

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830071

研究課題名(和文)脂質ドメインを介したがん化シグナルの制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of the lipid raft-based oncogenic signal transduction

研究代表者

梶原 健太郎 (KAJIWARA, KENTARO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30581102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Srcチロシンキナーゼは正常な細胞機能の制御に重要なタンパク質であるが、一方で様々ながん組織で活性化が認められおり、がん進展に重要なタンパク質でもある。しかしSrcの活性制御機構の全貌はわかっていない。本研究では、活性化Srcの時空間的制御を担うタンパク質Rsp1を見いだした。Rsp1は、正常細胞では脂質ラフトを発信源とするSrcシグナル伝達経路を制御しており、上皮管腔形成を誘導することが明らかになった。また、がん細胞では過剰発現しており、浸潤に関与することが明らかになった。以上の結果から、Rsp1は活性化Srcの時空間的制御を介して、Srcの細胞機能を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The tyrosine kinase Src regulates both normal physiological functions and cancer progression. However, the molecular mechanism of the spatiotemporal regulation of Src is not fully understood. In this study, we identified Rsp1 as a regulator of activated Src in the lipid rafts. In normal cells, Rsp1 coordinately controlled epithelial tubulogenesis through spatiotemporal regulation of the Src signaling pathway. Meanwhile, Rsp1 promoted invasiveness in cancer cells. These findings indicate that Rsp1 controls the diverse functions of Src through the spatiotemporal regulation of activated Src.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Src 脂質ラフト 上皮管腔形成 浸潤

1. 研究開始当初の背景

がん原遺伝子産物 Src は非受容体型チロシンキナーゼであり、脂肪酸修飾によって細胞膜付近に存在している。通常は不活性化調節部位のリン酸化によって、その大部分が不活性化型で存在するが、増殖因子受容体の活性化など様々な外来刺激に応答して活性化し、細胞の増殖や接着、運動などを制御する。また、様々ながん細胞で、Src の発現と活性化の亢進が認められ、その異常な活性化ががんの悪性化形質、浸潤や転移能の獲得の亢進に寄与すると考えられている。また、こうした Src の機能亢進は、それ自体の遺伝子変異によるものではないとされているが、その制御メカニズムの全貌はまだ明らかではない。

当研究室では、Src の活性制御機構に関する研究を進めており、その過程で、Src の負の制御因子である Csk が、コレステロールやスフィンゴ脂質に富む脂質マイクロドメイン (脂質ラフト) に局在する足場タンパク質 Cbp を介して Src の活性を制御することを見いだした (Kawabuchi, *Nature*, 2000)。また、Cbp を介して Src が脂質ラフトに移行するだけでもがん化が抑制されることを明らかにし (Oneyama, *Mol. Cell*, 2008, Oneyama, *Mol. Cell. Biol.*, 2009) Src の活性と機能が細胞膜の局在によって制御されることを提唱してきた。申請者はこれまでに、Src によるがん化に伴う脂質ラフトの構成脂質の質的・量的な変化により Src が脂質ラフト外に移行することでがん化が促進されることを見いだした (Kajiwar, *Biochem J.*, 2014)。また、Cbp と脂質ラフトによる Src の活性制御システムの数理モデル解析に関する研究にも取り組み、Src 活性制御システムの実証を行ってきた (Saitou, Kajiwar, *PLoS One*, 2014)。しかし、以上の解析は主に Cbp を高発現する間葉系細胞を用いたものであり、Cbp の発現レベルが低く、ヒトで最も高頻度のがんが発症する上皮細胞での詳細な解析が重要な課題として残されていた。

2. 研究の目的

がん原遺伝子産物 Src は様々ながん組織でその発現の亢進と活性化が認められ、がん化・がんの悪性化に重要なタンパク質のひとつである。しかし Src の活性制御機構の全貌はわかっていない。本研究では、Src の活性制御機構を空間的、時間的に理解すること、さらにはがん化・がん悪性化との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Src による上皮細胞のがん化誘導を解析するために、イヌ腎臓上皮由来細胞株 MDCK 細胞に Src 活性化誘導システム Src-MER を導入した。MDCK 細胞は上皮細胞の特性である細胞極性を有しており、細胞間接着を維持しながら増殖する。また三次元培養では、内腔構造をもつシストが形成される。Src-MER は、Src

