

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650621

研究課題名(和文) ゴルジ体のイノシトールリン脂質により制御される上皮間葉転換機構の解明

研究課題名(英文) Phosphoinositide in the Golgi apparatus regulates epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

長谷川 恵美(徳田恵美)(Tokuda, Emi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：30598925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体のホスファチジルイノシトール4リン酸(PI4P)ががんの悪性化において上皮間葉転換を制御することを明らかにした。乳がん細胞株でゴルジ体のPI4P量を増加させると上皮間葉転換のような現象が見られた。ゴルジ体のPI4P量を減少させた時にはこれとは逆の現象が見られた。また、乳がん細胞株と乳がん患者サンプルにおいてがんの悪性度と比例してゴルジ体のPI4P量が増加していることを明らかにした。さらに、PI4Pによる上皮間葉転換制御にはゴルジ体に局在するPI4P結合タンパク質であるGOLPH3が関与することを明らかにした。以上から、PI4Pはがんの悪性化において重要な役割を果たしていることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I showed that phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) in the Golgi apparatus regulates epithelial-mesenchymal transition during cancer progression. Increasing PI4P level in the Golgi apparatus resulted in decreased cell-cell adhesion and increased cell migration which is characteristic of epithelial-mesenchymal transition. In contrast, decreasing PI4P in the Golgi apparatus resulted in increased cell-cell adhesion and decreased invasion. Furthermore, PI4P level in the Golgi apparatus was increased in malignant breast cancer cell lines and malignant breast cancer patient. I also showed that GOLPH3, which is known to localize in the Golgi apparatus and bind to PI4P, was involved in the generation of these phenotypes in a manner that depends on its PI(4)P-binding ability. These results suggest that PI4P in the Golgi apparatus plays an important role in cancer progression.

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：上皮間葉転換 ゴルジ体 イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換は固体発生時に上皮細胞が間葉系様細胞のように細胞間接着を消失させ、運動能を獲得する現象である。がんの悪性化の際にも同様の現象が見られることから、上皮間葉転換はがんの悪性化にも重要であると考えられている。従って、上皮間葉転換の機構を解明することはがんの悪性化の阻止につながり、これまでに多くの研究がなされてきた。しかし、イノシトールリン脂質の関与についての研究は少ないことから、上皮間葉転換の制御機構についてイノシトールリン脂質という新しい観点からの解析を試みた。

2. 研究の目的

申請者は様々なイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素のうち細胞間接着に関与するものを探索した結果、ゴルジ体において PI4P (ホスファチジルイノシトール4リン酸) を PI (ホスファチジルイノシトール) に脱リン酸化する SAC1 という酵素を発現抑制すると細胞間接着が減少することを突き止めた。細胞間接着の消失は上皮間葉転換で見られる現象の1つであり、ゴルジ体のイノシトールリン脂質が上皮間葉転換に関与することはこれまで報告されていないので、ゴルジ体の PI4P が上皮間葉転換に関与することおよびその機構を明らかにすることを目的とした。具体的には

- (1) 上皮間葉転換がゴルジ体の PI4P によって制御されること
  - (2) 実際にがんの悪性化とゴルジ体の PI4P 量に相関があること
  - (3) その分子機構を明らかにすること
- の3点を明らかにすることで、上皮間葉転換の新しい制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) ゴルジ体の PI4P 量を変化させた際に上皮間葉転換が見られるか検討する。

PI4P 脱リン酸化酵素である SAC1 の発現抑制によりゴルジ体の PI4P 量を増加させる。その際に細胞間接着、運動能、上皮間葉転換マーカーの変化などを調べることで上皮間葉転換が起こるかを確かめる。

ゴルジ体に局在し PI から PI4P を産生する PI4 キナーゼの発現抑制によりゴルジ体の PI4P 量を減少させる。その際に細胞間接着、浸潤能、上皮間葉転換マーカーの変化などを調べることで上皮間葉転換が抑制されるかを確かめる。

(2) ゴルジ体の PI4P 量の定量方法を確立し、がんの悪性化に伴って PI4P 量が増加しているかを検討する。

PI4P 特異的に結合する Fapp1 の PH ドメインのリコンビナントタンパク質に蛍光標識したものを PI4P のプローブとして用いる。このプローブを用いてゴルジ体の PI4P を検出、定量する方法を確立する。

この定量方法を用いて上皮間葉転換を誘導したがん細胞や、臨床のがん組織サンプルで PI4P 量を定量し、悪性化に伴ってゴルジ体の PI4P 量が増えていることを明らかにする。

(3) ゴルジ体の PI4P による上皮間葉転換制御機構を検討する。

4. 研究成果

(1) 悪性度が低く細胞間接着の強い乳がん細胞株において SAC1 を発現抑制したところ、ゴルジ体の PI4P 量の増加が見られた。また、PI4P 量が増加した細胞では細胞間接着の低下(図1)、運動能の亢進(図2)、上皮間葉

