

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04719

研究課題名(和文)カドヘリン特異的エンドサイトーシスによる癌細胞の集団的移動の制御機構と意義の解明

研究課題名(英文) Mechanisms and significance of collective cancer cell migration mediated by cadherin-specific endocytosis

研究代表者

榎本 篤 (Enomoto, Atsushi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20432255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：個体発生や癌の浸潤において多くの細胞は集団を形成して移動することが知られており、「細胞の集団的移動」と呼ばれている。本研究では、神経芽細胞の集団的移動に必須であるアクチン結合分子Girdinが癌細胞の集団的移動にも重要な分子である可能性について検証した。Girdinの新規結合分子として β -cateninを同定し、本分子複合体が癌細胞の集団的浸潤に重要であることを複数の実験モデルを用いて証明した。また皮膚癌の病理組織標本を用いた検証では、Girdinの発現は β -cateninや細胞間接着分子E-cadherinの発現レベルと相関を示し、Girdin複合体の生物学的意義を示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：Pathological observations show that cancer cells invade the surrounding stroma in collective groups rather than through single cell migration. We studied the role of the actin-binding protein Girdin in collective cancer cell migration. We found that Girdin was essential for the collective migration of the skin cancer cell line A431 on collagen gels as well as their invasion in an organotypic culture model. We provide evidence that Girdin binds to β -catenin that plays important roles in E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. Girdin-depleted cells displayed scattering and impaired cell-cell adhesion. Girdin depletion led to impaired cytoskeletal association of the β -catenin complex, which was accompanied by changes in the supracellular actin cytoskeletal organization. Finally, we showed the significance of Girdin expression in the progression of human skin cancer. Collectively, our results suggest that Girdin is an important modulator of the collective behavior of cancer cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：集団的移動 集団的浸潤 癌 Girdin アクチン細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

個体発生や癌の浸潤において、多くの細胞は個別的ではなく集団を形成して移動することが知られており、「細胞の集団的移動 (collective migration)」と呼ばれている。私達は過去の研究で、神経芽細胞の集団的移動に必須であるアクチン結合タンパク質 Girdin を同定し、同分子が癌細胞にも高発現して浸潤を促進する分子であることを明らかにしてきた。また最近、Girdin が細胞間接着においてカドヘリン特異的な取り込み (エンドサイトーシス) を制御する分子であることも報告した。以上の研究結果により、神経芽細胞・癌細胞に限らず集団的に移動する細胞群は、その細胞間接着の強度を適度に調節することによってお互いを足場にして移動するのではないか、という仮説を得るに至った。

2. 研究の目的

本研究では上記仮説と申請時に得られていた予備的実験データをもとに、Girdin による集団的細胞移動の制御機構と癌進展における意義の解明を目的とする。

- (1) Girdin 依存的なカドヘリン特異的エンドサイトーシスによる集団的細胞移動の制御機構を解明する。
- (2) 上記で得られた細胞生物学的知見をもとに、カドヘリン特異的エンドサイトーシスの阻害が癌の集団的浸潤に与える影響を検証する。
- (3) 病理組織標本を用いて、Girdin による癌の集団的浸潤の意義を検証する。

3. 研究の方法

- (1) Girdin 依存的なカドヘリン特異的エンドサイトーシスによる集団的細胞移動の制御機構

本研究の申請時まで Girdin がカドヘリン特異的エンドサイトーシスを制御していることを明らかにしている (Weng et al., EMBO J, 2014)、上記仮説に基づき、本機構が細胞の集団形成あるいは集団的移動に及ぼす影響について細胞生物学的手法を用いて明らかにする。お互いを足場にした集団的移動をライブイメージングで観察し、Girdin の発現抑制が与える影響を調べることによって、カドヘリン特異的エンドサイトーシスの重要性を検証する。また申請時の時点で Girdin の新規結合タンパク質として α -catenin および β -catenin を同定している。本結合の詳細な生化学的特性を明らかにし、同複合体が細胞の集団的移動に与える影響について上

記と同様の方法で検証する。

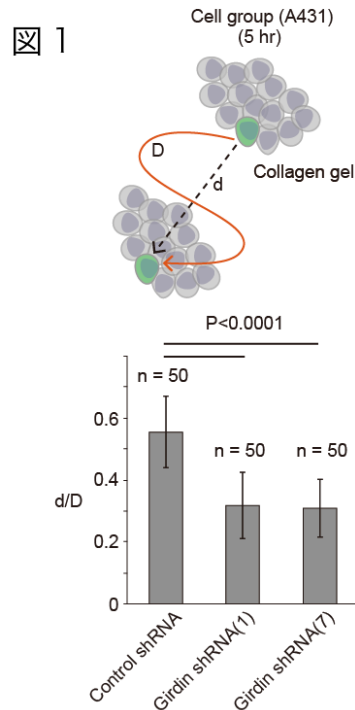
- (2) カドヘリン特異的エンドサイトーシスの阻害が癌の集団的浸潤に与える影響

