

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08142

研究課題名(和文)細胞生物学的視点からの脱皮機構解析：脱皮阻害剤の作用機序解明とその応用

研究課題名(英文) Molting analysis based on the view of cell biology: mode of action of molting inhibitors and its application

研究代表者

林 謙一郎 (Hayashi, Ken'ichiro)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90238105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換[EMT]は上皮細胞が運動・増殖能に富んだ筋線維芽細胞に形質転換する現象で化症やガンの転移・浸潤と深く関わる。

昆虫の脱皮過程初期に、表皮真皮細胞は扁平状から円柱状に変化する。この仮定で表皮真皮細胞はEMT的变化により細胞運動能が亢進するが、脱皮阻害殺虫剤benzoyl phenyl urea (BPU)はこの変化を阻害することで脱皮を妨げるという仮説を立てた。この仮説の検証をホニユウ動物由来の培養細胞で検証した結果、BPUの類縁体は筋線維芽細胞の機能発現を阻害しガン細胞の浸潤及び加齢黄斑変性の要因である網膜色素上皮細胞のEMTを抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でこれまで殺虫剤として使用されてきたBPUが筋線維芽細胞の機能発現に起因する疾患(線維化やガンの転移・浸潤)に向けた創薬研究のシードに成りうることを明らかにした。線維化は慢性的炎症反応による線維増殖組織の発達(コラーゲン等の細胞外基質の過剰産生により形成)に起因し、正常な臓器・器官の機能障害を起こす。肝硬変や肺線維症が線維化疾患として良く知られているが、加齢黄斑変性(AMD)等の網膜変性疾患も網膜組織の線維化疾患である。

高齢化社会が進むに伴いAMD患者の増加が予想される。BPU類縁体はAMDの進展を抑制するため、新たなAMDに向けた予防・治療薬として発展する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Benzoyl phenyl ureas (BPUs), insect molting inhibitors, are well known insecticide. The mode of action of BPUs has been revealed to be the inhibition of chitin synthesis.

At the early stage of insect molting, the phenotype transition of dermoepidermal cells occurs. During this process, the dermoepidermal cells proliferate and cause morphological change from squamous cell to columnar-shaped cell. We speculated that epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like phenotypic modulation occurs at this early stage and this change promotes the molting, and we also hypothesized that BPUs may suppress this change. Based on this hypothesis, we examined this possibility using mammalian culture cells. As a result, BPU derivatives significantly suppressed the collective invasion of cancer cells mediated by cancer associated fibroblasts and the EMT of retinal pigment epithelial cells, which is the cause of the onset of retinal degenerative disease, age-related macular degeneration (AMD).

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：benzoyl phenyl urea 筋線維芽細胞 線維化症 ガン浸潤転移 網膜変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換[Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)]は上皮細胞が運動・増殖能に富んだ筋線維芽細胞に形質転換する現象で線維化症の発症・進展やガン細胞の転移・浸潤と深く関わる。本研究立案に当たり、昆虫の脱皮過程初期に表皮真皮細胞はEMT的变化により細胞運動能が亢進するが、脱皮阻害殺虫剤 benzoyl phenyl urea (BPU)はこの変化を阻害することで脱皮を妨げるという仮説を立てた。根拠としてBPUが動物細胞(ガン細胞や筋線維芽細胞、cancer associated fibroblast [CAF])の運動を抑制する新たな機能を見いだしたこと及び細胞形態変化や細胞運動にアクチンの重合・脱重合[actin dynamics]が関わることが挙げられた。

