

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791165

研究課題名(和文)メラノーマの新しい細胞移動メカニズムの解明

研究課題名(英文)The elucidation of the new mechanism of melanoma cell movement

研究代表者

國本 梨沙(KUNIMOTO, RISA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20468094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：SIRT1はメラノーマ細胞で細胞質に局在し、SIRT1のノックダウンや阻害はマウスやヒトメラノーマ細胞の細胞移動を抑制した。B16F1細胞を皮下移植したマウスにSIRT1阻害薬ニコチンアミドを投与すると腹腔とリンパ節転移が抑制され寿命が有意に延長し、SIRT1をノックダウンした細胞を移植すると浸潤性転移・血行性肺転移が著しく抑制された。

SIRT1は葉状突起に局在しており、ニコチンアミドで成長因子依存性の葉状突起形成が阻害された。この機序はSIRT1阻害薬がホスファチジルイノシトール3,4,5三リン酸の増加を抑制することと関連することを蛍光共鳴エネルギー移動法により明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We found that melanoma cells expressed the NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 in the cytoplasm. Protrusion formation and migration of melanoma cells were inhibited by SIRT1 inhibitors or SIRT1 knockdown, whereas protrusion extension and migration were enhanced by SIRT1 activators. Serum or platelet derived growth factor (PDGF) recruited SIRT1 to the leading edge of the lamellipodia, a characteristic feature at the front of motile cells. SIRT1 inhibition prevented serum, PDGF, or dominant-active Rac1 (RacV12) from inducing lamellipodia in B16F1 melanoma cells. Serum or PDGF increased the phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate level in the leading edge, and this increase was impaired by SIRT1 inhibition. The abdominal invasion of transplanted melanoma cells in mice was suppressed by the SIRT1 inhibitor nicotinamide and SIRT1 knockdown. therapy for melanoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：SIRT1 メラノーマ 細胞移動 癌転移

1. 研究開始当初の背景

アセチル化と脱アセチル化はヒストン、転写因子、糖代謝や脂質代謝酵素など数多くの蛋白質の修飾に使われ、活性の調節を担うことが最近明らかになってきた。蛋白質/ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 は、過剰発現により酵母や線虫などの寿命を延ばす酵母 Sir2 (いわゆる長寿遺伝子産物) のホモログである。

研究者のグループは SIRT1 が神経前駆細胞や成体の心筋細胞では細胞質に局在することを見出し、そのメカニズムとして核局在化と核外局在化シグナルがその一次構造上にあることを報告し (Tanno et al. 2007)、細胞質にある SIRT1 の機能として、神経細胞の伸長を促進することを見出した (Sugino et al.)。一方、胎児脳室神経幹細胞も SIRT1 を細胞質に発現する。SIRT1-shRNA により細胞質 SIRT1 をノックダウンすると幹細胞から分化した神経細胞の大脳皮質への細胞移動が著しく抑制された (Hisahara et al. 2008)。

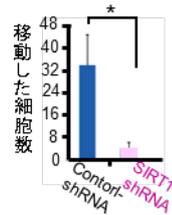
このような背景で、皮膚科医である研究者はメラノーマについての検討を始めた。SIRT1 はメラノーマで高発現しており、さらに細胞質に局在することを見出した。マウスやヒトメラノーマ細胞 (B16F1, B16F10, MM418) で SIRT1 阻害剤 (nicotinamide, sirtinol, splitomicin) が細胞移動を著しく抑制し、活性化薬 (resveratrol, NAD) が細胞移動を促進し、トランスウエル法を用いた検討からメラノーマ細胞の移動は誘引物質として血清が必要であることを明らかとした。レンチウイルス shRNA によるノックダウンから 7 種類あるサーチユインのうち SIRT1 のみが細胞移動に関与した。マウスに移植したメラノーマの腹腔およびリンパ節への転移は SIRT1 阻害薬の nicotinamide が抑制し、nicotinamide の投与は移植したマウスの寿命を有意に延長した。SIRT1 は血清や PDGF 刺激により、細胞移動に必要な突起状構造物のラメリポディアに局在化した。

