

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23701051

研究課題名（和文）

集団的移動によるがん細胞浸潤の分子機序の解明

研究課題名（英文）

Molecular mechanism for collective invasion of cancer cell groups

研究代表者

加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00551970

研究成果の概要（和文）：がん細胞集団の leading cell (LC) において following cell (FC) と比較して integrin  $\beta 1$  の発現が上昇していることを見出し、それが転写調節因子である RFP と MRTF-B の協調的な機能によって制御されていることを見出した。LC の先端端において細胞間接着が消失することで Rho の活性化を介して RFP/MRTF-B 複合体形成が促進され、この複合体が integrin  $\beta 1$  の mRNA を標的とする miRNA-124 の発現を抑制することで LC 特異的に integrin  $\beta 1$  が発現上昇することを明らかにした。これらの結果から、がん細胞集団内において Heterogeneity がいかに確立されるのか、その分子機構のモデルを提唱する。

研究成果の概要（英文）：We revealed that expression of integrin  $\beta 1$  is up-regulated in leading cells compared to trailing cells. Increase of integrin  $\beta 1$  expression is crucial for effective migration in cells moving as a group. Two transcriptional regulators, RET Finger Protein (RFP) and Myocardin Related Transcription Factor-B (MRTF-B), form complex responding to the partial loss of cell-cell adhesion in leading cells, which activate Rho GTPase, and up-regulates the integrin  $\beta 1$  expression through the repression of integrin  $\beta 1$ -targetting microRNA-124 in LC. Our findings revealed the molecular mechanism that defines heterogenous properties of LC and FC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験病理学、腫瘍生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：collective invasion

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の浸潤に関する研究では、上皮-間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を経た単一細胞へと変化することが浸潤性を獲得するうえで重要であると着目されてきた。しかし、多くのがんの浸潤過程において細胞が集団を形成して移動する現象 (集団的移動) が観察されており、がんの浸潤・転移において非常に大きな役割を担うと考えられている。これらの細胞集団では先端部の leading cell (LC) とそれ

に続く following cell (FC) の間に細胞特性の違いがみられ、そのことが集団的移動に必要とされているが、その違いを生み出す分子機序については不明である。

## 2. 研究の目的

予備的な実験結果から、当研究室で機能解析を続けてきた転写調節因子 RET Finger Protein (RFP) が細胞集団中の LC において細胞-基質接着因子である integrin  $\beta 1$  の発現を正に調節することを示す結果を得た。ま

た RFP の発現を抑制することでがん細胞の集団的な遊走能が低下することを見出した。これらの結果から RFP が leading cell における integrin  $\beta 1$  の発現を制御することでがん細胞集団中の leading cell と trailing cell の間に特性の違いを生み出し、細胞の集団的移動を制御していることが示唆された。しかし、なぜ RFP が leading cell においてのみ integrin  $\beta 1$  の発現を制御できるのか、また RFP はどのような機構を介して integrin  $\beta 1$  の発現を制御するのかは不明である。

以上の背景から移動する細胞集団における RFP の機能解析を通じて、「集団的移動における leading cell と trailing cell の特性の違いを生み出す分子機構の解明」を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 開始当初までの予備的な実験によって細胞間接着の有無によって RFP による integrin  $\beta 1$  の発現制御が影響を受けることが明らかになっていた。そこで、細胞間接着が存在しない状況で RFP と結合して integrin  $\beta 1$  の発現を制御するタンパク質を、shRNA を用いたスクリーニングと免疫沈降法(IP)にて同定した。(2) 上述したように、RFP が LC 特異的に integrin  $\beta 1$  の発現を上昇させることが明らかになっている。そこで、培養細胞にて LC における変化を観察する目的で以下の2つの手法で培養細胞中における LC の割合を変化させた。①細胞の密度を100%から30%に変えた。②100%コンフルエントの細胞をピペットの先で多数回スクラッチし、経時的な変化を観察した(図1)。これらの手法とウェスタンブロッティング、RT-PCR、IP、クロマチン免疫沈降法(ChIP)などを組み合わせて LC における変化を検討した。