と改変型エストロゲン受容体を融合させたタンパク質で、エストロゲン誘導体により Src の活性化を誘導することができる。MDCK 細胞で Src-MER を活性化させると、がん化に伴う表現型 (細胞形態や運動) の変化が比較的顕在化しやすいことから (Kuroiwa, *JCS*, 2011) 細胞がん化の解析に有用である。

Src-MER によるがん化過程を解析した結果、活性化 Src-MER が脂質ラフトに速やかに集積されることが見いだされた。また、活性化前は Src-MER は細胞内小胞にプールされているが、活性化直後にその多くが形質膜へ移行し、その後時間経過とともにエンドサイトーシスされて細胞内に蓄積する様子が観察された。この時、内在性の Src も挙動を共にすることから、Src-MER 特有の現象ではない。これらの結果から、MDCK 細胞では Src が活性化することによって細胞内をダイナミックに移動し、活性化 Src が脂質ラフトに集積されることが明らかとなった。これは間葉系細胞では見られなかった新規の Src 制御メカニズムであった。以上の先行解析より、Src-MER を導入した MDCK 細胞を用いた解析が、Src の脂質ラフト局在化と細胞がん化との関係を理解するために有用であると考えられる。

4. 研究成果

(1) Src 局在制御タンパク質 Rsp1 の同定
MDCK 細胞に Src-MER を導入して、活性化にともなう Src の細胞内動態を観察した。その結果、Src は活性化後ただちに形質膜に移行することが明らかになった。この時、活性化 Src は脂質ラフト画分に急速に濃縮されることがわかった。これらの結果から、活性化 Src は脂質ラフト内に存在する未知のタンパク質によってリクルートされることが推察された。そこで脂質ラフト内で Src と結合するタンパク質を免疫沈降法で回収し、質量分析で解析した結果、新規タンパク質 Raft-localized Src recruiting protein 1 (Rsp1) を得た。Rsp1 は膜貫通タンパク質で、形質膜に限局して存在していた。また、その細胞内領域には、Src 結合部位と脂質ラフト移行シグナルを有していた。Rsp1 を MDCK 細胞に過剰発現させると、内在性の Src が活性化状態で脂質ラフト内にトラップされた。以上の結果から、活性化した Src は Rsp1 によって脂質ラフト内にリクルートされることが考えられた。

(2) Rsp1 発現に伴う形態変化

Rsp1 を過剰発現する MDCK 細胞をコラーゲン中で三次元培養すると、シストの内腔構造が崩壊し、さらに一部の細胞が異常に伸張した構造に変形した。しかし、脂質ラフトに移行できない変異型 Rsp1 の過剰発現では細胞伸張は観察されなかった。Rsp1-GFP 発現誘導システムを構築して、Rsp1 による MDCK シストからの伸張過程を観察した。その結果、GFP 陽性細胞では活性化 Src が蓄積しており、シ

スト周囲の基底膜と細胞外マトリックスを破壊しながら伸張している様子が観察された。以上の結果から、Rsp1 の過剰発現によって活性化 Src が脂質ラフトに集積すると、細胞外基質の改変を伴う細胞の異常伸張が引き起こされると考えられた。

Rsp1-GFP の過剰発現による細胞伸長は、その発現が続く限り起こる現象であった。伸長した細胞の細胞極性は乱れた状態であり、さらに細胞間接着が弱まっている様子が観察された。この伸長過程では弱い上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が起きていると考えられた。これに対して、細胞伸長後に Rsp1-GFP の発現を抑制すると、細胞極性が回復し、再び内腔構造あるいは管腔構造が観察された。以上の結果から、Rsp1 の発現は細胞伸長と上皮管腔形成のスイッチングに重要であること、その制御に重要な現象は EMT であることが示唆された。