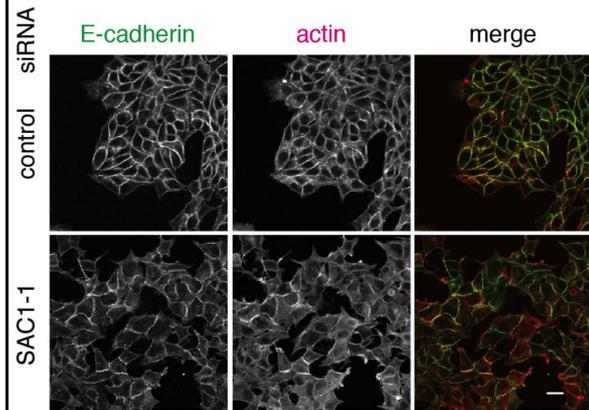


図1

転換マーカーである SNAI2 の発現上昇が見られた。これらは上皮間葉転換の際に見られる現象であることから、ゴルジ体の PI4P 量の増

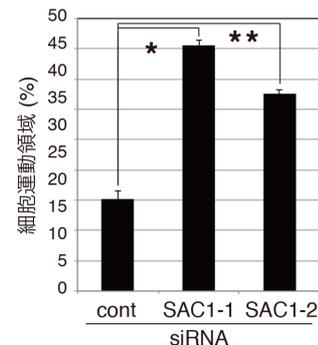


図2

\* P > 0.001, \*\* P > 0.005

加により上皮間葉転換が誘導される可能性が考えられた。

(2) 悪性度が高く細胞間接着の弱い乳がん細胞株においてゴルジ体に局在する PI4 キナーゼを発現抑制したところ、ゴルジ体の PI4P 量の減少が見られた。また、PI4P 量の減少した細胞では(1)の場合とは逆に、細胞間接着

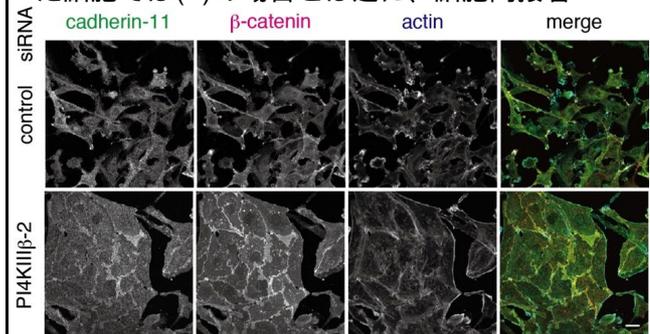


図3

の亢進(図3)、浸潤能の抑制(図4)、上皮間葉転換マーカーである

SNAI1 の発現減少が見られた。(1)と(2)よりゴルジ体の PI4P 量の増減により上皮間葉転換が制御されていると考えられた。

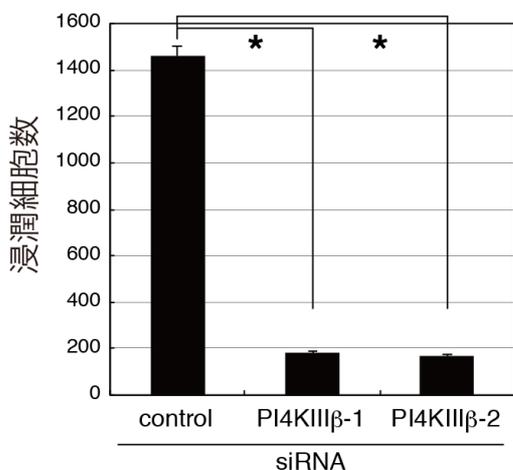


図 4

\* P > 0.001

(3)①PI4P 特異的な蛍光プローブを製作し、細胞内の PI4P を検出する方法を開発した。その方法を用いてゴルジ体の PI4P 量の定量を行った。②悪性度の低い乳がん細胞株に上皮間葉転換を誘導したところ、ゴルジ体の PI4P 量の増加が見られた。③悪性度の低い乳がん細胞株と高い乳がん細胞株でゴルジ体の PI4P 量を比較したところ、悪性度の高い