上記検討に基づいて、カドヘリン特異的エンドサイトーシスの制御機能を欠失した変異体 Girdin の作出を試みる。次いで、本変異体を癌細胞内に導入することによって培養ディッシュ上の細胞集団形成およびマウス個体に移植した際の集団的細胞浸潤に与える影響を検討する。

- (3) 集団的浸潤が観察される癌の代表として扁平上皮癌が挙げられる。扁平上皮癌の例として皮膚癌を選定し、本研究では皮膚癌における Girdin とその結合分子群の発現を検証し、癌の進展および分化度との相関を調べることによって、Girdin 分子複合体の臨床的意義を検証する。

4. 研究成果

- (1) 最初に、細胞の集団的移動を生体外 (in vitro) でイメージングするための実験モデルの構築を試みた。共同研究者のサポートにより、コラーゲンゲル上で癌細胞 A431 を培養することにより集団的移動を観察することに成功した。Girdin を shRNA 発現系を用いてノックダウンした A431 細胞をコラーゲンゲル上に播種し、これをライブイメージングに供した。Girdin の発現抑制により集団的移動が抑制されることを見出した (図 1)。



Girdin 発現抑制が癌細胞の集団異同にあたる影響。上段はコラーゲンゲル上に播種した A431 細胞の集団移動の評価法を示す。正味の移動距離を実際の移動距離で乗じた。下段はその定量データを示す。Girdin を発現抑制した場合に集団移動が障害されている。

また Girdin と α -catenin および β -catenin の結合を免疫沈降および蛍光免疫染色で示した。結合領域のマッピングを行い、Girdin の C 末端ドメインと、 β -catenin の N 末端ドメインが直接結合することを示した。Girdin の C 末端ドメインは複数のキナーゼでリン酸化されることが知られている。そこで各キナーゼが Girdin/ β -catenin の結合に与える影響を検証した。Akt の活性化変異体、Cdk5 と p25 の活性化複合体、Src の活性化変異体を導入したが、いずれのキナーゼの活性型の過剰発現も上記結合に影響を与えなかった。細胞を EGF (上皮成長因子) で刺激した場合も Girdin/ β -catenin の結合に対する影響が観察されなかった。

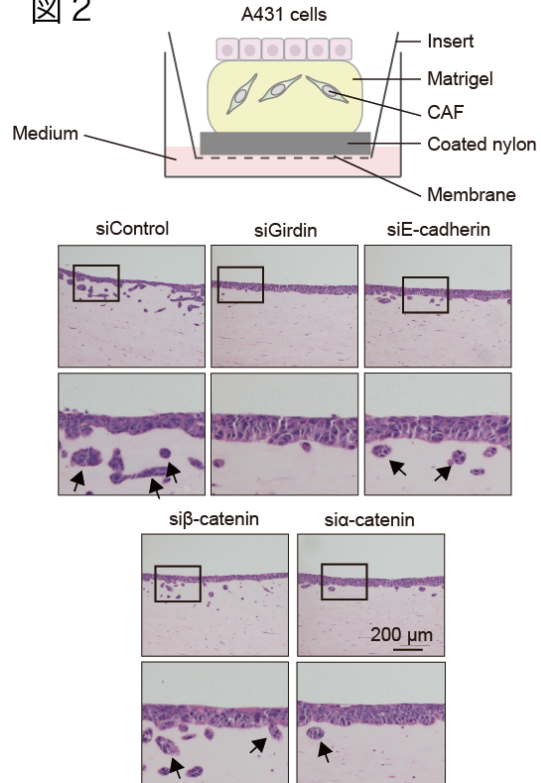
また、Girdin およびその結合分子群をノックダウンした際に細胞間接着の強度に与える影響をカルシウムキレート剤の有無によって細胞凝集塊の量を検証する Cell dissociation assay によって検証した。その結果、Girdin/ β -catenin の結合が細胞間接着の強度に重要であることが判明した。

また、細胞分画を調べると、Girdin の発現抑制によって β -catenin、E-cadherin あるいは α -catenin の細胞膜上への発現量が減少していることが判明した。本結果により Girdin は E-cadherin/catenin 複合体が細胞膜上に存在するために重要な分子であることが明らかとなった。

