

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460433

研究課題名(和文)ホスファチジルイノシトールの蛍光イメージングを用いた肺癌細胞の浸潤機構の研究

研究課題名(英文)Study of lung cancer cell invasion mechanism through PtdIns imaging

研究代表者

明石 巧 (Akashi, Takumi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60242202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌の浸潤におけるホスファチジルイノシトール(PIPs)の意義を明らかにするため特異的蛍光プローブの培養肺癌細胞における局在を検索し、間質面のPI4, 5P2の相対的な増加、皮質アクチン線維の局在との相関、基底膜物質が局在制御因子の一つであることを明らかにした。肺腺癌手術材料を用いた検索で浸潤癌における皮質アクチン線維の間質側への局在変位、その基底膜の消失、脈管侵襲、リンパ節転移との相関、予後因子となることを明らかにした。肺癌細胞の浸潤モデルを用いてミオシン阻害薬Blebbistatinによる皮質アクチン線維の収縮阻害によって浸潤が抑制されることを示し、癌の浸潤への関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Alterations in subcellular localization of cortical actin in lung adenocarcinomas and its correlation with metastasis and poor prognosis was clarified by histological examination of surgically resected tissues. In 3D-cultured lung cancer A549 cell spheroids, accumulation of PtdIns(4,5)P2 monitored by GFP-tagged PH-PLCD probe and phosphorylated myosin light chain as well as F-actin were observed. The basement membrane was considered to be one of the regulator of cortical actin accumulation through phosphorylated myosin-mediated contraction and PtdIns(4,5)P2-mediated F-actin assembly. Myosin inhibitor Blebbistatin suppressed 3D collective migration of A549 cells induced by constitutively active Cdc42 and MT1-MMP which suggests the participation of matrix-side F-actin in invasion through myosin-mediated contraction.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 浸潤 アクチン ホスファチジルイノシトール 基底膜

1. 研究開始当初の背景

粘膜内に発生した癌細胞が周囲組織に浸潤する過程の中で、粘膜を裏打ちする基底膜の破壊/消失は初期の重要な過程となり、基底膜の消失は、転移、予後、腫瘍間質の形成と密接に相関する (申請者: J Pathol 1999, 187: 223-8, Jpn J Cancer Res 2001, 92:293-301, Pathobiology 2005, 72:250-9)。癌細胞による基底膜の分解にはアクチン結合分子がプロテアーゼとともに形成する浸潤突起が関与している可能性がある。浸潤突起の構成成分であるアクチン結合分子 cortactin は癌化に伴い間質に面する細胞基底面に局在が変位する極性異常が認められる (申請者 Pathobiology 2011, 78, 10-23)。

ホスファチジルイノシトール (PIPs) は浸潤突起の形成 (PI (3, 4, 5)P3、PI (3, 4P)2) や上皮細胞の極性 (PI (3, 4, 5)P3/基底面、PI4, 5P2/頭頂部の形成) を制御する因子と考えられている (Oikawa 2008, Martin-Belmonte 2008)。しかし PIPs は化学的固定ができず、免疫染色による細胞内局在の検索が困難であり、病態生理学的役割には不明な点が多かった。

2. 研究目的

(1) PIPs 特異的蛍光プローブを用いて培養肺癌細胞における PIPs の局在を可視化する。  
 (2) 極性分子、浸潤突起分子を中心に PIPs と一致する局在を示す分子を探索し、その分子の肺腺癌の浸潤・転移における役割を臨床病理学的な意義を明らかにする。

3. 研究方法

(1) PI (4, 5)P2、PI (3, 4, 5)P3 に特異的に結合する phospholipase Cdelta1 (PLCD1)、Akt の pleckstrin homology ドメインと蛍光蛋白 GFP との融合タンパクを肺腺癌細胞 A549 に発現させ 3 次元培養下での局在を共焦点顕微鏡で検索した。

(2) A549 細胞では PI (4, 5)P2 結合プローブに局在の変化が見られ、アクチン線維がその局在によく一致する分子であった。そこで 109 例の肺腺癌症例のパラフィン切片を用いて beta-actin 抗体を用いてアクチン線維の細胞内局在を免疫組織化学に検索した。