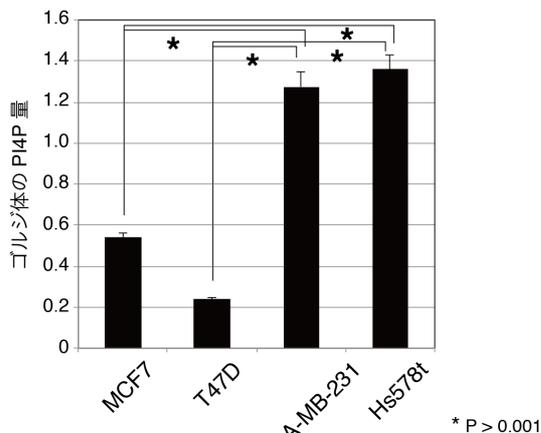


図 5

悪性度

細胞株の PI4P 量が 2 倍以上増加していた(図 5)。④転移の見られない乳がん患者サンプルと転移の見られた乳がん患者サンプルで

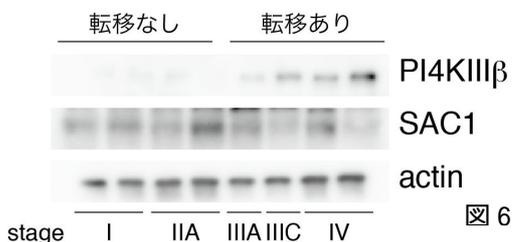


図 6

SAC1 と PI4 キナーゼの発現を比較したところ、転移の見られた乳がん患者では SAC1 の発現減少と PI4 キナーゼの発現増加が見られた

(図 6)。⑤データベース探索により、数種類のがんで PI4 キナーゼの発現上昇と SAC1 の発現減少が見られた。②～⑤より実際にがんの悪性化に伴い、ゴルジ体の PI4P 量が増加していることが明らかになった。

(4)ゴルジ体の PI4P と上皮間葉転換をつなぐ分子としてゴルジ体に局在する PI4P 結合タンパク質 GOLPH3 に着目して研究を行った。

①ゴルジ体の PI4P 量を変化させた時の GOLPH3 の局在を調べたところ、PI4P 量が増加するとゴルジ体に局在する GOLPH3 の量も増えており、逆に PI4P 量が減少すると GOLPH3

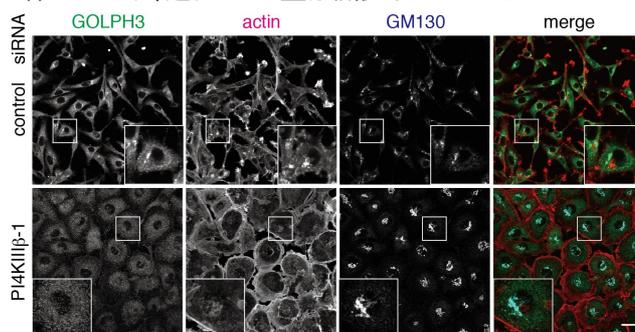


図 7

はゴルジ体に局在出来なくなった(図 7)。②GOLPH3 を発現抑制した際の乳がん細胞株の変化を調べたところ、GOLPH3 発現抑制により細胞間接着の増加と浸潤能の抑制が見ら