2. 研究の目的

下記の研究目的で本研究を開始した。

(1) 脱皮過程初期に昆虫表皮真皮細胞がEMT的形質変換を起こし、BPUはこの変化を阻害するという仮説の検証。

- ・エクダインに応答した表皮真皮細胞の形質転換に対するEMT関与の検証
- ・BPUによる脱皮阻害機序の解明

(2) BPUの筋線維芽細胞の機能発現を抑制する効果の作用機序解明と創薬への応用の可能性検証。

3. 研究の方法

研究目的(1)と(2)(前項目に記載)は以下の方それぞれの手法で施行した。

(1)の研究手法

上記仮説の検証には昆虫細胞(真皮表皮細胞)の初代培養系の確立が必要である。このためニカメイガ幼虫の表皮真皮細胞の初代培養系の調製法及び培養条件の検証を行った。

ニカメイガ表皮真皮細胞の調製と培養

ニカメイガ幼虫(無菌条件下で飼育)の表皮組織をクリーンベンチ内で剥離する。剥離した表皮組織を細胞抽出液(collagenase 溶液: collagenase (1 mg/ml) 5 ml + 10 mg/ml BSA in x1 PBS(-) 1 ml)中でハサミを用いて細かく細断する(ニカメイガ5匹分の表皮組織 / 3 mlの細胞抽出液)その後室温で30分間震盪する。フィルター濾過(メッシュサイズ 70 µm)により細胞デブリを除去した後、遠心分離により細胞を回収する。回収した細胞を培地(下記に記載 ± molting hormone (ecdysone) 2 µM)に懸濁し、種々のコーティング(下記参照)を施した培養用プレート(12 well plate)に接種する。接種した細胞は25℃で培養する。培地には必要に応じてニカメイガ胚抽出液(下記参照)を添加した。

Collagenase 処理行わない組織片(explant)培養法は数 mm 角の小片に切断した表皮組織を培地に、沈めて培養を行った。

ニカメイガ胚抽出液の調製

無菌的に飼育したニカメイガの卵を x1 PBS(-)で懸濁液を遠心分離でデブリを除去したものをニカメイガ胚抽出液とした。

昆虫細胞培養培地

- ・Grace medium + 15% FCS + Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (PSA)
- ・Excell medium + 30% FCS + PSA

各培養用プレートのコーティングの仕方

- ・Poly L-Lys (Sigma P4707) 0.01% 水溶液 室温 30 分/滅菌水洗浄/風乾
- ・Collagen type1 1/30 希釈 Col-1 (1 mM HCl)/風乾/滅菌水洗浄/風乾
- ・Gelatin 0.5% Gelatin 室温 30 分/風乾
- ・Matrigel 1/10 希釈 (x1 PBS(-)) 室温 30 分

(2)の研究手法

培養細胞

株化線維芽細胞 NIH3T3 細胞、株化扁平上皮ガン細胞(A431)及びCAFの培養にはDMDM-10% FCSを用いた。初代培養網膜色素上皮細胞(retinal pigment epithelial cell [RPE])及び血管内皮細胞(endothelial cell [EC])の培養にはそれぞれ RtEGM BulletKit (ロンザ)及び HEC-C1 培地(機能性ペプチド研究所)を用いた。

細胞運動

創傷治癒アッセイにより細胞運動能に及ぼす効果を評価した。

血管新生

マトリゲル(BPUまたはDMSO(control[ctrl])含有)上でECの培養を行い、管腔形成を誘導する。管腔の長さ及び分岐点の数に及ぼす効果を定量化することで血管新生に対する効果を評価した。

マトリゲルを用いたCAFを介した扁平上皮ガン細胞浸潤アッセイ

12 mm 丸形カバーガラスを設置した24穴プレート(あらかじめ-20℃で冷却しておく)に融解させたマトリゲルを250 µlを添加し37℃で1時間保温し、マトリゲルを固める。あらかじめ指示された条件で培養したCAF細胞単独またはA431細胞(薬剤処理していない無処理の細胞)と混合してマトリゲル上に接種し、一定期間培養する。フォルマリンで細胞を固定した後、氷

冷した x1PBS(-) に浸して低温で放置しマトリゲルを溶解・除去を行った。浸潤してカバーガラスに接着した細胞の phase contrast 像を撮影した後、CAF 及び A431、それぞれの細胞の分子マーカーの抗体で免疫染色した。ヘキストで染色された核を計測することでカバーガラスに接着した細胞数を定量した。この手法で BPU が CAF を介したガン細胞の集団的浸潤に対する効果を評価した。

細胞増殖・生存アッセイ

BPU の細胞増殖及び生存率に対する効果はそれぞれプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みや MTT アッセイにより評価した。

イムノプロット・qPCR

それぞれの培養細胞を 2% SDS sample buffer で溶解させた総抽出液を SDS-PAGE にかけるタンパク質を分離後、PVDF 膜に転写する。対象となる抗体を用いたイムノプロットによりタンパク質レベルでの発現を解析する。この際、GAPDH をローディングコントロールとして用いた。mRNA レベルでの発現は total RNA を鋳型にして cDNA 合成を行い、real-time qPCR により解析する。この場合も GAPDH mRNA の発現量を内在性コントロールとして用いた。