SIRT1 は細胞死の抑制、酸化ストレスの低下、糖の好氣的代謝の促進、脂肪蓄積抑制、細胞分化の促進や抑制、DNA 修復の亢進などの多彩な機能がある (Finkel et al. Nature 460, 587, 2010)。これまでの研究で細胞移動に関してはほとんど報告されていない。SIRT1 に血管の形成を促進する機能があり、SIRT1 ノックダウンにより血管の出芽による形成と分岐が阻害され (Potente et al. Genes Dev. 21, 2644, 2007)、また、線維芽細胞や乳がん細胞を用いて SIRT1 が cortactin と結合し、細胞移動に関連する cortactin を脱アセチル化することが報告された (Zhang et al. Oncogene 28, 445, 2009)。以上のように現状では細胞移動での SIRT1 機能は不明である。研究者はメラノーマで見出した SIRT1 の細胞移動への作用は血管内皮細胞や線維芽細胞とも共通したメカニズムがあり、さらに neurite の伸長や分岐のメカニ

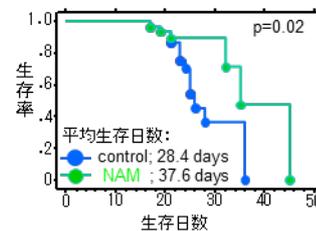
ズムにも関与するのではないかと考えている。

2. 研究の目的

研究者らは蛋白質/ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 がメラノーマ細胞の移動を促進し、SIRT1 抑制は細胞移動を阻害する (下図) ことを世界に先駆けて見出した。



SIRT1 阻害剤はマウスメラノーマの浸潤転移を抑制し寿命を有意に延長した (下図)。



しかし、SIRT1 が関与する細胞移動の分子メカニズムは不明である。そこで、メラノーマ細胞移動における SIRT1 の機能を解明することを本研究の目的とする。特に、SIRT1 のラメリポディア形成への役割、アクチンとの関連、イノシトールリン脂質シグナルや Rac 活性化との関連を明らかとし、SIRT1 が関与する細胞移動のメカニズムを解明する。

(1) SIRT1 と PtdIns(3,4,5)P3 と Rac1

メラノーマ細胞では血清や成長因子刺激により、細胞移動に必要な膜にある突起状の構造物であるラメリポディアが形成される。予備的検討では B16F1 メラノーマ細胞では血清刺激や PDGF、EGF によるラメリポディアの形成が SIRT1 の阻害により著しく抑制された。一方、血清刺激による PI3 キナーゼ下流の Akt のリン酸化は SIRT1 の阻害によって有意に増加した。一般的には細胞移動は PI3 キナーゼの抑制により減少するはずであるが、この結果は全く逆に SIRT1 阻害剤により PI3K の活性化が起きる。この相違点がなぜ起きるかを 2 年間で解決したい。特に、分子の細胞内の局在化がこの問題を解決させるキーとなる可能性を考えており、これを実証したい。まず、確認実験として他の SIRT1 阻害剤 (sirtinol, splitomicin) や SIRT1-shRNA が血清刺激による Akt リン酸化を促進させるか、また、SIRT1 活性化薬の Akt リン酸化に対する影響について調べる。さらに、PI3 キナーゼ活性化の活性の時間的、空間的变化を

Fillip-pm (Sato et al. Nat. Cell Biol. 5, 1016, 2003) を使った FRET 法によって測定し、SIRT1 の阻害剤、活性化剤、過剰発現、ノックダウンの影響を調べる。必要に応じて Rac1 の活性化について同様の手法を用いて検討する。

(2) SIRT1 のラメリポディアへの局在化

予備的検討では血清などの刺激でラメリポディアが形成される際に、SIRT1 がラメリポディアに局在化した。23 年度ではこの局在化を確認するとともに GFP を結合させた SIRT1 を用いてラメリポディアへの局在化を可視化し、その局在化機構を調べる。また、SIRT1 は cortactin と結合していた。SIRT1 局在化における cortactin の機能について、ノックダウンの SIRT1 局在化への影響を調べる。

(3) SIRT1 結合タンパク質の同定

SIRT1 に結合するタンパク質を同定してその機能から SIRT1 の働きを解明する。GST-SIRT1 を用いた pull down 法や FLAG tag を結合させた SIRT1 を B16F1 細胞に発現させ、免疫沈降法によっても結合タンパク質を分離することを試みる。分離した蛋白質を MASS 解析により同定する。SIRT1 結合タンパク質と SIRT1 の関連性、細胞移動への影響、結合蛋白質のアセチル化と脱アセチル化による調節機構等を明らかとする。

これまで細胞移動や極性形成で注目されてこなかった蛋白質のアセチル化をとりあげることが第一の特徴である。アセチル化はリン酸化に並ぶ蛋白質活性調節機構という可能性も言われ(Choudhary et al. Science 325, 834, 2009)、研究は一気に加速して新しい制御機構が次々に広い分野で見つかることから、本研究により細胞の極性形成と移動の分野において全く新しい制御機構を見出し、アセチル化制御の重要性が証明できると考える。

