

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 17 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870892

研究課題名(和文) 低栄養環境下の腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of macropinocytosis in cancer cells under poor nutritional status

研究代表者

中山 喜明 (Yoshiaki, Nakayama)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40512455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞は低栄養環境へ適応することにより、悪性化が進展することが知られている。その適応機構の解明は、抗がん剤の新たな標的分子を探索する上で重要な課題であるものの、未だ不明な点が多い。本研究では、腫瘍細胞で特徴的に観察されるマクロピノサイトーシスという細胞外液の取り込み現象が、低栄養環境への適応に寄与するものと予測し、その分子機構の解明を試みた。その結果、ある種の腫瘍細胞では、細胞栄養環境の悪化に伴い、細胞外栄養成分の取り込むために、マクロピノサイトーシスを利用していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The adaptation of cancer cells to malnutrition environment leads to malignant progression. The detailed mechanism of adaptation is an important issue to explore a new target molecule for anti-cancer agents. In this study, we focused on macropinocytosis, which is a process of extracellular fluid uptake, and is observed characteristically in tumor cells. We hypothesized that macropinocytosis is involved in the malignant progression, and attempted to clarify its molecular mechanism. The excess addition of sugars or albumin protein suppressed macropinocytosis in certain tumor cells, suggesting that tumor cells may utilize extracellular sugars and proteins by macropinocytosis in response to nutrient environment.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：マクロピノサイトーシス 低栄養環境 腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

固形癌の中心部は血流の循環不全により低酸素・低栄養に曝されており、そのような劣悪な環境での淘汰圧により、悪性度の高い癌細胞が生み出されると考えられる。癌細胞がこれら環境に適応していく分子メカニズムの解明が喫緊の課題である。

マクロピノサイトーシスは直径0.5~2 μm の比較的大きな小胞(マクロピノソーム)を形成するエンドサイトーシスである(図1)。代表的なエンドサイトーシスであるクラスリン依存性エンドサイトーシスとは異なり、被覆タンパク質を必要とせず、細胞骨格であるアクチンフィラメントの活性化を駆動力とした細胞膜のラッピング現象により、細胞外の液相成分や細胞膜受容体等の膜成分を取り込む。しかしながら近年に至るまでマクロピノサイトーシスの指標となるマーカータンパク質が確立されていなかったため、他のエンドサイトーシス経路と比較して、その研究は進んでおらず、その分子機構や調節機構は未だ不明な点が多い(Kerr, et al., (2009) Traffic, 10,364)。正常組織では、マクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞や、神経細胞などの一部の細胞のみがマクロピノサイトーシスを行うのに対し、発癌化した線維芽細胞や多くの腫瘍細胞は恒常的にマクロピノサイトーシスを行うことが報告されている(Veithen, et al., (1996) J Cell Sci, 109,2005)。これらの事実は腫瘍細胞においてマクロピノサイトーシスが独自の生理的役割を果たしている可能性を示唆しているが、今日に至るまで腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスの機能に関する報告はない。

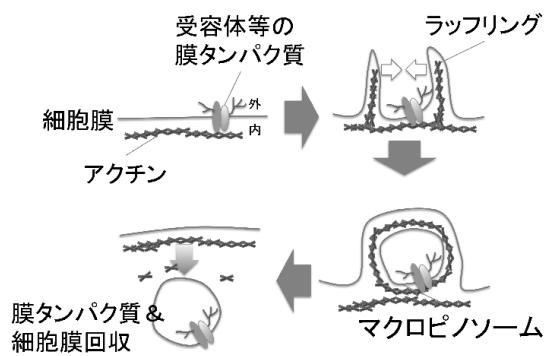


図1 マクロピノサイトーシスのモデル図

2. 研究の目的

本研究はこれまでに得られた知見を進展させ、腫瘍細胞とマクロピノサイトーシスとの関係性について焦点を当て研究を進めていく。ある種の腫瘍細胞は低栄養状態に陥るとマクロピノサイトーシスを亢進することを通じて、(i)より多くの細胞外物質(栄養)を取り込み、さらには(ii)インテグリン輸送の促進により高栄養環境へと細胞移動する可能性が考えられる。本研究ではこれらの可能性を検証する。既知の腫瘍細胞の栄養取り込

み能と、マクロピノサイトーシスやムチン型糖鎖修飾との相関性を解析する。また、種々の腫瘍細胞に対してマクロピノサイトーシス誘導刺激やマクロピノサイトーシス阻害剤を添加することによる、細胞内栄養状態や細胞移動活性の変化を解析し、腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスの生理的意義を明らかにする。さらにマクロピノサイトーシスを調節する細胞内シグナルと、ムチン型糖鎖修飾の標的となるタンパク質の同定を試みる。その際、特に細胞栄養状態や細胞移動に関わる mTOR シグナルやシンデカン、インテグリンに注目し、腫瘍細胞の悪性化に関わる分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスを通じた栄養取り込みの解析

マクロピノサイトーシスによる栄養取り込み量を測定することにより、マクロピノサイトーシスにより取り込まれる栄養成分の分析や栄養取り込みにおける貢献度を解析した。その際、発癌化した線維芽細胞や HEK293T 細胞等を用いて、マクロピノサイトーシスを誘導する EGF 刺激や阻害物質であるアミロリド等でマクロピノサイトーシス量を調節し、各種栄養成分の細胞内取り込み量の定量化を行った。