(2) 前述のように Girdin/ β -catenin の結合を制御するキナーゼの同定に難渋したため、 β -catenin との結合能を欠く Girdin 変異体の作出も難渋した。本検討の途中で、 β -catenin の N 末端ドメインを細胞に過剰発現させると、内因性の Girdin/ β -catenin の結合が競合的に阻害されることを見出した。そこで、 β -catenin の N 末端ドメインの過剰発現がコラーゲンゲル上での集団的移動に与える影響を検証した。その結果、 β -catenin の N 末端ドメインの過剰発現により、集団的移動が阻害されることが明らかとなった。

癌の集団的浸潤を観察するもう一つの実験モデルとして organotypic culture を共同研究者の助言を得て確立した。マトリゲル内に癌関連線維芽細胞を埋入し、その上層に A431 細胞を播種し、トランスウェルのインサート上で気相培養したところ、癌細胞の集団的浸潤が観察された。Girdin あるいはその結合分子群を発現抑制した癌細胞を播種したところ、いずれも集団的浸潤の程度が減弱することを確認した (図 2)。

図 2



Girdin 発現抑制が癌細胞の集団異同にあたる影響をオルガノイド培養で証明した。上段は癌関連線維芽細胞を混じるマトリゲル上で A431 細胞を気相培養した場合にゲル内に集団浸潤する実験系を示す。下段は実験データを示す。Girdin あるいは E-cadherin 複合体の構成要素を発現抑制した場合、癌細胞集団のゲル内への浸潤が障害されることを見出した。

(3) 皮膚扁平上皮癌の病理組織標本を用いて、Girdin およびその結合分子群の発現を検証した。病理組織標本については名古屋大学医学部附属病院皮膚科における手術検体のほか、購入した組織アレイを用いて行われた。Girdin の発現と β -catenin、E-cadherin あるいは α -catenin の発現の間に相関が観察され、癌の進展における Girdin 分子複合体の意義を示唆する結果であった。一方、癌の進展を示す各種指標 (進展の深さ) との相関は観察されなかった。癌の分化度との相関は観察され、Girdin の高発現群では、扁平上皮癌の分化度が高い傾向が観察された。分化度の高い扁平上皮癌は、低分化型に比して集団的浸潤をきたしやすいと推定され、高分化型扁平上皮癌の浸潤における Girdin 分子複合体の意義が示唆される結果であった。

以上の生化学的データ、細胞生物学的データおよび組織標本を用いた検証により、Girdin は E-cadherin 複合体の機能および局在を制御することにより、癌細胞の集団的浸潤を制御している可能性が示唆された。Girdin ノックアウトマウスでは脳室下帯で生じる神経芽細胞の集団的移動が顕著に障害されている。本結果から、神経芽細胞と癌の集団

的移動に共通するメカニズムが存在することも示唆された。

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 Shiraki Y, Mii S, Enomoto A, Momota H, Han YP, Kato T, Ushida K, Kato A, Asai N, Murakumo Y, Aoki K, Suzuki H, Ohka F, Wakabayashi T, Todo T, Ogawa S, Natsume A, Takahashi M. Significance of perivascular tumour cells defined by CD109 expression in progression of glioma. *J Pathol*, 243:468-480, 2017. doi: 10.1002/path.4981. 査読有
- ② Takagishi M, Sawada M, Ohata S, Asai N, Enomoto A, Takahashi K, Weng L, Ushida K, Ara H, Matsui S, Kaibuchi K, Sawamoto K, Takahashi M. Daple coordinates planar polarized microtubule dynamics in ependymal cells and contributes to hydrocephalus. *Cell Rep*, 20:960-972, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.089. 査読有
- ③ Han YP, Enomoto A, Shiraki Y, Wang SQ, Wang X, Toyokuni S, Asai N, Ushida K, Ara H, Ohka F, Wakabayashi T, Ma J, Natsume A, Takahashi M. Significance of low mTORC1 activity in defining the characteristics of brain tumor stem cells. *Neuro Oncol*, 19:636-647, 2017. doi: 10.1093/neuonc/now237. 査読有
- ④ Sunagawa M, Mii S, Enomoto A, Kato T, Murakumo Y, Shiraki Y, Asai N, Asai M, Nagino M, Takahashi M. Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice. *Oncotarget*, 7:82836-82850, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12653. 査読有
- ⑤ Itoh N, Enomoto A, Nagai T, Takahashi M, Yamada K. Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: the role of Girdin in the CNS. *Rev Neurosci*, 27:481-90, 2016. doi: 10.1515/revneuro-2015-0072. 査読有
- ⑥ Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. Identification of Mefflin as a potential marker for mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*, 6:22288, 2016. doi: 10.1038/srep22288. 査読有