また、ニコチンアミドは人への投与実績があり、今後本実験の成果により、メラノーマ転移の抑制方法の実用化という臨床面への貢献が可能となると考える。

さらに、neurite、axon、dendrite の形成、分岐、伸長のメカニズムにおけるこれまで未解明であるタンパク質アセチル化制御の関与についても明らかにできると考える。

3. 研究の方法

(1) Akt 活性化

血清刺激による PI3 キナーゼ下流の Akt のリン酸化を Western blot 法で検討したところ、SIRT1 の阻害剤によって Akt のリン酸化は有意に増加した。一般的には細胞移動は PI3 キナーゼの抑制により抑制される。そこで、SIRT1-shRNA や複数の SIRT1 阻害剤で同様のことが起きるか、逆に SIRT1 活性化剤ではど

うなるか、リン酸化 Akt 抗体を用いた Western blot の他、細胞免疫染色法でもリン酸化 Akt の分布を検討する。

(2) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) の測定

Akt 活性化は PtdIns(3,4,5)P3 の増加により起きる。B16F1 細胞で PtdIns(3,4,5)P3 が血清や PDGF などの刺激によりどのように変化するかを佐藤らが開発した GRP1 の PH ドメインを使った fillip プローブ (Sato et al. Nat. Cell Biol. 5, 1016, 2003) を用いて、FRET 法で測定する。測定は北海道医療大学歯学部の谷村明彦准教授の指導のもとに北海道医療大学においておこなう。細胞性粘菌や白血球などで観察される PtdIns(3,4,5)P3 の局在変化がメラノーマ細胞においても見られるか、その時間、空間の変化と細胞の極性、ラメリポディア形成、移動の方向性との関連について調べる。次いで、SIRT1 阻害剤存在下での PtdIns(3,4,5)P3 の動態を検討し、SIRT1 阻害による細胞移動阻害との関連を調べる。阻害剤の他、SIRT1-shRNA を発現させ SIRT1 をノックダウンさせた細胞においても同様に検討する。B16F1 細胞では EGF の刺激でもラメリポディアが形成されたが、EGF には細胞移動促進作用は観察されなかった。そこで、EGF による刺激による PtdIns(3,4,5)P3 の時間、空間の変化が血清刺激の場合とどのように異なるか調べる。さらに SIRT1 阻害剤を作用させて、EGF を作用させた場合の PtdIns(3,4,5)P3 の変化についても検討する。

(3) ラメリポディア形成機構

メラノーマ細胞では血清や成長因子刺激によりラメリポディアが形成される。予備的検討では B16F1 メラノーマ細胞では血清刺激や PDGF、EGF によるラメリポディアの形成が SIRT1 の阻害により著しく抑制されることが判明した。確認実験として他の SIRT1 阻害剤 (sirtinol, splitomicin) や SIRT1-shRNA が血清刺激によるラメリポディア形成を抑制するか B16F1 細胞を用いて検討する。また、逆に SIRT1 活性化を促す NAD や resveratrol のラメリポディアの形成に対する影響も検討する。細胞質にある SIRT1 がラメリポディアの形成を促進させるかを細胞質のみまたは核のみに発現するミュータント SIRT1 およびそれぞれのドミネガ型 SIRT1 (Sugino et al. 2010) の過剰発現によって調べる。PC12 細胞でも同様のことが起きるか検討する。

(4) ラメリポディア形成における SIRT1 局在化

予備的検討では血清刺激によるラメリポディア形成において、刺激後 5 min で SIRT1 がラメリポディアの先端部分の膜直下全体に局在化した。そこで、GFP を結合させた SIRT1 を B16F1 細胞に発現させて、血清刺激によるラメリポディアへの局在化の時間、空間変化