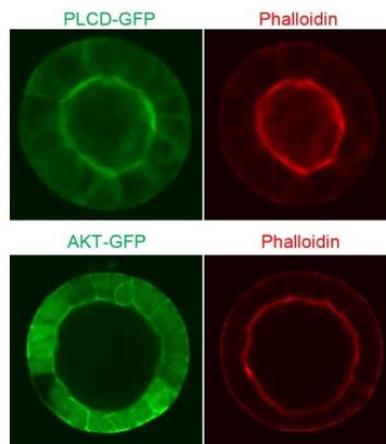
(3) アクチン線維の間質面への局在が浸潤・転移・予後と相関したことから A549 細胞の 3 次元浸潤モデルを用いて間質面のアクチン線維の浸潤における役割を実験的に検討した。

4. 研究成果

(1) PI (4, 5)P2、PI (3, 4, 5)P3 結合プローブ

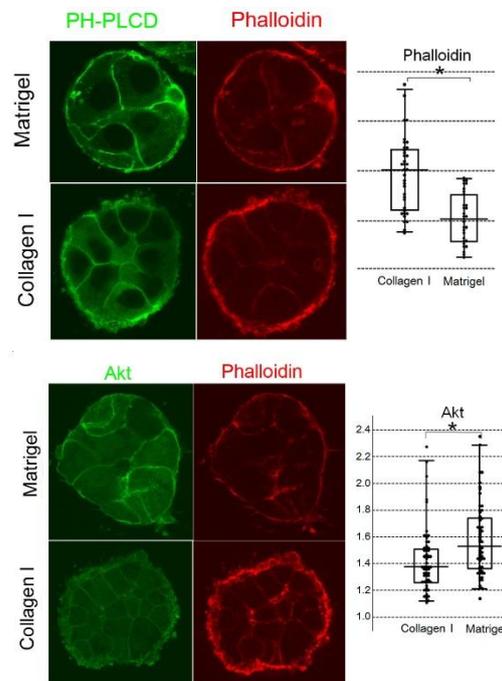
の肺腺癌細胞における局在

基底膜物質マトリゲル内で 3 次元的に培養した大腸腺癌細胞 Caco2 は明瞭な極性形成を示し、PI (4, 5)P2 結合プローブ PLCD-GFP は内腔面優位の局在を示した。PI (3, 4, 5)P3 結合プローブ Akt-GFP は内腔面・間質面にほぼ同等の分布を示した。



3 次元培養した Caco2 細胞における PIP s プローブとアクチン線維の局在

マトリゲル内で培養した肺腺癌細胞 A549 は明瞭な極性形成を示さず、PLCD-GFP、Akt-GFP ともに間質面主体の局在を示した。



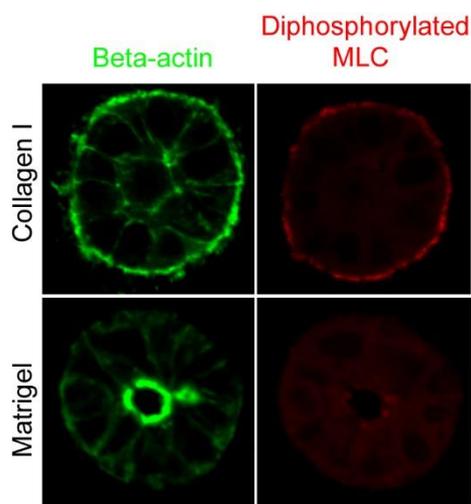
3 次元培養した A549 細胞における PIP s プローブとアクチン線維の局在

この結果から、A549 細胞においては間質面において PI (4, 5)P2 が PI (3, 4, 5)P3 に比して相対的に増加していることが示唆された。

PI (4, 5)P2 はアクチン重合因子 Arp2/3、m-Dial の活性化、アクチン脱重合因子 cofilin の不活性化によりアクチン線維の重合を促進、脱重合を抑制する因子であり、PI (4, 5)P2 の変化がアクチン線維量を制御している可能性が考えられている。そこで Phalloidin を視標にアクチン線維の分布を検索した結果、Caco2 細胞において内腔側優位に認められたアクチン線維が A549 細胞においては間質面優位に PI (4, 5)P2 と一致した局在の変化が認められ、アクチン線維の細胞内分布が PI (4, 5)P2 の視標となりうるということが明らかになった。