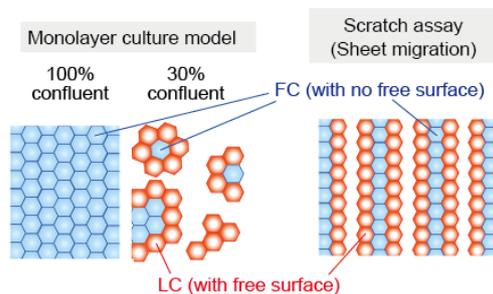


図1 実験モデル  
細胞密度の変化および細胞のスクラッチによって LC の比率を変化させることができる。

### 4. 研究成果

細胞間接着依存的に RFP との相互作用が変化し、integrin  $\beta 1$  の発現を制御する分子として、Rho GTPase によって活性化されて核内に移行し転写に関与する Myocardin Related Transcription Factor-B (MRTF-B) を同定し

た(図2A, B)。また、RFP と MRTF-B が、細胞間接着が部分的に失われた LC においてのみ核内で共局在すること、LC における RFP-MRTF-B 相互作用が Rho の阻害剤(C3T)によって阻害されることなどが明らかになった(図2C, D)。また、他のグループの研究で細胞間接着部位において Rho の活性が抑制されていることが報告されている。これらのことから、細胞間接着によって囲まれた FC では Rho が活性化せず、RFP と MRTF-B は相互作用しないが、部分的に細胞間接着を欠失した LC では Rho が活性化され、それによって MRTF-B と RFP が核内で相互作用して、integrin  $\beta 1$  の発現を上昇させていると考えられた。

次に RFP と MRTF-B の相互作用が integrin

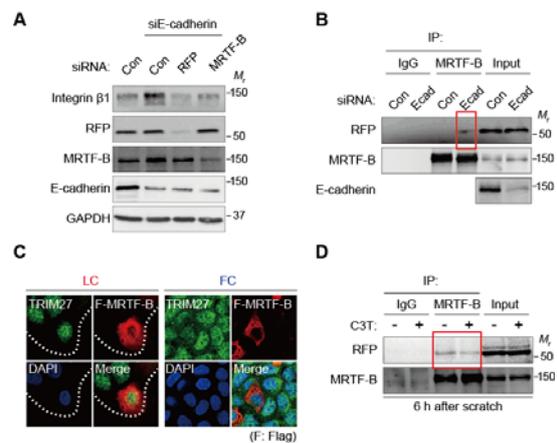


図2

$\beta 1$  の発現上昇に実際に寄与しているか否かを検討した。まず、MRTF-B の欠失変異体を作製して細胞に発現させ、免疫沈降法にて RFP との相互作用領域を検索した。その結果、MRTF-B の Q ドメインを含む約 60 アミノ酸

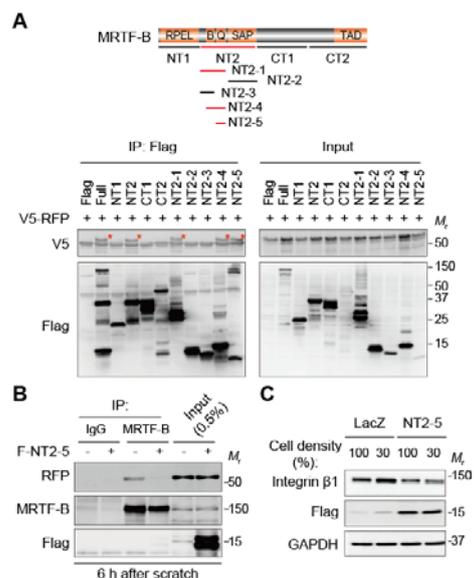


図3

の領域を介して RFP と結合していることが

明らかになった (図 3A)。この領域を A431 細胞に過剰発現させ、内在性の RFP と MRTF-B の相互作用が阻害されることを確認した (図 3B)。この条件下で integrin  $\beta 1$  の発現を検討したところ、RFP と MRTF-B の相互作用を阻害することで LC における integrin  $\beta 1$  の発現上昇が見られなくなるという結果が得られた。このことから、RFP-MRTF-B 相互作用が integrin  $\beta 1$  の発現上昇に重要であることが示唆された。