を観察する。SIRT1 阻害薬を投与するとラメリポディアの形成自体が阻害されるので、SIRT1 の局在化は観察できない。しかし少数の細胞ではラメリポディアが作られることから、このようなラメリポディアで SIRT1 が局在化しているか調べる。ラメリポディアへの局在化が SIRT1 阻害によって起きる場合には、cortactin 局在化も同様に SIRT1 阻害で抑制されるかを検討する。B16F1 細胞を用いた予備的検討では SIRT1 が cortactin と結合しており、細胞免疫染色法を用いて SIRT1 と cortactin の局在への SIRT1 阻害剤の影響を調べる。PC12 細胞においても NGF 刺激による neurite 伸長時に cortactin が tip に局在化するが、その部分に SIRT1 も局在化しているか、同様に抗体を用いた細胞免疫染色法で明らかとする。常に SIRT1 は cortactin と結合しているか、或いは必要時（血清刺激時、或いは細胞移動が必要なとき）のみに SIRT1-cortactin 複合体が形成されるかを検討する。cortactin は SIRT1 により脱アセチル化されるため (Zhang *et al.* Oncogene 28, 445, 2009)、EGF で標識した活性を持たないドミネガ型 SIRT1 の分子を強制発現させ、その局在変化を調べる。また、PC12 細胞においても NGF 刺激による SIRT1 の局在化変化を調べる。

(5) Rac1 の活性化

B16F1 細胞の細胞移動にはマトリゲルが必要であり、インテグリンによる基質との接着能が必要で、細胞は間葉織遊走をおこなうと考えられる。このような細胞系では Rac/WAVE2/Arp2/3 系が細胞移動に強く関係する。特に Rac1 の活性化は細胞移動のキーとなっており、ラメリポディアの形成に必要である (Hall, Science 279, 509 1998)。そこで、SIRT1 阻害剤の活性化 Rac 形成への作用を GFP-PAK1 蛋白質を用いた pull-down 法を用いて検討する。さらに、Rac1 の活性化に SIRT1 が影響を及ぼす場合には Raichu-Rac1 (Itoh *et al.* Mol. Cell. Biol. 22, 6582, 2002) を用いた FRET 法で Rac1 の時間、空間変化を詳細に調べ、SIRT1 の作用を明らかにする。

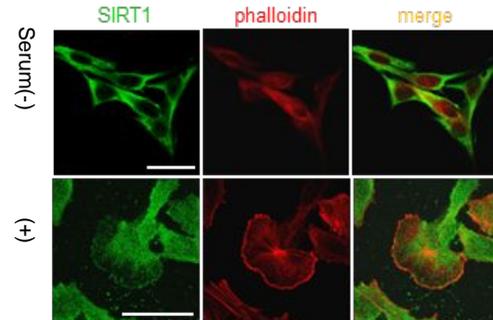
(6) SIRT1 結合タンパク質

大腸菌で発現させた GST-SIRT1 を用いた pull down 法で SIRT1 結合タンパク質をメラノーマ細胞から分離し、MASC 解析により同定する。また、結果によっては flag-tag を結合させた SIRT1 を B16F1 細胞に発現させ、抗 flag 抗体を用いた免疫沈降法によって SIRT1 結合蛋白質を分離することや、脳ホモジネートから SIRT1 結合タンパク質を分離することも試みる。分離したタンパク質のなかで、細胞極性や細胞移動、PtdIns(3,4,5)P3 の生成や分解に関連するものを選び出し、SIRT1 への結合性を個別に確認し、局在、刺激による局在

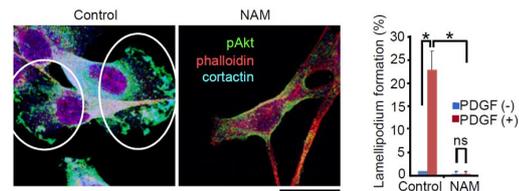
変化、細胞極性形成との関連性、細胞移動への影響を詳しく調べる。

4. 研究成果

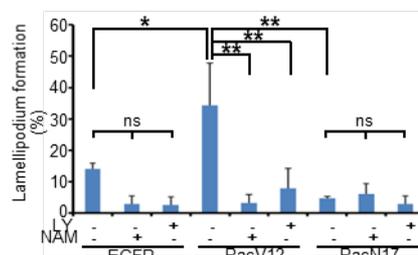
メラノーマ細胞の移動は細胞の突起状構造物であるラメリポディア（葉状突起）が移動方向に向けて作られることにより始まる。

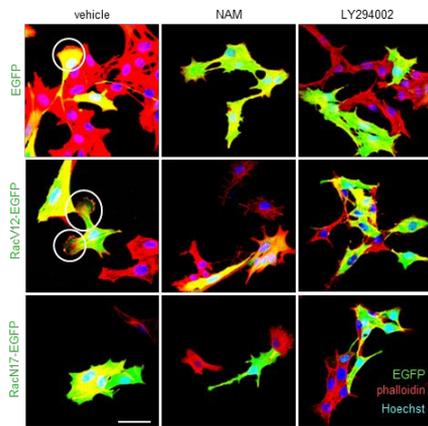


SIRT1 はラメリポディアに局在しており (上図)、ニコチンアミドによる SIRT1 の阻害で血小板由来成長因子 (PDGF) などの成長因子依存性のラメリポディア形成が抑制された。(下図、ラメリポディアの形成とニコチンアミドによるラメリポディア形成阻害。control はニコチンアミド(-)、NAM はニコチンアミド(+)、ともに PDGF 存在下でラメリポディア形成を誘導した。はラメリポディア。NAM 存在下ではラメリポディアが形成されなくなる (Kunimoto *et al.* 2014 より))

