

平成 23 年 2 月 28 日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005～2009
課題番号：17014055
研究課題名（和文） がん細胞の極性形成の異常と細胞接着シグナリング
研究課題名（英文） Role of cell adhesion signaling in the abnormal cell polarization of cancer cells
研究代表者 高井 義美 (TAKAI, YOSHIMI) 神戸大学・大学院医学研究科・教授 研究者番号：60093514

研究成果の概要（和文）：接着分子ネクチンとネクチン様分子（Nec1）は、細胞増殖因子受容体やインテグリンなどと協調的に作用して、細胞の接着と共に細胞の極性、形態形成、運動、増殖、分化、生存など種々の細胞機能を制御していること、さらに、その分子機構を明らかにした。これらの分子の異常はがん細胞の特性である異常増殖や浸潤・転移に関与していることを見出し、この異常を正常化させることが新しいがん治療の開発に結びつくことを示した。

研究成果の概要（英文）：Cell adhesion molecules nectins and Necls were found to crucially regulate various cellular functions, including cell adhesion, polarization, morphology, movement, proliferation, differentiation, and survival, in cooperation with growth factor receptors and integrins. The molecular mechanisms underlying these functions were clearly elucidated. The dysfunctions of nectins and Necls were shown to be involved in the abnormal proliferation of cancer cells, leading to tumor invasion and metastasis. It was proposed that the normalization of the dysfunctions is the key to develop a new type of anti-cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	111,000,000	0	111,000,000
2006 年度	84,000,000	0	84,000,000
2007 年度	84,000,000	0	84,000,000
2008 年度	99,445,000	0	99,445,000
2009 年度	83,800,000	0	83,800,000
総計	462,245,000	0	462,245,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞増殖、細胞運動、細胞接着、細胞極性、ネクチン、Nec1、インテグリン

1. 研究開始当初の背景

正常の上皮細胞ががん化すると、細胞の運動能は亢進し、無秩序に増殖を繰り返すようになり、細胞間の接着と極性形成の制御機構は破綻する。その結果、がん細胞は周囲の組

織や遠隔臓器に浸潤・転移し、個体の生命を脅かすようになる。がん細胞の浸潤・転移機構を理解するためには、まず、正常細胞の接着および極性の形成に関わる分子機構の全体像を解明することが重要である。さらに、

がん細胞においてこの分子機構がどのように異常を来しているのか、また、この異常を来す分子機構がどのようなものであるのかについて明らかにする必要がある。

これまでに私共は、新規の細胞間接着分子ネクチンが、上皮細胞における主要な接着装置の一つであるアドヘレンスジャンクション (AJ) 形成において、AJ に存在する別の細胞間接着分子カドヘリンと協調作用して AJ 形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。さらに、これまでの当特定領域研究の計画研究において、AJ が形成された後の極性形成や接着分子クローディンによるタイトジャンクション (TJ) 形成においてもネクチンによる細胞間接着が極めて重要であることも明らかにしている。一方、ネクチンと構造上類似するネクチン様分子 (Nec1) の一つ Nec1-5 が、細胞-基質間の接着を担うインテグリン $\alpha v \beta 3$ や血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体と協調して、細胞運動の前後軸方向に沿った極性形成や運動先端の形成に関与し、細胞の運動と増殖を促進する分子機構を解明している。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの計画研究の成果をさらに発展させ、私共が見出した接着分子ネクチンや Nec1-5 に着目して、正常細胞の極性形成を制御する分子機構の全容を解明すると共に、逆に、極性形成の破綻が上皮細胞の上皮-間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) や細胞のがん化につながる分子機構を明らかにし、最終的にネクチンや Nec1-5 ががん細胞の浸潤・転移に関わる役割と作用機構を統合的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

がん細胞での極性形成の破綻と細胞接着のシグナル伝達機構に関して、さらに発展的、統合的に解析を行うため以下の研究を施行した。

(1) 細胞の接着と極性の破綻と EMT の機構

ネクチンやインテグリン $\alpha v \beta 3$ の接着分子と細胞の極性形成に必須の極性因子 Par 複合体との相互作用という視点から、Par 複合体が細胞極性の形成において果たす役割と作用機構を解析した。さらに、この相互作用の異常がどのようにがん細胞での極性形成の破綻や EMT につながるのか、その分子機構についてもさらに解析した。