BPU 類縁体の標的タンパク質の同定

0-NBD ユニートを導入した BPU 類縁体を用いて BPU 類縁体の標的タンパク質の検索・同定を行った。この方法は 0-NBD を導入した低分子リガンドと標的タンパク質が結合すると標的タンパク質のリガンド結合部位近隣のリジン残基のアミノ基と 0-NBD ユニートが反応して蛍光性の N-NBD ユニートが標的タンパク質に付加される原理を応用したものである (図 1)。

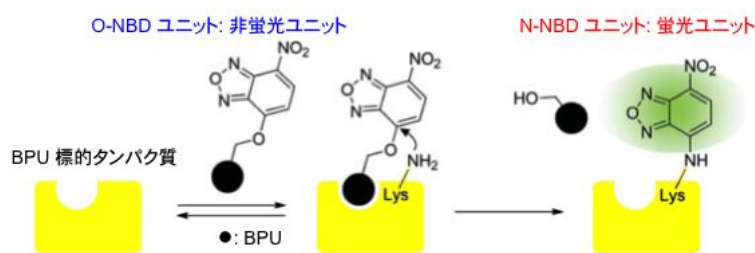


図1: 標的タンパク質の検索方法の原理

培養細胞の培地に 0-NBD ユニートを導入した BPU 類縁体を加え、45 分間培養を行う。培地を除去後十分量の x1 PBS(-) で洗浄後、2% SDS sample buffer で溶解させた総抽出液を SDS-PAGE にかけるタンパク質を分離後、ゲルを蛍光イメージアナライザー (Typhoon 9410) で標識されたタンパク質の検出を行う。蛍光標識タンパク質の存在が確認できた場合には、その部分のゲルを切り出しマススペクトルによるタンパク質の同定を行う。この際、N-NBD ユニートの付加により分子量が大きくなったリジン残基を含むペプチドを指標に解析を行う。

目的とする遺伝子に対する siRNA は Sigma から購入し、Lipofectoamine RNAiMAX を用いて培養細胞へ導入した。siRNA 導入後 2 日目に細胞増殖及び細胞運動に対する目的遺伝子の KD 効果を解析した。

siRNA を介したノックダウン (KD)

目的とする遺伝子に対する siRNA は Sigma から購入し、Lipofectoamine RNAiMAX を用いて培養細胞へ導入した。siRNA 導入後 2 日目に細胞増殖及び細胞運動に対する目的遺伝子の KD 効果を解析した。

4. 研究成果

(1) ニカメイガ表皮真皮細胞の調製と培養

まず、ニカメイガ幼虫表皮組織を collagenase 処理で得た細胞をノンコーティング培養用プレートに播種し、1 週間培養を続けたが、プレートへの細胞接着及び細胞増殖は認められなかった。播種した細胞懸濁液中に細胞が含まれていることは Hoechst による核染色で確認した。また、生細胞の存在はトリパンブルー染色で確認した。

細胞接着を高める目的で、培養プレートを「研究の方法」に記載したコーティングを施した培養プレートでの培養を試みた。この際、培地に ecdysone 及び (または) ニカメイガ胚抽出液を添加した。しかしながら、何れの培養系においても著明な接着細胞の増殖はみとめられなかった。

(2) 細胞運動に及ぼす BPU の効果検証

まず、ホニュウ動物細胞での BPU の効果検証のため 33 種類の BPU の NIH3T3 細胞の運動能に対する効果を創傷治癒アッセイにより解析した。この結果、5 種類の BPU [No.1, Nos.4-6, No.17] は myocardin related transcription factors (MRTF) 阻害剤である CCG-1423 と同等以上の活性化線維芽細胞の運動に対する抑制効果を発揮した。CCG-1423 と比較して、これらの BPU が細胞生存率に及ぼす影響は低かった。この 5 種類の BPU の内、とくに No.4 及び No.7 (それぞれ BPU4 及び BPU17 と命名) が著しい細胞運動阻害活性を示した。