(2) 栄養環境に対する腫瘍細胞の反応性及び低栄養環境適応機構の解析

腫瘍細胞に対して、培地中の各種成分を改変したものをを用いて低栄養環境や高栄養環境を再現し、マクロピノサイトーシス活性や細胞移動能の解析を行った。その際、蛍光標識デキストランや HRP の取り込み実験、マクロピノサイトーシスに関わることが報告されているアクチンフィラメント、Rab5 や SNX5 などの抗体を用いた免疫染色、さらにはそれぞれの GFP 融合タンパク質等を利用したライブ・イメージングによりマクロピノソーム形成の定量化を行った。

(3) ムチン型糖鎖によるマクロピノサイトーシス調節機構の解析

マクロピノサイトーシス能を有することが知られている HEK293T 細胞やムチン型糖鎖を認識する Jacalin レクチン、EGF 刺激やアミロリド等を用いて、マクロピノサイトーシスを調節する細胞内シグナルと、ムチン型糖鎖修飾の標的となるタンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

研究代表者らは最近、HEK293T 培養細胞株を用いた実験系により、ムチン型糖鎖合成開始酵素 ppGalNAc-T17 が細胞内栄養状態の指標である GlcNAc により誘導され、マクロピノサイトーシスを負に調節することを明らかにした(図2)。この新たな知見は、腫

瘍細胞が栄養状態を維持するために細胞外物質(栄養)の取り込みにマクロピノサイトーシスを利用し、低栄養状態ではその活性を亢進させることにより環境適応している可能性を示唆している。研究代表者は上述した研究に引き続き、予備的な実験ではあるが、マクロピノサイトーシス調節に細胞接着因子であるインテグリンが関わる可能性をこれまでに見いだしている。インテグリンはそれ自身が細胞移動の際にマクロピノサイトーシス経路を通じて古い接着部位から新しい接着部位へと輸送される(Gu, et al., (2011) J Cell Biol, 193, 61)ことや、インテグリンと結合し細胞接着因子として働くシンデカン4がマクロピノサイトーシスを調節する(Elfenbein et al., (2012) Sci Signal, 5, ra36)ことが報告されており、併せて、細胞移動時のインテグリン-シンデカン複合体によるマクロピノサイトーシスの調節機構の存在が示唆される。さらにこの可能性を発展させると、低栄養環境時には、マクロピノサイトーシスはインテグリン輸送を促進し、その結果、移動能が亢進することにより高栄養環境へと細胞移動している可能性も考えられる。詳細な腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシスの機能解明が期待される。

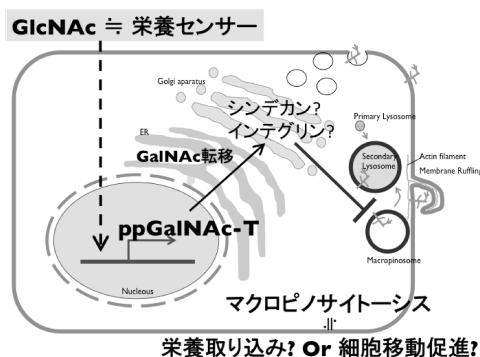


図2 腫瘍細胞におけるマクロピノサイトーシス機構の仮説

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6件)

Masuda, Y., Ohta, H., Morita, Y., Nakayama, Y., Miyake, A., Itoh, N., Konishi, M. (2015) "Expression of Fgf23 in activated dendritic cells and macrophages in response to immunological stimuli in mice." Biological and pharmaceutical bulletin, in press.

Nakayama, Y., Nakamura, N., Kawai, T., Kaneda, E., Takahashi, Y., Miyake, A., Itoh, N., Kurosaka, A. (2014). "Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide-N-acetylgalactosaminyltransferase Y-subfamily genes during embryonic

development." Gene Expression Patterns: GEP. 16(1), 1-7.

Srimontri, P., Endo, S., Sakamoto, T., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Itoharu, S., Hirabayashi, Y., Kato, K. (2014). "Sialyltransferase ST3Gal IV deletion protects against temporal lobe epilepsy." Journal of Neurochemistry, 131(5):675-87.

Nakayama, Y., Wada, A., Inoue, R., Terasawa, K., Kimura, I., Nakamura, N., Kurosaka, A. (2014). "A rapid and efficient method for neuronal induction of the P19 embryonic carcinoma cell line." Journal of Neuroscience Methods, 227, 100-6.

Miyake, A., Chitose, T., Kamei, E., Murakami, A., Nakayama, Y., Konishi, M., Itoh, N. (2014) "Fgf16 is required for specification of GABAergic neurons and oligodendrocytes in the zebrafish forebrain." PLoS One, 9(10):e110836.

Ogawa, M., Nakamura, N., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Many, H., Kanagawa, M., Endo, T., Furukawa, K., Okajima, T. (2013). "GTDC2 modifies O-mannosylated alpha-dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetylglucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody." Biochemical and Biophysical Research Communications, 440(1), 88-93.

[学会発表](計1件)

Nakayama, Y., Kato, K., Nakamura, N., Kurosaka, A. "The roles of a polypeptide GalNAc-transferase/Wbscr17" International Symposium on Glyco-Neuroscience, Awaji (Japan) 2014.1.9-11 (ポスター発表)

[図書](計1件)

Nakayama, Y., Nakamura, N., Tsuji, D., Itoh, K., Kurosaka, A. (2013) "Genetic Diseases Associated with Protein Glycosylation Disorders in Mammals" Genetic Disorders, Maria Puiu (Ed.), ISBN: 978-953-51-08866-3, InTech

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 喜明 (NAKAYAMA, Yoshiaki)
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 40512455

(2)連携研究者

黒坂 光 (KUROSAKA AKIRA)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：9 0 1 8 6 5 3 6

中村 直介 (NAKAMURA NAOSUKE)

京都産業大学・総合生命科学部・講師

研究者番号：3 0 4 2 4 9 6 4