

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790284

研究課題名(和文)ネクチン様分子によるヘミデスモソームの崩壊・再形成機構

研究課題名(英文)Regulation by Nectin-like molecules of hemidesmosome disassembly and reorganization

研究代表者

水谷 清人(Mizutani, Kiyohito)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50559177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘミデスモソームは、正常上皮細胞の細胞膜上に散在する細胞-基質間接着構造である。しかしながら、ヘミデスモソームの崩壊と再形成に関わる分子機構については不明な点が多かった。本研究において、1) Necl-4はErbB2/ErbB3シグナルを抑制すること、およびヘミデスモソームの崩壊を抑制することでがん抑制因子として機能すること、2) Necl-4はVEGF受容体とPTPN13と協調して細胞増殖と細胞運動の接触阻害を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hemidesmosomes are one of the cell-extracellular matrix junctions. However, the molecular mechanisms that regulate disassembly and reorganization of hemidesmosomes still remain unclear. In this study, we found that 1) Necl-4 serves as a tumor suppressor by inhibiting the ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly and 2) Necl-4 serves as a regulator for contact inhibition of cell movement and proliferation cooperatively with the VEGF receptor and PTPN13.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヘミデスモソーム インテグリン Necl Necl-4 CADM4 ErbB3 PTPN13 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヘミデスモソームは、正常上皮細胞の細胞膜上に斑点状に散在する細胞 - 基質間接着構造である。細胞 - 基質間接着は細胞が周辺環境を認識するうえで重要であり、生理的には細胞の形態維持、細胞分化、細胞機能制御などに関与している。一方、がん細胞では細胞 - 基質間接着が破壊されて接着能が低下するとともに運動能が亢進し、浸潤・転移する。このような観点から、細胞 - 基質間接着の制御機構を解明することは生物学的にも医学的にも極めて重要である。しかし、ヘミデスモソームの崩壊と再形成に関わる分子機構については不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

ネクチン様分子 (Necl) はファミリーを形成しており、本研究では、Necl による細胞 - 基質間接着の崩壊と再形成を制御する分子機構、および、正常上皮細胞やがん化した細胞での細胞 - 基質間接着の制御機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) Necl-4 によるがん抑制機構

Necl-4 はがん抑制因子として知られていたが、その作用機構は不明であった。そこで、Necl-4 の細胞 - 基質間接着制御機構と細胞内シグナル伝達における役割を検討した。細胞のがん化と関連がある上皮細胞増殖因子受容体 (ErbB) ファミリーと Necl-4 の相互作用を検討し、そのシグナル制御機構の解析を行った。また、Necl-4 はヘミデスモソーム構成因子のインテグリン  $\alpha_6\beta_4$  と結合することが知られていたため、ヒト大腸がん培養細胞株の Caco-2 細胞を用い、TPA 刺激によるヘミデスモソーム様構造の崩壊に対する Necl-4 の影響を検討した。

### 2) 正常組織・細胞における Necl の機能

正常上皮組織におけるヘミデスモソームの形成、維持機構に果たす Necl の機能解明を目的として、ヘミデスモソームが存在する組織、器官を中心に、Necl ファミリー分子 (Necl-1, -2, -3, -4, -5) の発現と局在を蛍光免疫組織染色によって検討した。また、発現が認められた組織、器官、細胞におけるそのような Necl が制御するシグナル伝達機構の解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) Necl-4 によるがん抑制機構

細胞のがん化と関連がある ErbB ファミリーのうち、Necl-4 は ErbB3 とのみ相互作用した。このシグナル制御機構には、タンパク質脱リン酸化酵素 PTPN13 が関与することが明らかとなった。また、Necl-4 はヘミデスモソーム構成因子のインテグリン  $\alpha_6\beta_4$  と結合することが知られていたため、ヒト大腸がん培養細胞株の Caco-2 細胞を用い、TPA 刺激によるヘミデスモソーム様構造の崩壊に対する Necl-4 の影響を検討した。Necl-4 をノックダウンした Caco-2 細胞では TPA 刺激によるヘミデスモソーム様構造の崩壊が速やかに生じ、Necl-4 を過剰発現させた細胞では崩壊が遅くなった。これらの実験結果は、Necl-4 が ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の活性化を抑制し、TPA 刺激依存的なヘミデスモソームの崩壊を抑制することで、がん抑制因子として機能することを示している。

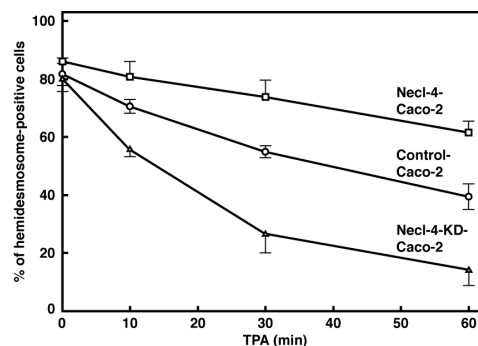


図1. Caco-2細胞におけるTPA刺激依存的なヘミデスモソーム様構造の崩壊へのNecl-4の影響

## 2) 正常組織・細胞における Necl-4 の機能

ヘミデスモソームが存在する組織、器官、細胞における Necl ファミリー分子の局在を蛍光免疫組織染色によって検討したところ、培養血管内皮細胞において、これまで知られていた Necl-5 に加えて Necl-4 が細胞間に局在することが明らかとなった。ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた実験では、Necl-4 は細胞密度依存的にその発現が変化し、細胞の密度が高い場合はその発現が上昇し、PTPN13 を介して血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体のリン酸化を抑制し、細胞の運動と増殖を抑制していた。逆に、細胞密度が低い場合はその発現が低下し、VEGF 刺激依存的な Rac1 の活性化を引き起こし細胞運動が亢進されるとともに、ERK1/2 の活性化を引き起こし細胞増殖が亢進していた。これらのことから、Necl-4 は細胞運動と増殖の接触阻害を調節する因子として機能していることが明らかとなった。