(3) CAF を介したガン細胞の集団的浸潤に対する効果

NIH3T3 細胞は株化された線維芽細胞であるが、恒常的に著明な α -smooth muscle actin (α -SM actin: 筋線維芽細胞マーカー) の発現が認められるため筋線維芽細胞様形質を呈することが示唆される。この知見をベースに BPU4 及び BPU17 の筋線維芽細胞の機能阻害効果について検証した。ガン組織の微小環境に局在する筋線維芽細胞である CAF に焦点を当てた解析で、BPU4 及び BPU17 は共に濃度依存性に CAF の細胞運動 (創傷治癒アッセイ) を同程度に阻害した。さら

に、それぞれの化合物の CAF を介した A431 細胞の集团的浸潤に対する効果を検証した。それぞれの化合物で前処理した CAF と薬剤無処理の A431 細胞を混合してマトリゲル上に播種するといずれも場合も A431 細胞と CAF からなる細胞集団が形成されるが、この細胞集団形成に関しては有意な差は認められなかった。マトリゲルへの浸潤に関しては A431 細胞を単独で接種した場合にはマトリゲルに浸潤して底面のカバーガラス上で伸展した細胞は殆ど認められなかった。

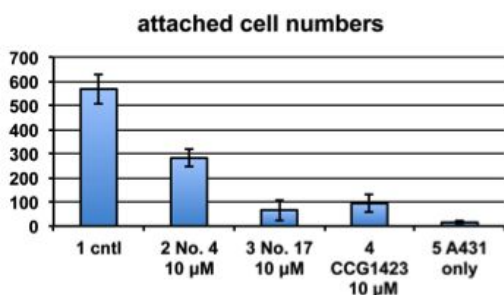


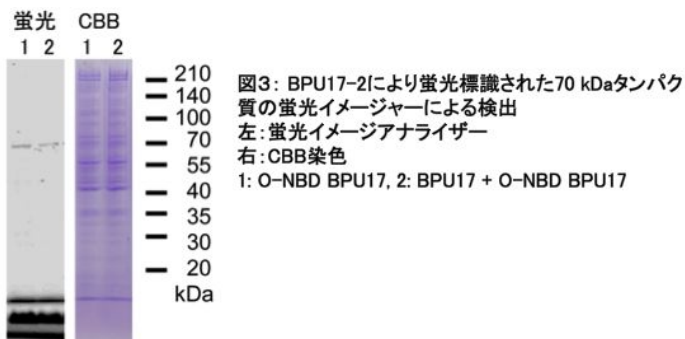
図2: CAFを介したA431細胞の集团的浸潤に対するBPU4及びBPU17の抑制効果の定量化

1: cntl (DMSO), 2: BPU4, 3: BPU17, 4: CCG1423, 5: cntl CAF-

しかしながら、CAF (cntl)と共に接種した場合には CAF と共に細胞集団を形成して浸潤した A431 細胞がカバーガラス上で伸展・コロニー形成し、その周辺に CAF が存在する様子が phase contrast で観察された(細胞形態による判定)。さらに、それぞれの細胞の分子マーカー (CAF: SM-actin; A431: E-cadherin) に対する抗体を用いた免疫染色でそれぞれの細胞局在を確認した。これに対して、BPU4、BPU17 または CCG1423 で前処理した CAF と A431 細胞を接種した場合にはカバーガラス上で伸展した細胞数は著しく減少した。BPU17 による阻害効果が最も著明であった(図2)。

(4) CAF における BPU 標的因子の検索・同定

この目的達成のため、0-NBD ユニットを導入したリガンドを用いた標的タンパク質の標識法を応用した(図1)。0-NBD 標識した BPU17-2 (0-NBD BPU17)培地に添加して CAF を培養し、総抽出液を SDS-PAGE で分離した後、蛍光イメージャーで蛍光標識されたタンパク質の検出を行なった。この結果、分子量 70 kDa のタンパク質が蛍光標識されたが、BPU17 を含む培地 (0-NBD BPU17 の 10 倍濃度) で前培養した後に 0-NBD BPU17 で標識した場合には蛍光シグナルの減衰が認められた(図3)。この結果は 0-NBD BPU17 は特異的に 70 kDa のタンパク質と相互作用したことを意