さらに、RFP と MRTF-B が如何にして integrin  $\beta 1$  の発現上昇を制御しているかを検討した。RFP と MRTF-B が共に転写調節タンパクであることから、転写レベルでの制御について検討する目的で、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を施行し integrin  $\beta 1$  のプロモーター活性を評価した。予想に反して、RFP、MRTF-B のノックダウンによる integrin  $\beta 1$  プロモーター活性の変化が見られず (図 4A)、転写後のレベルでの制御が示唆された。そこで、転写後調節である mRNA の翻訳レベルの評価を行ったところ、LC にて integrin  $\beta 1$  mRNA の翻訳レベルが高く、それが RFP もしくは MRTF-B のノックダウンによって相殺されるという結果を得た (図 4B)。これらのことから、RFP、MRTF-B が翻訳レベルで integrin  $\beta 1$  の発現制御を担っていると結論づけた。

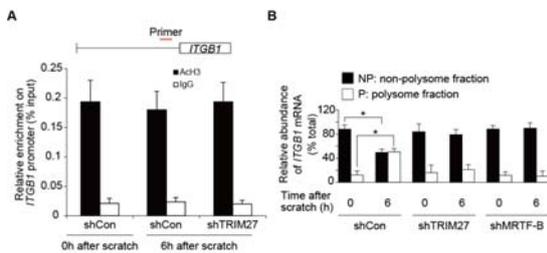


図 4

integrin  $\beta 1$  の翻訳を制御する機構の候補として miRNA について検討したところ、以前に integrin  $\beta 1$  を標的とすることが報告されていた miR-124 の発現が LC で減少しており、それが RFP および MRTF-B に依存的であることが明らかになった (図 5A)。さらに、RFP、MRTF-B が LC において miR-124 のプロモーターに結合すること、MRTF-B が RFP をプロモーターにリクルートすることで RFP による miR-124 の転写抑制が起こることが判明した (図 5B-D)。これらのことから、RFP と MRTF-B が LC において miR-124 の発現を抑制することで integrin  $\beta 1$  の翻訳レベルが上昇していると結論した。

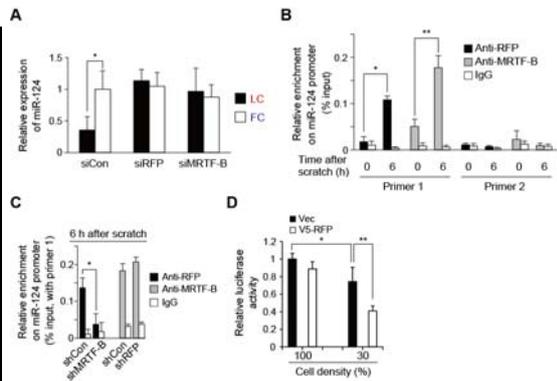


図 5

以上の結果から、LC において細胞間接着が失われることで Rho の活性化を介した RFP-MRTF-B 複合体形成が促進され、核内にて miR-124 の発現を抑制して integrin  $\beta 1$  の発現が上昇するというモデルを提唱する。このモデルはがん組織内においていかに heterogeneity が確立されるのかを説明するものと捉えている。

## 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 10 件)

1. Saito S, Murakumo Y, Tsuzuki T, Dambara A, Kato T, Enomoto A, Asai N, Maruyama S, Matsuo S, Takahashi M. Analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor-inducible zinc finger protein 1 expression in human diseased kidney. Hum Pathol. 2011 42(6):848-58. 査読有

2. Motegi Y, Katayama K, Sakurai F, Kato T, Yamaguchi T, Matsui H, Takahashi M, Kawabata K, Mizuguchi H. An effective gene-knockdown using multiple shRNA-expressing adenovirus vectors. J Control Release. 2011 153(2):149-53. 査読有