(2) 細胞運動時の細胞極性の制御機構

細胞運動時の極性形成や運動先端の形

成には低分子量 G タンパク質 Rap1、Rac、RhoA の局所的・周期的な活性制御が重要であるということが明らかになりつつあったが、その制御機構は不明であった。そこで、Nec1-5、インテグリン $\alpha v \beta 3$ や PDGF 受容体がこの制御機構にどのように関わっているのか解析した。

(3) 細胞の接着形成と極性形成の異常モデル動物の作製と解析

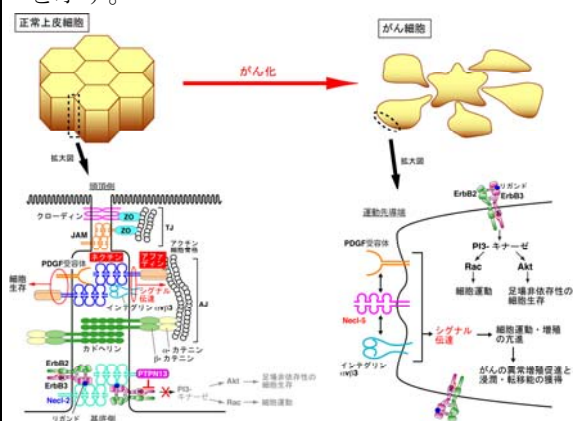
ネクチンノックアウトマウスでは、分化異常が認められることから、ネクチンは細胞間接着以外に細胞分化にも関与していると考えられ、その機構を検討した。また、ネクチンの細胞内結合分子アフアディンのノックアウトマウスを用いて、アフアディンががんの進展と関連する血管新生にどのように関わっているかを検討した。一方、Nec1-5 はがん細胞で発現が上昇することから、Nec1-5 ノックアウトマウスを用いて発がん誘導実験を行い、がん細胞の浸潤・転移能が抑制されるかどうか解析した。

(4) 細胞の接着と極性形成の修飾物質の開発

マウスを用いたがん転移のモデル実験系で、がん転移の抑制効果を持つ抗 Nec1-5 モノクローナル抗体が、がん細胞と血小板との接着を阻害して転移を抑制するが、さらに、このモノクローナル抗体のがん転移抑制機構を詳細に解析し、ヒトがん転移の治療・創薬への応用について検討した。

4. 研究成果

本研究によって明らかになった細胞がん化のメカニズムについて以下にその模式図を示す。



(1) 細胞の接着と極性の破綻と EMT の機構

AJ と TJ を欠損している線維芽細胞にネクチン、カドヘリン、JAM、クローディンといった接着分子を発現させて AJ 構造と TJ 構造を再構築することに成功した。この再構築に

はカドヘリンなどの接着分子よりもネクチンが最も重要であった。

また、Nec1 ファミリーの一つである Nec1-2 はがん抑制因子として機能していることは報告されていたがその抑制機構については全く不明であった。ErbB2/ErbB3 複合体はがんの進展を促進する受容体であるが、Nec1-2 は ErbB3 と結合することにより、脱リン酸化酵素 PTPN13 を介して、リガンド刺激に対する ErbB3 のリン酸化およびその下流の Akt や Rac の活性化を抑制した。また、がん細胞に Nec1-2 を発現させることにより、接着非依存性のアポトーシスが促進し、細胞運動は抑制された。以上より、これまで全く不明であった Nec1-2 のがん抑制の分子機構が初めて明らかになった。

(2) 細胞運動時の細胞極性の制御機構

運動している細胞は前後軸方向に極性を形成し、運動方向に先端端を形成する。この運動先端端には Nec1-5、インテグリン $\alpha v \beta 3$ や血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体が高度に集積し、細胞運動を促進することはこれまでに報告していた。さらに詳細な検討により、運動先端端の効率的な形成には低分子量 G タンパク質 Rap1、Rac、RhoA およびこれらの活性化を制御する分子の局所的・周期的な活性制御が重要であることを細胞生物学的に明らかにした。その制御分子の一つとして、ネクチンの裏打ち分子でネクチンと共に細胞間接着形成に関わるアフアディンが重要であることを見出した。さらに、アフアディンと結合する ADIP という分子が Rap1 下流で Rac の活性化を促進することも突き止めた。

