

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02638

研究課題名(和文) がん細胞の増殖・遊走のdichotomy(二者選択)を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms that regulate the proliferation-migration dichotomy of cancer cells

研究代表者

榎本 篤(Enomoto, Atsushi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20432255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン結合分子Girdinは神経芽細胞やがん細胞の遊走を促進する分子である。本研究ではGirdinがアミノ酸輸送体CD98の局在を制御して、代謝・増殖の制御因子であるmTORC1の活性を抑制すること、紫外線照射に対する感受性を上昇させる機能を有することを示した。すなわち、Girdinの機能はがん細胞の(1)遊走、(2)代謝抑制、(3)紫外線照射(放射線療法)に対する感受性等の多様な現象に関わっている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Girdin分子は以前の研究により増殖・遊走ダイコトミーの制御因子の一つであるとされていたが、今回の研究により同分子の機能多様性が明らかとなった。生体内のがん細胞も浸潤期には分裂しないことが提唱されており(stop or go hypothesis)、抗がん剤に対する抵抗性の原因とされている。今後、Girdinの多様な制御をコントロールできる手法が解明されれば、新規治療法の開発の端緒となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The actin-binding protein Girdin is a regulator of migration of neuroblasts and cancer cells. The present study revealed that Girdin regulates the localization of the amino acid transporter complex (CD98 complex) to control the activity of mTORC1, a master regulator of cell metabolism and proliferation. We also showed the involvement of Girdin in the sensitivity of cancer cells to ultraviolet C. These findings suggest that Girdin is involved in various processes of cancer cells including migration and metabolism and sensitivity to radiation therapies.

研究分野：実験病理学

キーワード：細胞遊走 増殖・遊走ダイコトミー Girdin 代謝 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

発生期の細胞はその高い遊走能力と増殖によって組織や臓器を構築する。この時の細胞は、遊走する時は増殖せず、増殖する時は遊走を停止することが 1975 年頃から Ausprunkらによって報告されており、「proliferation and migration dichotomy」(増殖・遊走の二分; 以下、増殖・遊走ダイコトミー)と呼ばれている。生体内のがん細胞も浸潤期には分裂しないことが提唱されており (stop or go hypothesis)、抗がん剤に対する抵抗性の原因とされている。しかしながら一見当然とも考えられる増殖・遊走ダイコトミーのメカニズムは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

私達が解析を続けているアクチン結合分子 Girdin は、神経芽細胞やがん細胞の遊走を促進する分子であり、ノックアウトマウスや病理組織検体の解析から Girdin が細胞の集団的遊走 (collective migration) の特異的制御因子であることを報告してきた (*Dev Cell*, 2005; *Cancer Res*, 2008; *Nat Cell Biol*, 2008, *J Neurosci*, 2011; *EMBO J*, 2014; *Nat Commun*, 2014; *Cancer Res*, 2015 他)。最近、Girdin はアミノ酸輸送体 CD98 の局在を制御して、代謝・増殖の制御因子である mTORC1 の活性を抑制すること、さらに細胞分裂時の紡錘体チェックポイントの制御分子である Mad2 とも複合体を形成することが判明した。すなわち、Girdin の機能はがん細胞の(1)遊走、(2)増殖抑制、(3)細胞分裂等の多様な現象に関わっている可能性があり、従って増殖・遊走ダイコトミーの制御因子 (スイッチ分子) である可能性もあると考えられた。これらの背景から、本研究では、Girdin が増殖・遊走ダイコトミーの分子機序に関わっている可能性を検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) Girdin/CD98 複合体の機能解析と意義

CD98 は中性アミノ酸を取り込むアミノ酸トランスポーター-LAT1 と一回膜貫通型の CD98 heavy chain (CD98hc) の複合体であり、Girdin は CD98hc の細胞内ドメインに直接結合することを証明している。以前に Girdin は膜小胞の切断に重要であるダイナミン GTPase と結合、その GTPase 活性を上げることによってエンドサイトーシスを制御することを報告したが (*EMBO J*, 2014)、Girdin は CD98 のエンドサイトーシスも促進することが判明した。この結果、細胞膜上の CD98 が減少し、mTORC1 活性の低下に結びつくことを見出した。逆に Girdin の発現を抑制すると mTORC1 の活性が上昇することも判明した。本研究では Girdin/CD98 複合体の機能について生化学的あるいは細胞生物学的手法を用いて検証することを試みた。