I 型コラーゲンゲル内と基底膜物質マトリゲル内で培養した A549 細胞を比較すると、間質面の PLCD-GFP、アクチン線維は基底膜物質内で減少し Akt-GFP の増加が認められ、PI (4, 5)P2/アクチン線維の制御因子の一つとして基底膜物質が考えられた。基底膜物質による PI (4, 5)P2 の変化は PI (3, 4, 5)P3 脱リン酸化酵素 PTEN の局在の変化や PI (4, 5)P2 分解酵素 PLC の活性の変化が制御している可能性が推測される。

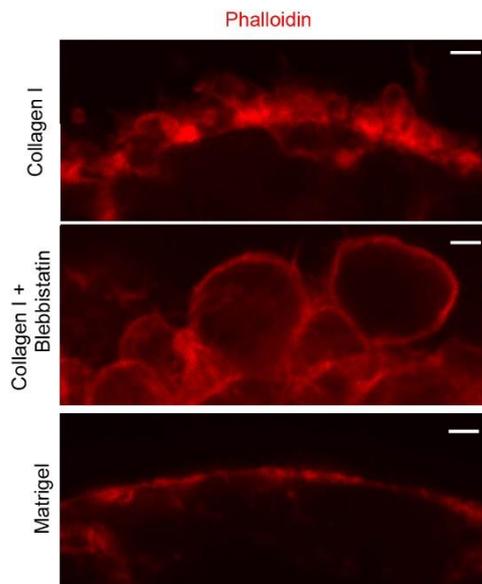
A549 細胞が I 型コラーゲンゲル内で形成する球状コロニーの間質面にはアクチン線維とともにリン酸化ミオシンの集積も認められた。



A549 細胞のリン酸化ミオシンとアクチン線維

超解像蛍光顕微鏡による検索では I 型コラーゲン内では細胞膜の緻密な屈曲が認められ、ミオシン阻害剤 Blebbistatin の存在下では折りたたまれた細胞膜の屈曲の拡張

が認められた。基底膜物質マトリゲル内で



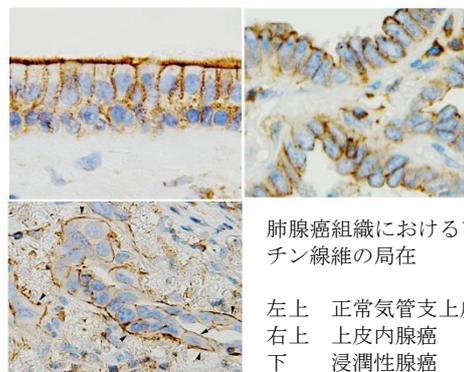
A549 細胞の間質面アクチン線維の超高分像蛍光顕微鏡所見

は細胞膜の屈曲は減少していた。

これらの結果から間質面における皮質アクチン線維の集積はアクチン線維自体の増加に加えてミオシンを介したアクチン線維の収縮による屈曲と緻密化を反映している可能性が示唆された。

## (2) 肺腺癌におけるアクチン線維の細胞内局在の検討

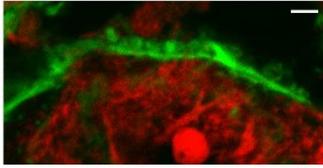
皮質アクチン線維は正常細気管支上皮細胞、II 型肺胞上皮細胞では内腔側、細胞間細胞膜下に局在し、非浸潤癌においても間質側細胞膜下にはほとんど認められなかった。一方、浸潤性腺癌では内腔側、細胞間に加えて間質側細胞膜下にもアクチン線維の局在を認めた。