(3) 細胞の接着形成と極性形成の異常モデル動物の作製と解析

Nec1-5 ノックアウトマウスを用いて、肝がん発現実験を施行し、Nec1-5 が肝がんの発現に関与するという知見が得られた。また、同マウスを用いて肺がんの転移実験も行い、Nec1-5 が肺がんの転移に促進的な役割を果たしていることを見出した。また、ネクチンノックアウトマウスで皮膚の分化に異常が認められる原因として、ネクチンが皮膚の分化に関わる分子の一つであるロリクリンの発現を制御しているためであることが見出された。一方、アフアディンノックアウトマウスでは血管新生が抑制されることが明らかとなった。

(4) 細胞の接着と極性形成の修飾物質の開発

細胞の運動・増殖を促進する Nec1-5 について、肺がん患者の手術時切除組織を用いてその発現と術後予後について検討し、Nec1-5 が発現している症例で術後予後が有意に不

良となることが明らかになった。この結果を足がかりに、Nec1-5 ががんの進展を助長する機序を明らかにしつつあり、逆に、どのような設計の Nec1-5 阻害抗体が、最もがんの進展抑制あるいはがん細胞自身に対する細胞傷害性を発揮するかの解析を進めている。

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 23 件) (総計 49 件)

1. Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, Ogita H, Takai Y. Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in MDCK cells. *J Biol Chem*, 285: 5003-5012, 2010 査読有
2. Hotta A, Kawakatsu T, Nakatani T, Sato T, Matsui C, Sukezane T, Akagi T, Hamaji T, Grigoriev I, Akhmanova A, Takai Y, Mimori-Kiyosue Y. Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through LL5- $\alpha/6$. *J Cell Biol*, 189: 901-917, 2010 査読有
3. Kawano S, Ikeda W, Kishimoto M, Ogita H, Takai Y. Silencing of ErbB3/ErbB2 signaling by immunoglobulin-like Nec1-2. *J Biol Chem*, 284: 23793-23805, 2009 査読有
4. Miyata M, Rikitake Y, Takahashi M, Nagamatsu Y, Yamauchi Y, Ogita H, Hirata, K, Takai Y. Regulation by afadin of cyclical activation and inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA small G proteins at leading edges of moving NIH3T3 cells. *J Biol Chem*, 284: 24595-24609, 2009 査読有
5. Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, Matsui C, Arita K, Katahira-Tayama S, Sato T, Yamauchi E, Oda Y, Takai Y. Synaptic activity prompts γ -secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *J Cell Biol*, 185: 551-564, 2009 査読有
6. Miyata M, Ogita H, Komura H, Nakata S, Okamoto R, Ozaki M, Majima T, Matsuzawa N, Kawano S, Minami A, Waseda M, Fujita N, Mizutani K, Rikitake Y, Takai Y. Localization of nectin-free afadin at the leading edge and its involvement in directional cell movement induced