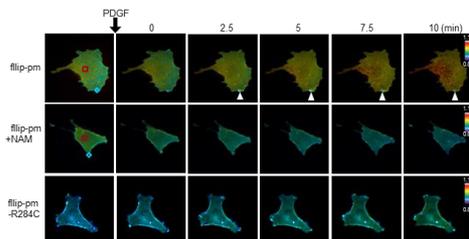


活性型 Rac はラメリポディアを形成させるが、SIRT1 を阻害すると Rac 依存性のラメリポディア形成も阻害された (下グラフ・図: B16F1 細胞に control として EGFP、活性型 Rac として V12、ネガティブコントロールとして N17 をトランスフェクションしラメリポディア形成を調べた。SIRT1 阻害薬であるニコチンアミド投与で活性型 Rac のラメリポディア形成を阻害した。)

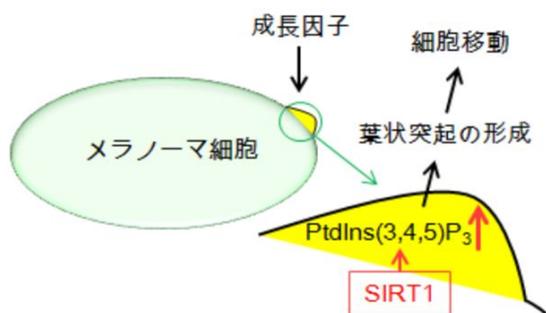




この機序は、SIRT1 阻害薬が PDGF による phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate (PIP₃) 増加を抑制することが関連することを FRET (蛍光共鳴エネルギー移動法) により明らかとした (下図: PIP₃ 濃度の測定を行ったところ、PDGF 刺激により、ラメリポディアの先端で上昇がみられた (Δ)。ニコチンアミドでは抑制された。flip は、PtdIns(3,4,5)P₃ に選択的に結合するプレクストリン相同 (PH) ドメインを含んでいる。R284C はドミネガ型。)



局所での PIP₃ の増加はラメリポディアを形成させることに十分である (Kakumoto & Nakata PLOS One 8, e70861, 2013) ため、SIRT1 阻害でラメリポディアが形成されない理由は膜で PIP₃ が十分に形成されないためと考えられる。以上の結果をまとめると以下のような模式図となる。



GST-SIRT1 融合蛋白質を用いた網羅的な結合蛋白質の探索から SIRT1 が synaptojanin 2 (Synj2) に結合することを見出した (未発

表)。Synj2 は PIP₃ や PIP₂ を脱リン酸化する酵素でエンドサイトーシスに関与しており、活性型 Rac1 と結合すると膜に移動し (Malecz et al. Cur Biol 10, 1383, 2000)、グリオーマ細胞の移動に必要 (Chuang et al. Cancer Res. 64, 8271, 2004) で、さらに転移好性癌細胞に特異的に発現量が増加する (Roesli et al. Cancer Res. 69, 5406, 2009)。だが Synj2 の分子レベルでの働きはよくわかっていない。予備的検討では Synj2 は SIRT1 に結合し、さらに B16F1 細胞で Synj2 をノックダウンするとラメリポディア形成と細胞移動が抑制された。

今後の主な課題は、SIRT1 のラメリポディア形成と細胞移動における役割を Synj2 との関連から明らかにすることである。

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 1 件)

1. Risa Kunimoto, Kowichi Jimbow, Akihiko Tanimura, Masahiro Sato, Kouhei Horimoto, Takashi Hayashi, Shin Hisahara, Toshiya Sugino, Tomohisa Hirobe, Toshiharu Yamashita, Yoshiyuki Horio; SIRT1 regulates lamellipodium extension and migration of melanoma cells. Journal of Investigative Dermatology, 2014 Jan 30. doi: 10.1038/jid.2014.50. [Epub ahead of print], 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國本 梨沙 (KUNIMOTO, Risa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20468094