

# 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：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701069

研究課題名（和文） 乳癌細胞の浸潤・転移におけるイノシトールリン脂質の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of phosphoinositides in invasion and metastasis of breast cancer cells

研究代表者

山口 英樹（YAMAGUCHI HIDEKI）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10345035

研究成果の概要（和文）：

浸潤突起は癌細胞により形成される細胞外基質分解活性を持つ細胞膜構造であり、癌浸潤・転移において重要な役割を果たす。本研究では、癌の悪性化に深く関与するイノシトールリン脂質代謝の機能を解析した。その結果、様々なヒトの癌で活性化変異がみられるPI3キナーゼのp110 $\alpha$ が浸潤突起形成と乳癌細胞の浸潤を制御することを明らかにした。従ってp110 $\alpha$ を介したシグナル伝達経路が癌浸潤・転移の治療標的となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Invadopodia are membrane protrusions formed by invasive cancer cells that mediate degradation of pericellular ECM and have been implicated in local invasion during cancer metastasis. In this study, we investigated the role of phosphoinositide metabolism in invadopodium formation. We found that PI3 kinase p110 $\alpha$ , a frequently mutated gene product in human cancers, is involved in invadopodium formation and invasion by breast cancer cells. This finding suggests that the signaling pathway via p110 $\alpha$  is a potential therapeutic target for the treatment of cancer invasion and metastasis.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死亡原因の1位であり、約3人に1人はがんで亡くなる。がん患者の命を奪う主な要因は悪性癌の転移であるが、その有効な治療法は未だ確立されていない。癌細胞が転移するためには、癌組織を取り囲む基底膜の破壊と間質への浸潤が不可欠であるが、基底膜や間質に存在する細胞外基質は物理的障害となるため、癌細胞はこれを分解し遊走する必要がある。従って癌細胞による細胞外基質分解の分子機構の解析は、癌浸潤・

転移の分子レベルでの本態解明と、それに基づく新たな治療法の開発に極めて重要である。

浸潤能を持つ癌細胞を生理的な細胞外基質上で培養すると、細胞外基質を分解する活性を持つ、浸潤突起（Invadopodia）と呼ばれる構造が細胞底部に観察される。浸潤突起にはアクチン繊維、アクチン制御タンパク質、シグナル伝達分子、細胞外基質分解酵素などが集積する。浸潤突起は様々な浸潤性癌細胞（乳癌、悪性黒色腫、大腸癌、膵癌、神経膠

腫等)により形成され、癌細胞の浸潤突起形成能と浸潤、転移能には強い相関がみられる。従って、浸潤突起は癌細胞が周辺組織を浸潤する際に機能し、癌転移において重要な役割を果たすと考えられている。

申請者はこれまでに N-WASP や Arp2/3 複合体など 10 以上の浸潤突起構成制御分子を同定し、浸潤突起形成の分子メカニズムを明らかにしてきた。この中でも Mena については、浸潤性の癌細胞に特異的に発現するアイソフォームを見いだし、この分子が浸潤突起形成及び動物モデルでの癌転移を促進することを米国のグループとの共同研究により明らかにした。他の浸潤突起構成分子についても実際に癌転移に関与するものが多く存在することから、浸潤突起形成の分子機構の解析は、癌転移を分子レベルで理解するうえで非常に重要であると考えられる。しかし浸潤突起形成の分子機構は未だ不明な部分が多く、特にどのような形質膜上のシグナルが浸潤突起形成を制御しているのか明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