- by platelet-derived growth factor. *J Cell Sci*, 122: 4319-4329, 2009 査読有
7. Sakisaka T, Yamamoto Y, Mochida S, Nakamura M, Nishikawa K, Ishizaki H, Okamoto-Tanaka M, Miyoshi J, Fujiyoshi Y, Manabe T, Takai Y. Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *J Cell Biol*, 183: 323-337, 2008 査読有
 8. Sakamoto Y, Ogita H, Komura H, Takai Y. Involvement of nectin in inactivation of integrin $\alpha\beta3$ after the establishment of cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 283: 496-505, 2008 査読有
 9. Nagamatsu Y, Rikitake Y, Takahashi M, Deki Y, Ikeda W, Hirata K, Takai Y. Roles of Necl-5/Poliovirus receptor and ROCK in the regulation of transformation of integrin $\alpha\beta3$ -based focal complexes into focal adhesions. *J Biol Chem*, 283: 14532-14541, 2008 査読有
 10. Ogita H, Takai Y. Cross-talk among integrin, cadherin, and growth factor Receptor: roles of nectin and nectin-like molecule. *Int Rev Cytol*, 265, 1-54, 2008 査読有
 11. Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24: 309-342, 2008 査読有
 12. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 603-615, 2008 査読有
 13. Wakamatsu K, Ogita H, Okabe N, Irie K, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Miyoshi J, Takai Y. Up-regulation of loricrin expression by cell adhesion molecule nectin-1 through Rap1-ERK signaling in keratinocytes. *J Biol Chem*, 282: 18173-18181, 2007 査読有
 14. Minami Y, Ikeda W, Kajita M, Fujito T, Amano H, Tamaru Y, Kuramitsu K, Sakamoto Y, Monden M, Takai Y. Necl-5/poliovirus receptor interacts in cis with integrin $\alpha\beta3$ and regulates its clustering and focal complex formation. *J Biol Chem*, 282: 18481-18496, 2007 査読有
 15. Nakata S, Fujita N, Kitagawa Y, Okamoto R, Ogita H, Takai Y. Regulation of platelet-derived growth factor receptor activation by afadin through SHP-2: implications for cellular morphology. *J Biol Chem*, 282: 37815-37825, 2007 査読有
 16. Hisata S, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Aoki K, Matsuda M, Takai Y. Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 178: 843-860, 2007 査読有
 17. Ooshio T, Fujita N, Yamada A, Sato T, Kitagawa Y, Okamoto R, Nakata S, Miki A, Irie K, Takai Y. Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *J Cell Sci*, 120: 2352-2365, 2007 査読有
 18. Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, Fujita N, Takai Y. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 19: 593-602, 2007 査読有
 19. Sato T, Fujita N, Yamada A, Ooshio T, Okamoto R, Irie K, Takai Y. Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J Biol Chem*, 281: 5288-5299, 2006 査読有
 20. Kimura T, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Takai Y. Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the Hepatocyte Growth Factor-induced endocytosis of E-cadherin. *J Biol Chem*, 281: 10598-10609, 2006 査読有
 21. Sakamoto Y, Ogita H, Hirota T, Kawakatsu T, Fukuyama T, Yasumi M, Kanzaki N, Ozaki M, Takai Y. Interaction of integrin $\alpha\beta3$ with nectin: Implication in cross-talk between cell-matrix and cell-cell junctions. *J Biol Chem*, 281: 19631-19644, 2006 査読有
 22. Fukuyama T, Ogita H, Kawakatsu T, Inagaki M, Takai Y. Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene*, 25: 8-19, 2006 査読有
 23. Yamada A, Fujita N, Sato T, Okamoto R, Ooshio T, Hirota T, Morimoto K, Irie

K, Takai Y. Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. *Oncogene*, 25: 5085-5102, 2006 査読有

[学会発表] (計 22 件) (総計 39 件)
(国内学会)

1. 高井義美 細胞接着とシグナル伝達-生理機能と病態 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 2008 年 11 月、大阪
2. 扇田久和、高井義美 がん化による細胞接着・運動・増殖異常とその分子機構 第 67 回日本癌学会総会 (シンポジウム) 2008 年 10 月、名古屋
3. 高井義美 細胞の極性形成の基本メカニズム 第 8 回日本分子生物学会春季シンポジウム 2008 年 5 月、札幌
4. 高井義美 Cell-cell adhesion and formation of cell polarity 第 66 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム) 2007 年 10 月、横浜
5. 高井義美 細胞の接着とシグナリング機構 日本生化学会東北支部第 73 回例会 (シンポジウム) 2007 年 5 月、仙台
6. 高井義美 細胞間接着による細胞の運動・増殖機構 第 39 回日本結合組織学会・第 54 回日本マトリックス研究会合同学術集会 2007 年 5 月、東京
7. 高井義美 Cell adhesion and signal transduction 第 71 回日本循環器学会総会 (真下記念講演) 2007 年 3 月、神戸
8. 高井義美 がん細胞の異常増殖と浸潤・転移の分子機構 第 65 回日本癌学会学術総会 (モーニングレクチャー) 2006 年 9 月、横浜
9. 高井義美 月田先生から学んだ私の細胞接着研究 第 3 次対がん 10 年総合戦略 (平成 16 年度-25 年度) 第 1 回合同シンポジウム 2006 年 2 月、東京
10. 高井義美、池田わたる、扇田久和、匂坂敏朗、藤田直之 Cross-talk signaling between cell adhesion and cell movement and proliferation 第 78 回日本生化学会大会 (シンポジウム) 2005 年 10 月、神戸
11. 高井義美 がん細胞の接着と極性の異常 第 64 回日本癌学会学術総会 (モーニングレクチャー) 2005 年 9 月、札幌
12. 高井義美 がん細胞の浸潤・転移の新しい分子機構 第 14 回日本がん転移学会総会 (特別講演) 2005 年 6 月、大阪