味している。このタンパク質の細胞内局在を知るため 0-NBD BPU17 で標識した CAF を固定後、細胞質に局在する α -tubulin に対する抗体で免疫染色を行なった。この結果、蛍光シグナルは α -tubulin のシグナルと同様、細胞質局在することが判明した。生化学的にも蛍光標識された 70 kDa タンパク質は細胞質分画に存在することを確認した。

この 70 kDa の BPU17 の標的タンパク質の同定のため、先ずイオン交換樹脂による精製を試みた。その結果、標的タンパク質は陰イオン交換樹脂 DEAE-Sepharose には吸着し、200 mM NaCl のイオン強度で溶出されたが、陽イオン交換樹脂 CM-Sepharose には吸着しなかった。DEAE-Sepharose の吸着分画を CM-Sepharose にかけて非吸着分画を回収することで精製度を上げ、この分画をマスマスペクトルで解析した。この結果、bifunctional purine biosynthesis protein PURH (ATIC) の 408 番目のリジン残基に蛍光ユニット N-NBD が付加していた。

ATIC は多様なタンパク質と相互作用し、neural crest 由来の細胞の接着や運動をポジティブに制御することが報告されている。このため、ATIC の CAF の細胞運動に及ぼす効果の検証する目的で、siRNA を介して ATIC の発現をノックダウンさせ細胞で創傷治癒アッセイを行った。この結果、ATIC の強制的発現低下が CAF の細胞運動を著明に抑制した。しかしながら、invitro で合成した ATIC と 0-NBD BPU17 の直接結合は認められなかった。以上の結果は ATIC と結合する何らかのタンパク質と BPU17 は結合し、結合部位近傍にはリジン残基が存在しないため相互作用している ATIC のリジン残基 (408 Lys) と 0-NBD BPU17 間で求核反応が起こり、蛍光標識したものと考えられる。

(5) 網膜色素上皮細胞が形質転換した筋線維芽細胞の機能発現及び血管新生に対する BPU の効果検証

これまでの研究から BPU は上皮細胞が炎症反応にตอบสนองして筋線維芽細胞に形質転換する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition[EMT]) に対しても阻害効果を発揮するのではないかと考えた。この可能性検証のため加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration [AMD]) に関わる RPE の筋線維芽細胞への EMT に対する BPU の影響を解析した。AMD は網膜組織での炎症反応により誘導される血管新生とその破綻が引き金となり、炎症反応や漏出した血液

成分の刺激を受けた RPE が EMT を起こし、その結果生じた筋線維芽細胞が網膜下で細胞外基質（コラーゲン等）を過剰産生することにより惹起される網膜変性疾患である。この結果、線維増殖組織（癒痕組織）が形成され視細胞にダメージを与え失明に至る。

BPU17 は TGF 刺激に応答した初代培養 RPE の細胞運動、細胞増殖及び筋線維芽細胞マーカー (collagen や α -SM actin) の発現を著明に阻害した。さらに、初代培養 EC を用いた解析で、BPU17 は血管新生に対しても阻害効果を発揮した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

細胞骨格による転写制御 -アクチンダイナミクスによる転写調節と細胞機能

林 謙一郎、森田 強

実験医学 36 1014-1019 2018 年 4 月 (査読なし、依頼有り)

Thymosin- β 4 is a Central Mediator of Transforming Growth Factor- β /Myocardin-Related Transcription Factor Axis in Tumor Progression.

Morita T., and Hayashi K.

Molecular Cancer Research 16 880-893 2018 年 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

筋線維芽細胞 (myofibroblast) 機能発現の新たな制御機構

林謙一郎

2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ワークショップ

神戸国際会議場

2017-12-06

Tymosin β 4/MRTFs による細胞骨格遺伝子の転写制御

森田強、林謙一郎

第 89 回日本生化学会大会

仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス

2016-09-25

Myofibroblast/CAF の機能制御に焦点を当てた創薬標的の探索

林 謙一郎

第 33 回 藤田カンファレンス

京都エミナース

2016-09-03

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中川 好秋

ローマ字氏名：Nakagawa Yoshiaki

所属研究機関名：京都大学

部局名：(連合) 農学研究科 (研究院)

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80155689

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：渡辺 文太

ローマ字氏名：Watanabe Bunta

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。