肺腺癌組織におけるアクチン線維の局在

左上 正常気管支上皮  
右上 上皮内腺癌  
下 浸潤性腺癌

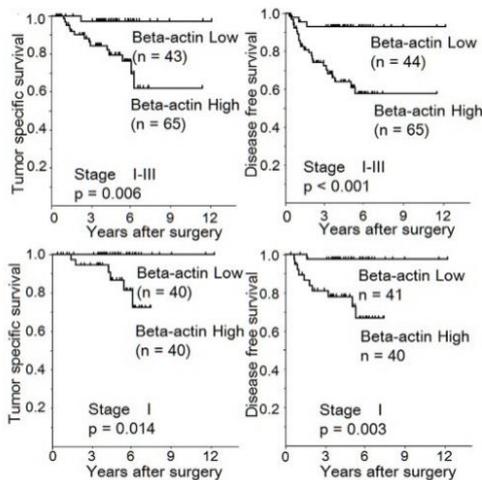
細胞膜の屈曲は肺腺癌組織中においても認めることができた。



肺腺癌組織の間質面アクチン線維の超高解像蛍光顕微鏡所見

間質面のアクチン線維の局在を示す症例は肺胞上皮内癌、微小浸潤性腺癌よりも浸潤性腺癌に有意に多く、病期、リンパ節転移、脈管侵襲と正の相関を示し、生存期間や無病期間も有意に短かった。この結果から、アクチン線維の細胞内分布が癌の浸潤のマーカーとなりえること、予後の予測マーカーとなりえることが明らかとなった。

間質面 アクチン線維	低	高	
pStage			
I	41	40	<0.001
II	2	10	
III	1	15	
pN			<0.001
N0	42	42	
N1	2	8	
N2, N3	0	15	
リンパ管侵襲			<0.001
-	41	34	
+	3	31	
静脈侵襲			<0.001
-	37	33	
+	7	32	
ラミニン消失			<0.001
低	31	5	
高	13	60	

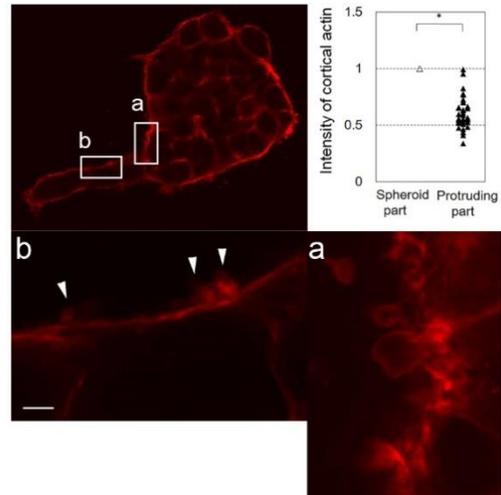


アクチン線維の局在の変化は基底膜物質

ラミニン C1 鎖の消失と有意な相関を示し、局在の制御因子として基底膜物質の可能性が示唆された。

### (3) 3次元浸潤モデルにおける間質面アクチン線維の役割の検討

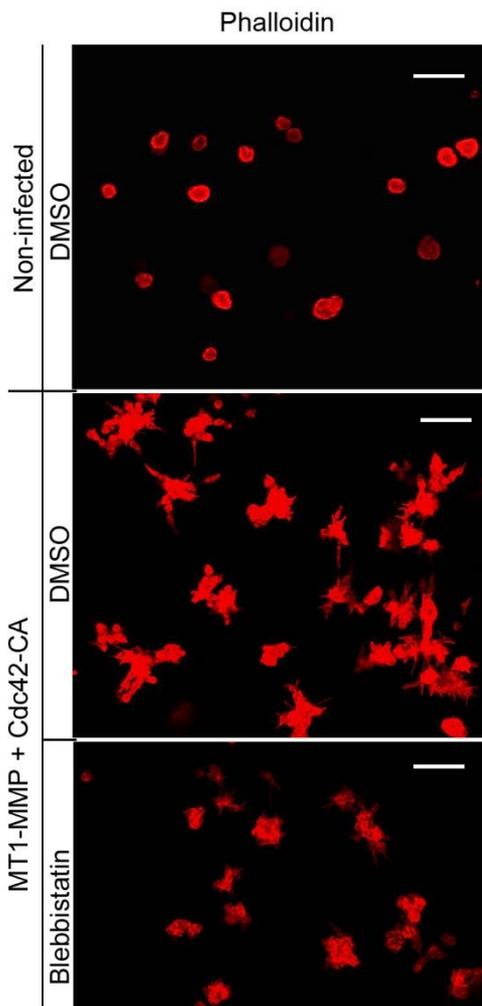
コラーゲンゲル内で3次元的に培養したA549細胞の球状コロニーにレンチウイルスベクターを用いて活性型Cdc42、MT1-MMPを共発現させることによって球状コロニーから周囲への鎖状の浸潤を誘導する浸潤モデルを作製した。浸潤先端側の鎖状浸潤部では後方球状部分に比較して間質面のアクチン線維は減少し、細胞膜は平坦となっていた。この結果からは、先導細胞自体においては間質面の皮質アクチン線維の収縮はむしろ運動/浸潤に対して抑制的に働いている可能性が考えられた。