(国際学会)

1. Takai Y. Nectins and nectin-like molecules: roles and modes of action in

tumorigenesis, invasion, and metastasis. Global COE International Symposium "New Aspects in Immunology and Cancer Research", 2009 年 6 月, Akita, Japan

2. Takai Y. Roles and modes of action of nectin and nectin-like molecule in cell polarization. International Symposium on Cell Polarity System and Future Medicine "Revealing the Mechanism of Cell Morphogenesis for Future Medicine", 2007 年 12 月, Yokohama, Japan
3. Takai Y. Cell adhesion and signal Transduction. Mini-symposium to celebrate 30th anniversary of Institute of Biological Chemistry (IBC) "Proteins from chemistry to biology", 2007 年 10 月, Taiwan
4. Takai Y. Roles of nectin and nectin-like molecule in contact inhibition of cell movement. 6th Abercrombie Meeting on Cell Migration: from molecules to organisms, 2007 年 9 月, Oxford, UK
5. Takai Y. Cross-talk between cell-cell and cell-matrix junctions through nectin and nectin-like molecule. Gordon Research Conferences "Cell Contact & Adhesion", 2007 年 5 月-6 月, Lucca, Italy
6. Takai Y. Nectin and nectin-like molecules in cell adhesion, movement, and proliferation. The 55th Fujihara International Seminar "Physiological and pathological significance of the cell to cell interaction by TSLC1/1G5F4", 2006 年 7 月, Hokkaido, Japan
7. Takai Y., Sakisaka T., Fujita N., Ogita H., Ikeda W. Regulation of cell polarization, movement, and proliferation by cell-cell adhesion molecule nectin. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006 年 6 月, Kyoto, Japan
8. Takai Y., Ikeda W., Ogita H., Sakisaka T., Fujita N. New cross-talk mechanisms of cell adhesion, migration and proliferation. The 10th International Symposium on Cancer Chemotherapy "Growth Signal, Drug Resistance and Metastasis in the Development of Molecular Cancer Therapeutics", 2006 年 1 月, Tokyo, Japan
9. Takai Y. Temporal and spatial control of intracellular signaling. International Symposium on Leading

Project for Biosimulation, 2005年7月,
Tokyo, Japan

10. Takai Y. Signaling by nectins and nectin-like molecules in cell adhesion, migration and proliferation. Gordon Research Conferences "Mechanisms of Cell Signalling", 2005年6月, Hong Kong

[図書] (計6件) (総計8件)

1. Sakisaka T, Takai Y. A cell-free assay for endocytosis of E-cadherin. In ***Methods in Molecular Biology***, Humana Press, Totowa, Vol. 440, pp. 77-87, 2007
2. Ogita H, Takai Y. Activation of Rap1, Cdc42, and Rac by nectin adhesion system. In ***Methods Enzymol***, Academic Press, San Diego, Vol. 406, pp. 415-424, 2006
3. Ogita H, Takai Y. Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation. In ***IUBMB Life***, Taylor & Francis, Oxford, Vol. 58, pp. 334-343, 2006
4. Sakisaka T, Takai Y. Purification and properties of Rab3 GEP (DENN/MADD). In ***Methods Enzymol***, Academic Press, San Diego, Vol. 403, pp. 254-261, 2005
5. Sakisaka T, Takai Y. Purification and properties of Rabconnectin-3. In ***Methods Enzymol***, Academic Press, San Diego, Vol. 403, pp. 401-407, 2005
6. Miyoshi J, Takai Y. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. In ***Advanced Drug Delivery Rev***, Elsevier Science, Amsterdam Vol. 57, pp. 815-855, 2005

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井義美 (TAKAI, YOSHIMI)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：60093514

(2) 研究分担者

扇田久和 (OGITA, HISAKAZU)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：50379236

力武良行 (RIKITAKE, YOSHIYUKI)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：50419488

富樫 英 (TOGASHI, HIDERU)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：90415240

匂坂敏朗 (SAKISAKA, TOSHIAKI)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：80359843

岡本三紀 (OKAMOTO, MIKI)
大阪府立成人病センター・分子生物学部
門・研究員
研究者番号：20332455