(3) Rsp1 による Src-STAT3 経路の活性化
Rsp1 による細胞伸長の分子メカニズムを理解することを目的として、阻害剤ライブラリー (新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動「化学療法基盤支援活動」より分与) を利用した網羅的解析を実施した。その結果、STAT3 阻害剤の処理によって Rsp1 による細胞伸長が抑制されることを見いだした。さらに、Rsp1 の過剰発現によって、STAT3 が顕著にリン酸化されること、STAT3 ターゲット遺伝子群が有意に増加していることを確認した。また STAT3 活性化によっても、細胞伸長が誘導されることを確認した。以上の結果から、Rsp1 の過剰発現による Src-STAT3 経路が、細胞伸長現象に重要であると考えられた。

(4) がん化・悪性化における Rsp1 の寄与
がん細胞における Rsp1 の発現レベルを解析したところ、乳がん細胞や腎細胞がん細胞など様々ながんで高発現であることを確認した。特に、トリプルネガティブ乳がん細胞 (TNBC) で高発現であり、Src 活性化レベルとの相関も認められた。さらに、The Cancer Genome Atlas (アメリカ NIH) を利用した解析から、Rsp1 の発現レベルと乳がん患者の予後不良との間に相関が認められた。

MDCK 細胞での解析結果から、Rsp1 のがん細胞の浸潤への寄与が想定されたので、TNBC 細胞を用いた in vitro 浸潤解析を行った。その結果、Rsp1 ノックダウンによって、TNBC 細胞の浸潤が有意に抑制された。腎細胞がん細胞を用いた解析でも、同様の結果を得た。以上の解析結果から、Rsp1 はがん細胞の浸潤に関与することが明らかになった。

(5) Rsp1 ノックアウトマウスの解析
Rsp1 の生理的機能を解析するために、Rsp1 ノックアウトマウスを作製した。Rsp1 ホモノックアウトマウスは正常に生まれ、その後の

成育にも異常は認められなかった。また組織の異常も確認されなかった。

本研究成果を総括する。Rsp1 は活性化 Src の時空間的制御を担っており、通常は上皮管腔形成を制御している。しかし、がん細胞では Rsp1 の制御システムが異常になっており、Src の異常活性化を引き起こすことで浸潤に至ると考えられる。実際に Rsp1 の発現レベルは乳がん患者の予後不良と相関が認められている。Rsp1 ノックアウトマウスの発生と成育に異常は認められなかったことから、Rsp1 はがん進展の阻害剤の新たなターゲットになりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Komiya Y, Onodera Y, Kuroiwa M, Nomimura S, Kubo Y, Nam JM, Kajiwara K, Nada S, Oneyama C, Sabe H and Okada M.
The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial-mesenchymal transition.
Oncogenesis, 査読有, 5, 2016, e258
DOI:10.1038/oncsis.2016.59

〔学会発表〕(計 23 件)

河瀬 直之、梶原 健太郎、岡田 雅人
細胞競合における β -catenin 活性化の役割の解析
第 6 回細胞競合コロキウム、2017 年 3 月 16 日、北海道大学医学部学友会館

Ping-Kuan Chen、北野 圭介、梶原 健太郎、岡田 雅人
Cell competition between normal and Src transformed cells

第 6 回細胞競合コロキウム、2017 年 3 月 16 日、北海道大学医学部学友会館

Ping-Kuan Chen、北野 圭介、梶原 健太郎、岡田 雅人

Cellular competition in MDCK with induced Src activation

新学術領域研究 ダイニングコード・細胞競合合同若手ワークショップ 2017、2017 年 1 月 17 日、ホテルコスモスクエア国際交流センター

大倉 寛也、梶原 健太郎、岡田 雅人
Analysis of Src activated cells within the cancer cell population

