。がん細胞は通常は細胞融合しないため、炎症性サイトカインの添加や、破骨細胞分化に中心的な役割を果たすマスター転写因子、NFATc1の強制発現が必要である可能性がある。さらにTks5の重要性を*in vivo*で証明するが、Tks5は繊維芽細胞をはじめあらゆる組織に発現がみられるため、全身性ノックアウトマウスでは複合的な表現系が現れると予想される。従って、(3)破骨細胞特異的なTks5のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、破骨細胞に特異的なTks5の機能について検証する。

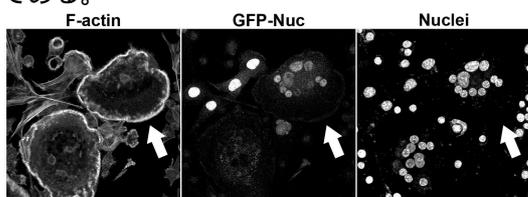
4. 研究成果

まずPIとその下流分子の機能を詳しく解析することで、細胞が持つ浸潤形質の獲得・制御機構を明らかにしたいと考えた。そこで、分化とともに多核化し、ポドソームの再編成と成熟が起こる破骨細胞をモデル系とし、PIの下流で働く分子をマイクロアレイとデータベースサーチによりスクリーニングしたところ、Srcチロシンキナーゼの基質として同定されていたアダプター分子、Tks5が抽出された。Tks5は破骨細胞分化の過程で発現量が上昇すること、その発現上昇を抑制すると、破骨細胞への分化は正常に進行するものの、ポドソームの形成や多核化(破骨細胞どうしの融合)が阻害されることを見いだした。Tks5の局在や細胞極性の解析、Tks5の結合タンパクの網羅的解析から、破骨細胞の融合過程では、細胞膜の融合面における局所的なPI3-キナーゼの活性化とPI(3,4,5)P3やPI(3,4)P2の産生、Tks5を含む機能分子群の集積とSrcによるTks5のリン酸化、ポドソーム形成、細胞融合という現象が起きていることが示唆された。

Tks5は、がんの悪性化プロセスである上皮-間葉転換でも発現が上昇し、このとき作られるインベードポディアの形成にも関与していることから、細胞どうしの融合と細胞外基質への接着、浸潤とは、PI(3,4,5)P3や

PI(3,4)P2の産生とTks5複合体が関与する共通の原理が働いている可能性があることに気がついた。実際に、がん細胞がインベードポディアを形成する条件(炎症性サイトカインであるTGF- とTNF- の存在下)で破骨細胞と共培養すると、破骨細胞-がん細胞の融合細胞が形成された(下図)。さらに、がん細胞のTks5をRNAiにより発現抑制すると、がん細胞のインベードポディア形成及び融合細胞の出現が抑制された。

破骨細胞特異的なTks5コンディショナルノックアウトマウスの作製は、キメラマウス作成に予想外に時間がかかり、まだ完成していない。このマウス作成と解析が今後の課題である。



核局在シグナルを持つGFP (GFP-Nuc)を発現するがん細胞を、破骨細胞分化の培養系で48時間共培養した後固定し、ファロイジンで繊維状アクチン(F-actin)、DAPIで核(Nuclei)可視化した。多核の破骨細胞のうち、核にGFPのシグナルを持つものが観察された(矢印)。この破骨細胞は、がん細胞と融合しがん細胞由来のGFP-Nucを発現していると考えられる。

研究代表者は上図のような融合細胞が、がんの発生や悪性化に関わっていると予想し、研究を進めた。実際に、ヒト病理標本から種々な炎症性細胞が集積している腫瘍部位で、そのような融合細胞の痕跡があることを確認した。破骨-がん融合細胞の性質を調べる最初のステップとして、破骨細胞分化のマスター転写因子であるNFATc1に注目した。NFATc1は破骨細胞またはその前駆細胞において発現及び活性化が必要十分であるが、多くのがん細胞では発現が認められない。融合細胞においては、がん細胞と破骨細胞の核と細胞質が共存するため、がん細胞の核は破骨細胞由来のNFATc1の影響を新たに受けることになる。この状況を模倣するために、恒常的活性化型NFATc1(NFATc1CA)の発現を薬剤(Dox)により誘導できる細胞株(MCF7-NFATc1CA)を樹立し、性質を調べた。MCF7細胞は乳線上皮由来のがん細胞株であり、形態からも各種マーカー分子の発現からも正常な上皮細胞に近く浸潤能を持たないが、以下のことがわかった。(1)NFATc1CAの発現を誘導すると、MCF7細胞は浸潤能を獲得する。(2)NFATc1CAは、MCF7細胞にTks5の発現を誘導するだけでなく、SnailやZeb1などの上皮-間葉転換に関与する転写因子の発現を誘導し、細胞間接着分子であるE-cadherinの発現を転写レベルで抑制する。(3)NFATc1CAの発現は、細胞膜上のE-cadherinのエンドサイトーシスを促進する。(4)こうしたE-cadherinに対する二重の負の制御が、(1)の浸潤能亢進に寄与してい