細胞膜構成脂質であるイノシトールリン脂質、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 [PI(3, 4, 5)P3] は、標的タンパク質を介して多様な細胞機能を制御する。PI(3, 4, 5)P3 の産生は、細胞外刺激に応じて活性化されるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3 キナーゼ) により厳密に制御されている。癌の発生や悪性化には PI3 キナーゼシグナル伝達系の異常が深く関与する。哺乳類において PI(3, 4, 5)P3 の産生を主に担う PI3 キナーゼはクラス I 触媒サブユニット p110 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$  である。申請者は先行実験の結果から PI(3, 4, 5)P3 の機能が浸潤突起形成に必要であり、PI3 キナーゼの中でも p110 $\alpha$  が特異的に浸潤突起形成を制御することを見いだしている。p110 $\alpha$  をコードする PIK3CA 遺伝子は、乳癌の約 27% で活性化変異が見いだされており、浸潤・転移との関連も指摘されている。そこで本研究では、1) 浸潤突起形成における PI(3, 4, 5)P3 や p110 $\alpha$  の局在様式や機能解析、2) 癌で見られる PIK3CA 遺伝子変異の浸潤突起形成への影響、3) 乳癌転移における p110 $\alpha$  の役割の検討を行う。このようなアプローチから、浸潤突起形成の分子機構の解明とその癌転移における役割、さらには p110 $\alpha$  の悪性癌に対する新たな治療標的としての有用性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、シグナル伝達に関わるイノシトールリン脂質 PI(3, 4, 5)P3 とその産生酵素である PI3 キナーゼ p110 $\alpha$  の、乳癌細胞による

浸潤突起形成、細胞外基質分解、浸潤・転移における役割を明らかにすることを目的とし以下の解析に取り組む。転移性の高いヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞を主に用いて、分子細胞生物学的手法と動物実験を組み合わせた解析を行う。

- (1) 浸潤突起における p110 $\alpha$  及び PI(3, 4, 5)P3 の局在と機能解析
- (2) ヒト癌で見られる p110 $\alpha$  活性化変異の浸潤突起形成に対する影響の検討
- (3) p110 $\alpha$  及び PI(3, 4, 5)P3 の下流シグナル伝達分子の機能解析
- (4) マウスモデルを用いた p110 $\alpha$  の乳癌転移における役割の検討

## 4. 研究成果

多様な細胞内シグナルを制御するイノシトールリン脂質の一つ、PI(3, 4, 5)P3 の転移性乳癌細胞における局在を解析したところ、浸潤突起に局在することが分かった。次に PI(3, 4, 5)P3 産生酵素である PI3 キナーゼの機能解析を行った結果、PI3 キナーゼアイソフォームの一つである p110 $\alpha$  が浸潤突起形成に必要であることが明らかになった。p110 $\alpha$  は多くの癌で活性化変異がみられ、癌の進展に寄与することが報告されている。そこでこの活性化変異を持つ p110 $\alpha$  を乳癌細胞に導入したところ浸潤突起形成が促進された。さらに p110 $\alpha$  の shRNA を発現する細胞を作成した結果、3次元マトリゲル中での浸潤能が顕著に抑制された。現在この細胞をヌードマウスに移植し、浸潤、転移能の検討を行っている。また PI(3, 4, 5)P3 の脱リン酸化酵素である癌抑制遺伝子産物 PTEN が浸潤突起形成を負に制御していることも見いだした。以上の結果から、イノシトールリン脂質の産生と下流シグナル伝達経路が浸潤突起形成を介した癌細胞の浸潤過程に深く関与す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 10 件)

- (1) Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, and Sakai R: CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. Mol. Cancer Res. In press. 査読有
- (2) Kanemaru K\*, Nakamura Y\*, Sato K, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Asagiri M, Jamora C, Kouchi Z, Yamaguchi H, and Fukami K: Epidermal loss of phospholipase C  $\delta$  1 results in myeloproliferation in mice. Nature Commun. 3: 963 (2012) doi:

10.1038/ncomms1960 \*Equally contributed  
査読有

(3) Yamaguchi H: Pathological roles of invadopodia in cancer invasion and metastasis. *Eur. J. Cell. Biol.* 91: 902-907 (2012) 査読有

(4) Gligorijevic B\*, Wyckoff J\*, Yamaguchi H, Wang Y, Roussos E, and Condeelis J: N-WASP-mediated invadopodium formation is necessary for intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J. Cell Sci.* 125: 724-734 (2012) \*Equally contributed 査読有

(5) 山口英樹: がん細胞による浸潤突起形成の分子機構. 生化学. 日本生化学会. Vol. 84, No. 1, (2012) 査読無

(6) Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Yoshida N, Kawamura M, Yoshida N, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K: PI3-kinase signaling pathway mediated by p110 $\alpha$  regulates invadopodia formation. *J. Cell. Biol.* 193: 1275-1288 (2011) 査読有