### (2) Girdin と Mad2 の結合の生化学的解析と意義

本研究申請時までに Girdin の C 末端ドメインと Mad2 が結合することを見出している。まず Girdin と Mad2 が直接結合する可能性について検証した。GST 融合タンパク質を大腸菌発現系で発現・精製し、グルタチオンビーズを用いたプルダウンアッセイを試みた。また免疫細胞染色で、核膜が崩壊している M 期における Girdin と Mad2 の局在を検証した。Girdin の異常高発現が細胞増殖と遊走に与える影響を検証した。Girdin は分子量が 250kDa

と大きく、異所性高発現が困難であることを自験例で何度も確認しているため、今回は、CRISPR-dCas9 系による相乗活性化介在物質転写活性化システムを用いて内因性 Girdin の発現を上昇させる実験系 (Zhang 研究室, *Nature*, 517:583, 2015) を用いた。申請時まで Girdin 遺伝子の上流の non-coding 領域に対する guide RNA を合成し、VP64 および MS2-p65-HSF1 と同時に導入することによって HeLa 細胞で内因性の Girdin の高発現を実現することに成功していた。本細胞を用いて Girdin の高発現が細胞増殖、遊走、Mad2 の機能、および mTORC1 活性に与える影響を検証した。Mad2 に結合しない Girdin 変異体およびそのノックイン細胞の作成を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Girdin/CD98 複合体の機能解析と意義

Girdin は CD98hc の結合が細胞内アミノ酸の組成に与える影響をアミノ酸アナライザーで検証した。Girdin をノックダウンした 293 細胞では複数の必須アミノ酸の細胞内取り込みが上昇することが判明し、Girdin/CD98 複合体が必須アミノ酸の細胞内濃度の低下とそれに引き続く mTORC1 活性の低下を誘導することが示された。Girdin ノックアウトマウスの神経細胞では mTORC1 活性の上昇が観察された。また Girdin は私達が以前に見出した Akt と MAP キナーゼの他、他研究室により Src、Cdk5、EGF 受容体によってリン酸化されることが報告されている。本研究ではこれらのキナーゼの活性化体の過剰発現が Girdin と Mad2 および CD98 との結合に与える影響を検証した。その結果、Girdin の N 末端が MAP キナーゼでリン酸化を受け、CD98 複合体との結合を増強することを生化学的手法で明らかにした。これらの一連のデータは、細胞運動の正の制御因子である Girdin が、細胞内代謝および mTORC1 活性を抑制し、細胞増殖を負に制御する機能を有していること、Girdin の本機能は MAP キナーゼの活性によって正に制御されていることを示しており、論文として発表した (Weng et al., *PLoS Biol*, 2018)。

##### (2) Girdin と Mad2 の結合の生化学的解析と意義

申請時まで Girdin の C 末端ドメインと Mad2 が結合することを見出していた。初年度は Mad2 が紡錘体チェックポイントの重要な因子であることから、Girdin と細胞周期の関連を調べた。その結果、Girdin 高発現細胞の細胞周期を観察したところ、M 期と G1 期の有意な延長が見られた。(1) の結果と合わせ、Girdin の機能は一元的あるいは単純に理解することは難しいが、(a) 細胞運動能の正の制御、(b) mTORC1 活性の負の制御、(c) 細胞周期の正の制御 (M 期と G1 期の延長) の機能があり、少なくとも MAP キナーゼ活性がこれらの機能のスイッチに働いている可能性を示唆した (Weng et al., *PLoS Biol*, 2018)。また Girdin 高発現細胞では Mad2 の発現が mRNA およびタンパクレベルで上昇していることを見出した。本 Girdin による Mad2 発現上昇と細胞周期の関連について様々なアプローチにより検証したが、明快な結論は得られなかった。Girdin と Mad2 の直接結合については、良好な精製タンパク質の発現が得られず、結論には至らなかった。

##### (3) Girdin の発現と紫外線照射に対する感受性の関連

背景でも記したように増殖・遊走ダイコトミーは抗がん治療に対するがん細胞の感受性あるいは抵抗性とも関連している。本研究では、Girdin の発現と紫外線照射に対する感受性の関連を調べた。ゲノム編集の手技を用いて Girdin を高発現する HeLa 細胞を作成した。Girdin 高発現 HeLa 細胞に紫外線 (UVC) を照射したところ、コントロール細胞に比較して有意に細胞死をきたすことを見出した。Girdin を発現抑制した HeLa 細胞では逆の観察結果が得られた。このことは Girdin の発現と DNA 損傷に対する感受性の間に関連があることを示している。次に細胞運動中の細胞の UVC 感受性を調べたところ、細胞運動の状