新学術領域研究 ダイニングコード・細胞競合合同若手ワークショップ 2017、2017 年 1 月 18 日、ホテルコスモスクエア国際交流センター

Shuchismita Basu、梶原 健太郎、阿部 雄一、朝長 毅、岡田 雅人

Identification of new target proteins involved in Src-mediated tumor progression

第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 30

日、パシフィコ横浜
大倉 寛也、梶原 健太郎、石谷 太、藤田 恭之、岡田 雅人
Analysis of Src activated cells within the cancer cell population
第39回日本分子生物学会、2016年12月1日、パシフィコ横浜
梶原 健太郎、岡田 雅人
上皮細胞の形態形成における Src 活性化の時空間的制御
新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会、2016年9月15日、蓼科グラウンドホテル滝の湯
大倉 寛也、梶原 健太郎、岡田 雅人
がん細胞集団内における Src 活性化細胞の逸脱現象の解析
新学術領域研究 細胞競合 第4回領域会議、2016年8月30日、東京大学薬学講堂
大倉 寛也、梶原 健太郎、岡田 雅人
正常およびがん組織における Src 活性化細胞の振る舞い
第8回シグナルネットワーク研究会、2016年5月27日、大阪大学微生物病研究所
大倉 寛也、岡田 雅人、梶原 健太郎
がん細胞集団内における Src 活性化細胞の逸脱現象の解析
第5回細胞競合コロキウム、2016年3月17日、北海道大学医学部学友会館
梶原 健太郎、岡田 雅人
上皮細胞の形態形成における Src 活性化の時空間的制御
蛋白研セミナー Mechanism of Biology on the Membrane 生体膜上の生物化学、2016年3月3日、ホテル阪急エキスポパーク
久保 祐貴、小宮 優、梶原 健太郎、岡田 雅人
TGF- 依存的な上皮間葉転換に伴う Src の発現誘導/Upregulation of Src during TGF- induce epithelial-mesenchymal transition
第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド
大倉 寛也、梶原 健太郎、石谷 太、藤田 恭之、岡田 雅人
Analysis of Src-induced cell competition in cancer cells
第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド
大野 理沙、北野 圭介、梶原 健太郎、岡田 雅人
Analysis of interaction between Src-activated cells and normal cells
第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド
田中 健太郎、梶原 健太郎、名田 茂之、岡田 雅人
ユビキチン化を介する Src がん遺伝子産物の選別機構
第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1日、神戸ポートアイランド

梶原 健太郎
上皮細胞の形態形成における Src 活性化の時空間的制御
東京大学医科学研究所 共同研究拠点平成 27 年度若手研究者シンポジウム、2015年12月15日、東京大学医科学研究所
Ohno R, Kitano K, Kajiwara K and Okada M
Analysis of interaction between Src-activated cells and normal cells
1st International Symposium on Cell Competition-Cell Competition in Development and Cancer、2015年9月10日、Shiran Kaikan, Kyoto University
梶原 健太郎、岡田 雅人
上皮形態形成における Src 活性化の時空間的制御
第7回シグナルネットワーク研究会、2015年6月21日、沖縄科学技術大学院大学
梶原 健太郎、岡田 雅人
上皮細胞の形態変化における Src 活性化の意義
第4回細胞競合コロキウム、2015年3月13日、定山溪ホテル
Kajiwara K and Okada M
Spatiotemporal regulation of Src in epithelial morphogenesis
2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 2015年1月23日、The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
① 梶原 健太郎、岡田 雅人
Src 活性化による上皮細胞の形態変化
新学術領域研究 細胞競合 第2回領域会議、2015年1月13日、門司港ホテル
② 梶原 健太郎
上皮細胞の形態形成における Src 活性化の時空間的制御
愛媛大学大学院医学系研究科第56回分子病態医学セミナー、2015年1月7日、愛媛大学大学院医学系研究科
③ 梶原 健太郎、岡田 雅人
Src 持続的活性化による細胞の異常伸長
新学術領域研究 修飾シグナル病 若手ワークショップ、2014年10月1日、湯河原温泉ホテルあかね

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 健太郎 (KAJIWARA, Kentaro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30581102