(7) Hirata M\*, Suzuki M\*, Ishii R\*, Kitazumi T, Sasaki T, Kitamura T, Yamaguchi H, Nakamura Y, and Fukami K: Genetic defect in phospholipase C $\delta$ 1 protects mice from obesity by regulating thermogenesis and adipogenesis. *Diabetes* 60: 1926-1937 (2011) \*Equally contributed 査読有

(8) Kouchi Z, Fujiwara Y, Yamaguchi H, Nakamura Y, and Fukami K: Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase II $\beta$  promotes vitamin D receptor-dependent E-cadherin expression in SW480 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 408: 523-529 (2011) 査読有

(9) Kouchi Z\*, Igarashi T\*, Shibayama N\*, Inanobe S, Sakurai K, Yamaguchi H, Fukuda T, Yanagi S, Nakamura Y, and Fukami K: Phospholipase C $\delta$ 3 regulates RhoA/Rho kinase signaling and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 286: 8459-8471 (2011) \*Equally contributed 査読有

(10) Sakurai K, Hirata M, Yamaguchi H, Nakamura Y, and Fukami K: Phospholipase Cd3 is a novel binding partner of Myosin VI and functions as anchoring of Myosin VI on plasma membrane. *Advan. Enzyme Regul.* 51: 171-181 (2011) 査読無

[学会発表] (計 12 件)

(1) Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, and Sakai R: Differential sensitivities to molecular target drugs in scirrhous gastric carcinoma cell lines. The 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint

Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research (2013), Maui, USA.

(2) Yamaguchi H, Yoshida N, and Sakai R: The role of PI3-kinase signaling pathway in invadopodia formation. AACR Special Conference of Tumor Invasion and Metastasis (2013), San Diego, USA.

(3) 山口英樹, 吉田那智, 高梨美帆, 深見希代子, 柳原五吉, 八代正和, 堺隆一: スキルス胃癌細胞と間質線維芽細胞の相互作用による細胞外基質リモデリングと浸潤. 第 85 回 日本生化学会大会 (2012 年 福岡)

(4) 山口英樹, 柳原五吉, 堺隆一: スキルス胃癌細胞株における c-Met 受容体型チロシンキナーゼ依存性の検討. 第 71 回 日本癌学会学術総会 (2012 年 札幌)

(5) 山口英樹, 堺隆一: スキルス胃癌細胞における Met シグナル伝達系の機能解析. 第 21 回 日本がん転移学会学術集会・総会 (2012 年 広島)

(6) 山口英樹, 柳原五吉, 八代正和, 堺隆一: Cancer-associated fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and three-dimensional invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. 第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会 (2012 年 神戸)

(7) Yamaguchi H, Yanagihara K, Yashiro M, and Sakai R: Cancer-associated fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and three-dimensional invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. 103rd Annual meeting of the American Association for Cancer Research (2012), Chicago, USA.

(8) Yamaguchi H: The role of PI3-kinase signaling pathway in invadopodia formation. Podosomes, Invadopodia, and Focal Adhesions in Physiology and Pathology (2011), Madrid, Spain.

(9) 山口英樹, 柳原五吉, 八代正和, 堺隆一: 腫瘍由来線維芽細胞との共培養によるスキルス胃癌浸潤機構の解析. 第 70 回 日本癌学会学術総会 (2011 年 名古屋)

(10) 山口英樹, 深見希代子, 堺隆一: 細胞膜脂質による癌細胞浸潤の制御機構. 第 63 回日本細胞生物学会大会 (2011 年 札幌)

(11) 山口英樹, 堺隆一: スキルス胃癌細胞の胃癌由来線維芽細胞を介した細胞外基質リモデリングと浸潤. 第 20 回 日本がん転移学会学術集会・総会 (2011 年 浜松)

(12) Yamaguchi H, Fukami K, and Sakai R: Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 $\alpha$  regulates invadopodia formation. 102nd Annual meeting of the American Association for

Cancer Research (2011), Orlando, USA.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/07grow/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 英樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10345035

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：