- ⑦ Wang X, Enomoto A, Asai N, Kato T, Takahashi M. Collective invasion of cancer: Perspectives from pathology and development. *Pathol Int*, 66:183-92, 2016. doi: 10.1111/pin.12391. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① 高橋 雅英、高岸 麻紀、榎本 篤、浅井 直也：細胞骨格制御因子 Girdin および Daple の機能と疾患。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、ワークショップ「細胞骨格により制御される転写と細胞機能：細胞形質転換と疾患」、神戸、2017 年 12 月 6 日
- ② 白木 之浩、三井 伸二、浅井 直也、榎本 篤、百田 洋之、夏目 敦至、若林 俊彦、高橋 雅英：脳腫瘍マウスモデルにおけるテモゾロミド感受性に対する CD109 の機能解析。第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 30 日
- ③ Xiaoze Wang, Atsushi Enomoto, Liang Weng, Naoya Asai, Masahide Takahashi : Girdin regulates the collective migration of cancer cells by interacting with beta-catenin/alpha-catenin. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 28 日
- ④ 江崎 寛季、大川 祐樹、橋本 登、津田 祐介、大海 祐介、ブイヤ ロビウル、古谷 典弘、本家 孝一、榎本 篤、高橋 雅英、古川 圭子、古川 鋼一：ガングリオシド GD2 は中性アミノ酸トランスポーターASCT2 と協調的に働き小細胞肺がんの悪性形質を亢進させる。第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 28 日
- ⑤ 平野 雅規、ランジット メリッサ、山道 茜、青木 恒介、大岡 史治、加藤 琢哉、榎本 篤、高橋 雅英、若林 俊彦、夏目 敦至：RET finger protein の発現抑制に関連した super-enhancer 異常により glioblastoma の化学療法抵抗性が改善される。第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日
- ⑥ 原 昭壽、榎本 篤、室原 豊明、高橋 雅英：Meflin/Isr は心臓線維化における筋線維芽細胞起源のマーカーである。第 106 回日本病理学会総会、東京 (京王プラザ)、2017 年 4 月 28 日
- ⑦ 川崎 朋範、中井 登紀子、市原 周、長谷

川 正規、岩越 朱里、榎本 篤、佐藤 朋子、浅井 昌美、西川 恵理、大林 千穂：癌性リンパ管症を呈した乳腺神経内分泌腫瘍. 第106回日本病理学会総会, 東京(京王プラザ), 2017年4月29日

⑧ 三井 伸二、砂川 真輝、榎本 篤、村雲 芳樹、椰野 正人、高橋 雅英：慢性皮膚炎症を伴う CD109 ノックアウトマウスにおいて皮膚腫瘍形成は抑制される. 第106回日本病理学会総会, 東京(京王プラザ), 2017年4月27日

⑨ 白木 之浩、三井 伸二、榎本 篤、高橋 雅英：ヒト glioma における CD109 の発現. 第106回日本病理学会総会, 東京(京王プラザ), 2017年4月27日

⑩ 榎本 篤：がんの間質における間葉系幹細胞マーカーMeflin の発現とその機能解析. 第2回メカノバイオロジー学会, 京都(京都大学農学部), 2017年3月14日

⑪ 榎本篤、翁良、韓一梵、浅井直也、三井伸二、高橋雅英：脳腫瘍幹細胞における mTORC1 活性制御とその分子機構の解析. 第62回日本病理学会秋期特別総会, 金沢, 金沢市文化ホール, 2016年11月11日

⑫ 高橋雅英、榎本篤、浅井直也：Role of Akt-Girdin signaling in cancer progression. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月6日(シンポジウム「Key signal transduction pathways in cancer development」)

⑬ 牧原弘幸、田中宏樹、後藤英仁、猪子誠人、榎本篤、稲垣昌樹：Aneuploidy and premature aging in vimentin phospho-deficient mice (ビメンチンリン酸化不全マウスにおける染色体異数性と早期老化). 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月7日

⑭ 三井 伸二、砂川真輝、榎本 篤、村雲芳樹、椰野正人、高橋 雅英：Supression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice with chronic skin inflammation (慢性皮膚炎症を伴う CD109 ノックアウトマウスにおいて皮膚腫瘍形成は抑制される). 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月7日

⑮ 白木 之浩、砂川 真輝、三井 伸二、浅井直也、榎本 篤、百田 洋之、夏目 敦至、若林 俊彦、高橋 雅英：Immunohistochemical analysis of CD109 expression in human lower grade glioma (Lower grade glioma における免

疫組織化学染色での CD109 の発現は、予後と相関する). 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月7日

⑯ Liang Weng, Yipeng Han, Atsushi Enomoto, Yasuyuki Kitaura, Naoya Asai, Yoshiharu Shimomura, Masahide Takahashi : Amino acid signaling is desensitized by MAPK-mediated regulation of the 4F2hc-Girdin complex. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月8日

[その他]

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0077660/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎本 篤 (ENOMOTO ATSUSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20432255

(2)研究分担者 なし