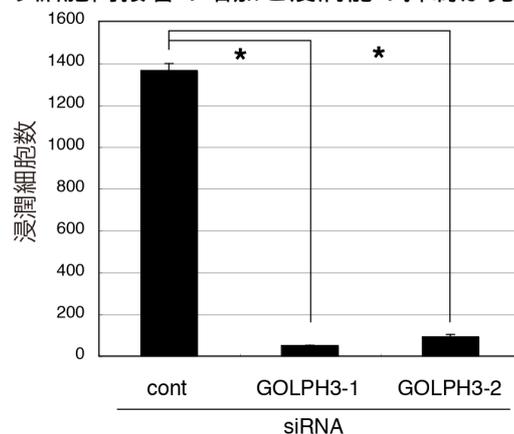


図 8

\* P > 0.001

れた(図 8)。これらの現象はゴルジ体の PI4P を減少させた時に見られるのと同様の現象であった。③SAC1 の発現抑制によりゴルジ体

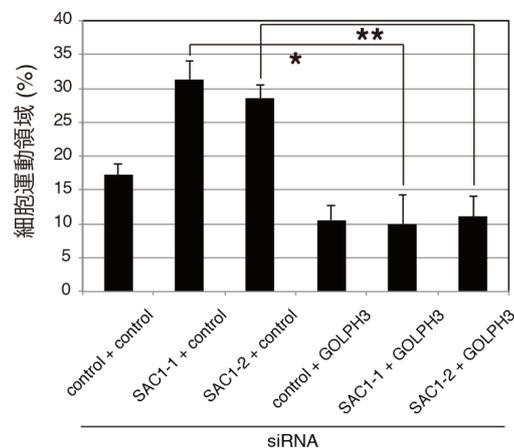


図 9

\* P > 0.01, \*\* P > 0.005

の PI4P 量を増加させた細胞において GOLPH3 の発現抑制を行った。ゴルジ体の PI4P 量増加により細胞間接着の減少と運動能の亢進が見られるが、GOLPH3 を発現抑制させるとこれらの変化は打ち消された (図 9)。④ GOLPH3 を発現させた細胞では浸潤能の亢進が見られた。しかし、GOLPH3 発現細胞において PI4 キナーゼ発現抑制によりゴルジ体の PI4P を減少させると浸潤能は抑制された。①~④よりゴルジ体の PI4P 量の変化による上皮間葉転換に GOLPH3 が関与していることが示唆された。そこで、PI4P に結合出来ない GOLPH3 変異体 GOLPH3 R90L を作製して実験を行った。⑤ GOLPH3 の野生型 GOLPH3 wt を発現させた細胞では細胞間接着が減少したが、GOLPH3 R90L を発現させた細胞では細胞間接着の亢進が見られた。⑥ GOLPH3 wt を発現させた細胞で

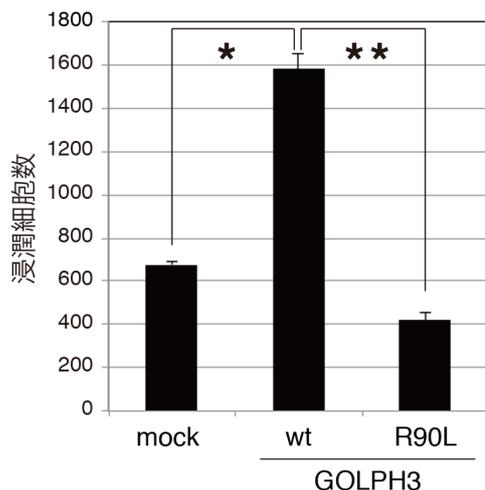


図 10 \* P > 0.005, \*\* P > 0.0005

は運動能および浸潤能の亢進が見られたが、GOLPH3 R90L を発現させた細胞では運動能も浸潤能も亢進は見られなかった (図 10)。⑦ GOLPH3 R90L を発現させた細胞では上皮間葉転換マーカーである SNA12 の発現が減少していた。⑧ GOLPH3 wt を発現させた乳がん細胞株をヌードマウスの尾部に移植したところ、コントロールの乳がん細胞株と比較して肺転移が増加していた。しかし、GOLPH3 R90L を発現させた乳がん細胞株では転移増加は

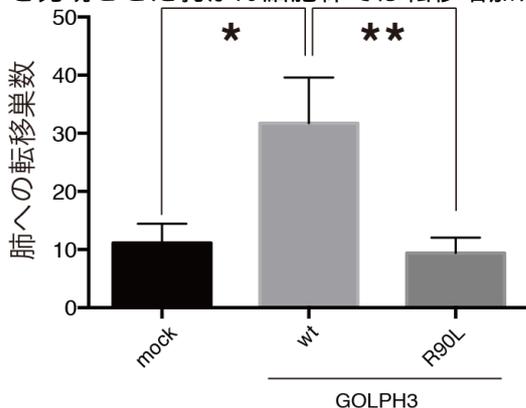
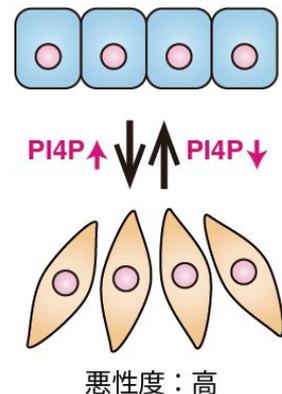


図 11 \* P > 0.04, \*\* P > 0.02

見られなかった (図 11)。⑤~⑧より GOLPH3 によるがんの悪性化制御にはゴルジ体の PI4P が必要であることが明らかになった。(1)~(4)よりゴルジ体の PI4P 量の増減により上皮間葉転換が制御されること、実際ががんの悪性度とゴルジ体の PI4P 量が相関していること、さらにゴルジ体の PI4P による上皮間葉転換制御には PI4P 結合タンパク質である GOLPH3 が関与していることを明らかにした (図 12)。



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)

図 12

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① Emi Tokuda, Toshiki Itoh, Junya Hasegawa, Yukiko Takeuchi, Yasuhiro Irino, Miki Fukumoto, and Tadaomi Takenawa "Phosphatidylinositol 4-phosphate in Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion, and invasive cell migration in human breast cancer" Cancer Research 誌、査読あり、2014 Jun 1;74(11):3054-66、DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2441

〔学会発表〕(計 1 件)

① 徳田恵美、伊藤俊樹、竹縄忠臣、乳がん細胞株においてゴルジ体のイノシトールリン脂質が細胞間接着と細胞運動・浸潤能を制御する、日本細胞生物学会、2013年6月19日~2013年6月21日、ウインクあいち(愛知県)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 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 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

徳田 恵美 (TOKUDA, Emi)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：30598925

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：