る。(5)この細胞をヌードマウスへ皮下移植し、Dox入りの餌を与えNFATc1CAの発現を誘導した個体では腫瘍が皮下に生着し、ある程度まで増殖した。しかし通常の餌を与えNFATc1CAの発現を誘導していない個体ではほとんど生着しなかった。(6)NFATc1CAの発現を誘導したMCF7細胞由来の腫瘍は、腫瘍の辺縁部において周囲の組織への浸潤が認められた。このことは、浸潤能を持たない正常上皮細胞や原発部位のがん細胞は、破骨細胞やその前駆細胞と融合することで生存に有利になったり、浸潤能を獲得する可能性があることを示している。

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 5件)

1. Oikawa T, Nakamura A, Onishi N, Yamada T, Matsuo K, Saya H. : Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer Res*, 73(16), 5100-5109, 2013
査読あり
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0274
2. Oikawa T, Okamura H, Dietrich F, Senju Y, Takenawa T, Suetsugu S. : IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-Src cells. *PLoS ONE*, 8(3), e60528, 2013
査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0060528
3. Oikawa T, Kuroda Y, Matsuo K. : Regulation of osteoclasts by membrane-derived lipid mediators. *Cell Mol Life Sci*, 70(18), 3341-3353, 2013
査読あり
doi: 10.1007/s00018-012-1238-4
4. Oikawa T and Matsuo K. : Possible role of IRTKS in Tks5-driven osteoclast fusion. *Commun Integr Biol*, 5(5), 511-515, 2012
査読あり
doi: 10.4161/cib.21252
5. Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, Matsuo K. : Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol*, 197(4), 553-568, 2012
査読あり
doi: 10.1083/jcb.201111116

〔学会発表〕(計 9件)

1. 及川 司.

“がん-マクロファージ細胞融合による、
がん悪性化機構の解析” (招待講演)
第2回蛍光バイオイメージングミニシン
ポジウム、2013年9月20日、北海道大
学電子科学研究所(札幌市)

2. 及川 司, 尾山大明, 秦 裕子, 中村敦
子, 大西伸幸, 上原俊介, 宇田川信之,
山田健人, 佐谷秀行, 松尾光一.

“アダプター分子 Tks5 依存的なポドソ
ーム/インバードポディア形成と、これを
介した破骨/がん細胞融合の解析” (口
頭発表・シンポジウム)
第86回日本生化学会大会、2013年9月
11日-13日、パシフィコ横浜(横浜市)

3. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Saya,
Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential
podosomes/invadopodia mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)
ASBMR (American Society for Bone
Mineral Research) 2012 Annual Meeting,
2012年10月11日-15日、Minneapolis
Convention Center (Minneapolis, USA)

4. Tsukasa Oikawa, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential
podosomes/invadopodia mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)
第30回日本骨代謝学会、2012年7月19
日-21日、京王プラザホテル(東京都新

宿区)

5. Tsukasa Oikawa, Atsuko Nakamura,
Koichi Matsuo, Hideyuki Saya

“NFATc1 promotes cancer cell invasion
via altered E-cadherin regulation”
(ポスター発表)
第64回日本細胞生物学会、2012年5月
28日-31日、神戸国際会議場(神戸市)

6. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Saya,
Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)
Bio-Rheumatology International
Congress、2011年11月14日-16日、
Sheraton Grande Tokyo Bay Hotel
(Urayasu, Japan)

7. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Saya,
Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)
Podosomes, Invadopodia and Focal
Adhesions in Physiology and Pathology,
2011年9月18日-21日、Ayre Gran Hotel
Colon (Madrid, Spain)

8. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Hideyuki Saya, Koichi
Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)

第 29 回日本骨代謝学会、2011 年 7 月 28
日-30 日、大阪国際会議場（大阪市）

研究者番号：

9. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Hideyuki Saya, Koichi
Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion”（ポスター発表）

第 63 回日本細胞生物学会、2011 年 6 月
27 日-29 日、北海道大学（札幌市）

〔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

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/oikawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 司 (Oikawa Tsukasa)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号：20457055

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()