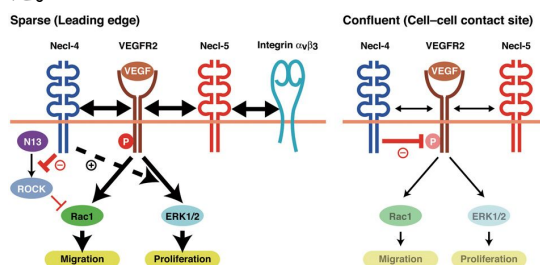


図 2. 細胞密度依存的な Necl-4 と PTPN13 を介した VEGFR2 シグナル制御機構

## 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7件)

1. Yamana, S., Tokiyama, A., Mizutani, K., Hirata, K., Takai, Y., and Rikitake, Y. The cell adhesion molecule Necl-4/CADM4 serves as a novel regulator for contact inhibition of cell movement and proliferation. *PLoS One*, 10: e0124259 (2015), 査読有り  
DOI: 10.1371/journal.pone.0124259

2. Tanaka-Okamoto, M., Itoh, Y., Miyoshi, J., Mizoguchi, A., Mizutani, K., Takai, Y., and Inoue, M. Genetic ablation of afadin causes mislocalization and deformation of Paneth cells in the mouse small intestinal epithelium. *PLoS One*, 9: e110549 (2015), 査読有り  
DOI: 10.1371/journal.pone.0110549
3. Suzuki, T., Mizutani, K., Minami, A., Nobutani, K., Kurita, S., Nagino, M., Shimono, Y., and Takai, Y. Suppression of the TGF- $\beta$ 1-induced protein expression of SNAI1 and N-cadherin by miR-199a. *Genes Cells*, 19: 667-675 (2014), 査読有り  
DOI: 10.1111/gtc.12166
4. Nobutani, K., Shimono, Y., Yoshida, M., Mizutani, K., Minami, A., Kono, S., Mukohara, T., Yamasaki, T., Itoh, T., Takao, S., Minami, H., Azuma, T., and Takai, Y. Absence of primary cilia in cell cycle-arrested human breast cancer cells. *Genes Cells*, 19: 141-152 (2014), 査読有り  
DOI: 10.1111/gtc.12122
5. Sugiyama, H., Mizutani, K., Kurita, S., Okimoto, N., Shimono, Y., and Takai, Y. Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin  $\alpha_6\beta_4$  and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly. *Genes Cells*, 18: 519-528 (2013), 査読有り  
DOI: 10.1111/gtc.12056
6. Minami, A., Shimono, Y., Mizutani, K., Nobutani, K., Momose, K., Azuma, T., and Takai, Y. Reduction of the ST6 $\beta$ -galactosamide  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1)-catalyzed sialylation of

nectin-like molecule 2/cell adhesion molecule 1 and enhancement of ErbB2/ErbB3 signaling by microRNA-199a. *J. Biol. Chem.*, 288: 11845-11853 (2013), 査読有り  
DOI: 10.1074/jbc.M112.405993

7. Momose, K., Minami, A., Shimono, Y., Mizutani, K., Nobutani, K., Azuma, T., and Takai, Y. miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling. *Genes Cells*, 18: 195-202 (2013), 査読有り  
DOI: 10.1111/gtc.12027

〔学会発表〕(計4件)

1. 鈴木俊裕, 水谷清人, 南晶洋, 榑野正人, 下野洋平, 高井義美 マイクロ RNA-199a は TGFβ1 で誘導される SNAI1 と N-cadherin の発現を抑制する(第73回日本癌学会学術総会、2014.9.25、横浜)
2. 下野洋平, 南晶洋, 水谷清人, 信谷健太郎, 百瀬健次, 東健, 高井義美 マイクロ RNA-199a によるネクチン様分子2のシアル化修飾の減少と ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の増強(第72回日本癌学会学術総会、2013.10.4、横浜)
3. 北山美登里, 下野洋平, 信谷健太郎, 水谷清人, 向原徹, 南博信, 古森孝英, 高井義美 ヒト正常乳腺と乳がん組織における細胞接着分子ネクチン、アフアディン、およびネクチン様分子(第72回日本癌学会学術総会、2013.10.5、横浜)
4. 百瀬健次, 下野洋平, 南晶洋, 信谷健太郎, 水谷清人, 東健, 高井義美 大腸がん細胞においてマイクロ RNA-214 は Necl-2 を抑制し ErbB2/ErbB3 シグナル伝達路を活性化する(第71回日本癌学会学術総会、

2012.9.19、札幌)

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院 医学研究科

生化学・分子生物学講座シグナル統合学分野  
病態シグナル学部門

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/ps/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

水谷 清人 (MIZUTANI, Kiyohito)

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号：50559177