A549細胞浸潤モデルにおける間質面アクチン線維の超高解像蛍光顕微鏡所見

一方、ミオシン阻害剤Blebbistatinの存在下ではゲル内への鎖状浸潤が有意に抑制されたことから、後方球状部分におけるミオシンを介した皮質アクチン線維の収縮が先導細胞の運動に正に働いている可能性が推測された。

集団型細胞運動において先導細胞では皮質アクチン線維の収縮よりも運動方向へのアクチン線維の伸長が優位となる一方、後方部分の皮質アクチン線維の収縮による集塊内圧の亢進が先導細胞を前方に押し出す力となっており、アクチン線維の伸長と収縮の協調作用が推測された。

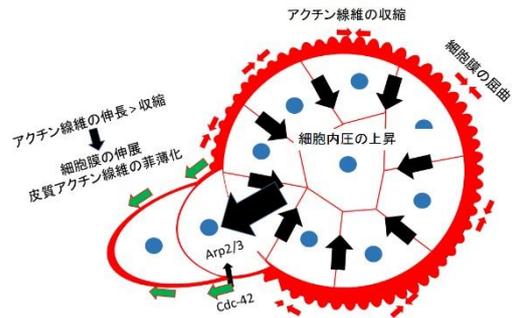


活性型 Cdc42+MT1-MMP 遺伝子導入により誘発された A549 細胞の浸潤性増生(中)に対するミオシン阻害剤 Blebbistatin の抑制効果(下)

#### (4) 総括と今後の展望

本研究では①癌細胞の間質面には PI(4, 5)P2 の増加がみられること②浸潤癌の間質面には PI(4, 5)P2 によって重合が制御される皮質アクチン線維の増加が見られ、癌の浸潤と予後予測のマーカーとなる可能性があること③ミオシンを介した間質面アクチン線維の収縮が集団型細胞運動の駆動力となっている可能性があることを明らかにした。以上の結果を英文誌に投稿中である。

間質面のアクチン線維の集積の機序は基底膜の消失に伴う PI (4, 5)P2 の増加や RhoA-ミオシン経路の活性化による可能性があり、浸潤初期過程にみられる基底膜分解の原因となっているよりはむしろその結果と考えられた。基底膜分解の主因の可能性のある浸潤突起の制御について



PI(3, 4)P2 や RhoGEF/RhoGAP の可能性を検討する必要がある。また他の癌の検索を通じてアクチン線維の局在変化の臨床病理学的意義をさらに明らかにしていく必要があり、今後の検討課題と考えられる。

#### 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)

Distribution of cortical actin in lung adenocarcinoma and its significance in invasion Shohei Tomii, Takumi Akashi, Yoshimi Suzuki, Yoshinobu Eishi Proceedings of the Japanese Society of Pathology, 2016, 105, p377, 査読なし

[学会発表] (計2件)

① 富井翔平, 明石巧, 肺腺癌において間質面に集積した皮質アクチン線維は収縮し浸潤に重要な働きを果たす: 日本病理学会総会、2016. 5, 仙台国際センター(仙台)

② 富井翔平, 明石巧, 肺腺癌における皮質アクチン線維の細胞内局在と浸潤との相関: 日本病理学会総会、2015. 5, 名古屋国際会議場(名古屋)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 巧 (AKASHI TAKUMI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 60242202