態に関わらず、Girdin の発現は HeLa 細胞の UVC 感受性を押し上げることを見出した。Girdin は細胞運動能の正の制御因子であることから、検証前の仮説では Girdin は UVC 感受性を低下させる分子であると仮定していたが、実際の実験結果は異なっており、Girdin の機能の複雑性あるいは増殖・遊走ダイコトミーの機能の複雑性を示唆する所見であるとして、これらの結果を論文として報告した (Chen, et al., *Cancer Sci*, 2020)。ヒト食道癌の検体において Girdin の発現と術前放射線療法感受性の関連を調べたが、有意な統計学的有意差を見出すことができなかった。Girdin 高発現によりがん細胞の浸潤能および放射線療法感受性の両者が上昇し、結果を複雑にさせたものと推測した (Chen, et al., *Cancer Sci*, 2020)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyai Y, Esaki N, Takahashi M, Enomoto A	4. 巻 111
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts that restrain cancer progression: Hypotheses and perspectives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1047-1057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Enomoto A, Takahashi M, et al.	4. 巻 79
2. 論文標題 Meflin-positive cancer-associated fibroblasts inhibit pancreatic carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 5367-5381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hara A, Kobayashi H, Asai N, Saito S, Higuchi T, Kato K, Okumura T, Bando YK, Takefuji M, Mizutani Y, Miyai Y, Saito S, Maruyama S, Maeda K, Ouchi N, Nagasaka A, Miyata T, Mii S, Kioka N, Worthley DL, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A	4. 巻 125
2. 論文標題 Roles of the mesenchymal stromal/stem cell marker Meflin in cardiac tissue repair and the development of diastolic dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ Res	6. 最初と最後の頁 414-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.119.314806.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobayashi H, Enomoto A, Woods SL, Burt AD, Takahashi M, Worthley DL	4. 巻 16
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Rev Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 282-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41575-019-0115-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Weng L, Han YP, Enomoto A, Kitaura Y, Nagamori S, Kanai Y, Asai N, An J, Takagishi M, Asai M, Mii S, Masuko T, Shimomura Y, Takahashi M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Negative regulation of amino acid signaling by MAPK-regulated 4F2hc/Girdin complex.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS Biol.	6. 最初と最後の頁 e2005090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2005090.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Abudureyimu S, Asai N, Enomoto A, Weng L, Kobayashi H, Wang X, Chen C, Mii S, Takahashi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Essential Role of Linx/Islr2 in the Development of the Forebrain Anterior Commissure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24064-0.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mii S, Hoshino A, Enomoto A, Murakumo Y, Ito M, Yamaguchi A, Takahashi M.	4. 巻 23
2. 論文標題 CD109 deficiency induces osteopenia with an osteoporosis-like phenotype in vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 590-598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12593.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi H, Gieniec KA, Wright JA, Enomoto A, Takahashi M, Worthley DL, Woods SL, et al.	4. 巻 160
2. 論文標題 The Balance of Stromal BMP Signaling Mediated by GREM1 and ISLR Drives Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1224-1239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.11.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen C, Enomoto A, Weng L, Taki T, Shiraki Y, Mii S, Ichihara R, Kanda M, Koike M, Kodera Y, Takahashi M.	4. 巻 111
2. 論文標題 Complex roles of the actin-binding protein Girdin/GIV in DNA damage-induced apoptosis of cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4303-4317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14637.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Taki T, Shiraki Y, Enomoto A, Weng L, Chen C, Asai N, Murakumo Y, Yokoi K, Takahashi M, Mii S.	4. 巻 111
2. 論文標題 CD109 regulates in vivo tumor invasion in lung adenocarcinoma through TGF- signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4616-4628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14673.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Atsushi Enomoto, Yasuyuki Mizutani, Hiroki Kobayashi, Tadashi Iida, Susan L. Woods, Daniel L. Worthley, Masahide Takahashi
2. 発表標題 Identification of cancer-associated fibroblasts that suppress pancreatic cancer progression
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Enomoto
2. 発表標題 Cancer-restraining cancer-associated fibroblasts and their roles in tumor progression and immunity
3. 学会等名 Korean Cancer Association, 45th Annual Meeting and 5th International Cancer Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Enomoto A, Takahashi M.
2. 発表標題 Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts and its significance in tumor progression and response to therapies.
3. 学会等名 The 6th JCA-AACR Special Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本篤, Chen Chen, 滝哲郎, 高橋雅英
2. 発表標題 がん細胞のDNA損傷依存性細胞死におけるアクチン結合分子Girdinの役割
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Enomoto
2. 発表標題 Stromal biology of cancer and its relevance in developing new anticancer therapeutics
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Enomoto
2. 発表標題 A role of perivascular fibroblasts in cancer progression and the therapeutic potential of inducing alteration in their phenotype
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------