3. Wang Y, Kaneko N, Asai N, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Kato T, Asai M, Murakumo Y, Ota H, Hikita T, Namba T, Kuroda K, Kaibuchi K, Ming GL, Song H, Sawamoto K, Takahashi M. Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. J Neurosci. 2011 31(22):8109-22. 査読有

4. Iwakoshi A, Murakumo Y, Kato T, Kitamura A, Mii S, Saito S, Yatabe Y, Takahashi M. RET finger protein expression is associated with prognosis in lung cancer

with epidermal growth factor receptor mutations. *Pathol Int.* 2012 62(5):324-30. 査読有

5. Ohara K, Enomoto A, Kato T, Hashimoto T, Isotani-Sakakibara M, Asai N, Ishida-Takagishi M, Weng L, Nakayama M, Watanabe T, Kato K, Kaibuchi K, Murakumo Y, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. Involvement of Girdin in the determination of cell polarity during cell migration. *PLoS One.* 2012 7(5):e36681. doi:10.1371/journal.pone.0036681. 査読有

6. Ishida-Takagishi M, Enomoto A, Asai N, Ushida K, Watanabe T, Hashimoto T, Kato T, Weng L, Matsumoto S, Asai M, Murakumo Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, Takahashi M. The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat Commun.* 2012 29;3:859. doi: 10.1038/ncomms1861. 査読有

7. Mii S, Murakumo Y, Asai N, Jijiwa M, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Enomoto A, Ushida K, Sobue S, Ichihara M, Takahashi M. Epidermal hyperplasia and appendage abnormalities in mice lacking CD109. *Am J Pathol.* 2012 181(4):1180-9. 査読有

8. An J, Enomoto A, Weng L, Kato T, Iwakoshi A, Ushida K, Maeda K, Ishida-Takagishi M, Ishii G, Ming S, Sun T, Takahashi M. Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 139(3):379-88. 査読有

9. Horio M, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Murakumo Y, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Expression of RET finger protein predicts chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Cancer Med.* 2012 1(2):218-29. 査読有

10. Nagai H, Chew SH, Okazaki Y, Funahashi S, Namba T, Kato T, Enomoto A, Jiang L, Akatsuka S, Toyokuni S. Metamorphosis of mesothelial cells with active horizontal motility in tissue culture. *Sci Rep.* 2013 3:1144. doi: 10.1038/srep01144. 査読有

[学会発表] (計6件)

1. 加藤琢哉, 榎本篤, 浅井直也, 村雲芳樹,

高橋雅英 Cell-cell contact dependent regulatory role of RFP in integrin beta1 expression. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月5日 名古屋

2. Kato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. Cell-cell contact dependent regulatory role of RFP in integrin beta1 expression. The American Society of Cell Biology, 2011 Annual Meeting. 2011年12月6日 デンバー、アメリカ合衆国

3. 加藤琢哉, 榎本篤, 浅井直也, 村雲芳樹, 高橋雅英 がん細胞の集団的浸潤の制御機構の解析 第101回日本病理学会総会 2012年4月28日 東京

4. 加藤琢哉, 榎本篤, 浅井真人, 浅井直也, 村雲芳樹, 高橋雅英 Regulatory mechanism of integrin beta1 expression in collectively migrating cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日 札幌

5. Kato T, Enomoto A, Haga H, Ishida S, Asai M, Asai N, Takahashi M. Regulatory mechanism of integrin beta1 expression in collectively migrating cancer cells. The American Society of Cell Biology, 2012 Annual Meeting. 2012年12月18日 サンフランシスコ、アメリカ合衆国

6. Kato T, Enomoto A, Asai M, Asai N, Takahashi M. Regulatory mechanism of integrin beta1 expression in collectively migrating cancer cells. 9th AACR-JCA Joint Meeting. 2013年2月23日 ハワイ、アメリカ合衆国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00551970

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし