

平成22年 5月 30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590313

研究課題名(和文)：上皮-間葉変換を誘導する転写因子スネイルによる細胞骨格変化と転移の制御機構

研究課題名(英文)：The mechanism of regulation of metastasis and alteration in cell matrix by snail, transcription factor induce epithelial-mesenchymal transduction

研究代表者

原口 みさ子 (HARAGUCHI MISAKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10244229

研究成果の概要(和文)

スネイルを発現させた細胞では細胞の接着、離脱、再接着が亢進する。

すなわちフィブロネクチンのような細胞外基質への接着やインテグリン $\alpha v \beta 3$ のリガンドであるオステオポンチンに対する遊走活性が亢進する。スネイルはラミニン5やその受容体のインテグリン $\alpha 3$ 、 $\alpha 6 \beta 4$ の発現を低下させた。これらの結果はスネイルがインテグリンなどの発現を変化させることにより細胞の離脱、遊走、再接着を誘導することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：

We show that the expression of snail in epithelial MDCK and A431 cells enhance both cell detachment and attachment. Snail enhanced cell attachment to ECMs such as fibronectin. Snail also enhanced MDCK cell migration towards osteopontin that are ligands for integrin  $\alpha v \beta 3$ . We confirmed the reduction of laminin  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  or  $\beta 4$  (Laminin-5) and of receptors for Laminin-5 such as integrins  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  or  $\beta 4$  in MDCK/snail or in A431/snail cells. These results suggest that snail enhances cell detachment by multiple mechanism, and leads cell migration and reattachment at a second site, at least in part, by changing the expression of integrins in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医薬薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 病態医化学

キーワード：1.分子腫瘍学 2.細胞骨格. 3 転移

## 1. 研究開始当初の背景

上皮性癌細胞の転移の過程では上皮細胞から間葉細胞への形態変化上皮-間充織転換がおこる。すなわち癌細胞は原発巣で細胞-細胞間および、細胞-基底膜との接着から脱離し、基底膜を破って移動していき、基底膜を裏打ちしている組織内に浸潤し、接着して転移巣を形成する。このように上皮-間充織転換と癌転移は類似した機構を経て達成されると考えられる。

スネイル (snail)はジンクフィンガー型の転写抑制因子であり、上皮-間葉変換を誘導する機能をもつ。(Development 2005, 132, 3151-3161) snail を強制発現させると上皮細胞が脱上皮化をおこし間葉系細胞に変化する。実際の乳癌組織においても snail の発現と乳癌組織の悪性化との相関性が強いこと、浸潤部位での発現が高いことなどが報告されているが癌の進展における snail の寄与およびその分子機構の詳細は明らかにされていない。

snailは細胞-細胞間の接着因子であるE-カドヘリンの転写を抑制する。細胞-細胞間の接着を阻害し上皮組織の恒常性の維持を破壊することにより癌の進行に寄与していると考えられている。研究分担者である小澤はE-カドヘリンについての研究を進めており、2004年にはsnailがE-カドヘリンなどアドヘレンスジャンクションの構成成分のみならずタイトジャンクションの構成成分Claudinの発現も抑制することによって上皮-間葉変換を誘導

することを報告した。(J. Cell, Sci, 2004, 117, 1675-1685)。

国内外では snailによって発現が低下する遺伝子の同定や(Cancer res. 2005, 65, 6237-6244)

一方私たちはsnailを発現させた細胞は細胞外基質からの離脱が亢進しトリプシン処理によって容易に細胞脱離がおこることに着目しその分子機構の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

癌の転移における転写因子snailの寄与の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。具体的にはsnailが発現することにより細胞脱離、遊走、再接着が顕著に亢進するその分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞の接着, 離脱は低濃度のトリプシンで処理したあとに培養プレートに残存する細胞の数をクリスタルバイオレット染色して数値化した。

(2) RNA 発現はRT-PCR でタンパクの発現はウエスタンブロット法で調べ image J を用いて定量化した。

(3) プロモーター活性はルシフェラーゼ活性にて測定した。

(4) 細胞の遊走活性はトランスウエルを用い下層に種々の基質タンパクを添加し, snail 発現細胞を上層にまき、下層への遊走を調べた。

#### 4. 研究成果

##### 主な成果

snail を発現させた MDCK/snail A431/snail 細胞はコントロール MDCK/neo, A431/neo 細胞に比較して、

- 1) 低濃度トリプシン処理後にプレートに残存する細胞の数が顕著に減少しており細胞離脱が亢進していた。
- 2) 一方フィブロネクチンや血清を塗布したプレートへの接着は亢進しており30分以内に大部分の細胞が接着した。
- 3) またトランスウエルを用いて細胞の遊走活性を調べたところフィブロネクチンやオステオポンチンに対する遊走活性が顕著に亢進していた。
- 4) 細胞外基質やその受容体タンパクの発現をRNA レベルまたはタンパクレベルで調べたところ間葉系細胞で発現が高いインテグリン $\alpha 5$ 、 $\alpha 5$ 、およびフィブロネクチンの発現が亢進していた一方、上皮系細胞で発現する細胞外基質であるラミニン332( $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ )とその受容体であるインテグリン $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 4$ の発現が顕著に低下していた。
- 5) インテグリン $\alpha v$ のプロモーター活性を調べたところ MDCK/snail 細胞で顕著に亢進していることがわかった。
- 6) snail 発現細胞のフィブロネクチンへの接着は RGD ペプチドで抑えられ、オステオポンチンや血清への遊走活性はインテグリン $\alpha v \beta 3$ に対する中和抗体でほぼ完璧に抑制された。
- 7) 以上の結果は snail がインテグリンやそのリガンドである細胞外基質タンパクの発現を調節することにより細胞の接着、離脱、遊走を制御している可能性を示した。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

snail を発現させて上皮系から間葉系に変化した細胞の接着が低下していることに気づいていた研究者は多いと思うが細胞型が変化したので当然と考えており、定量化して報告した例はなかった。本研究で上皮-間葉転換は細胞-細胞間の接着だけでなく細胞と細胞外基質の接着が変化して癌などの転移に関わる事が示唆された。

##### 今後の展望

- 1) snail の発現した細胞の転移にはインテグリン $\alpha v \beta 3$ や $\alpha 5 \beta 3$ が関与する事が示唆されたのでそれらに対する中和抗体、ペプチドなどで阻害出来る可能性が示された。動物転移モデルを用いてスネイル発現癌細胞の転移をこれらの中和抗体やペプチドが阻害するか解析したい。
- 2) snail はオステオポンチンなどへの遊走が顕著に亢進しているためオステオポンチンを含む骨組織などの器官への転移が亢進しているか実際の臨床例で解析したい。
- 3) また細胞脱離、接着の際に snail 自体の発現が制御を受けていることが予想される結果を得ているのでその遺伝子レベル、タンパクレベルでの調節機構を解明したい。

#### 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2件)

1. \*Haraguchi M, The role of transcriptional regulator snail in cell detachment, reattachment and migration.

Cell adhesion & migration , 査読有り  
3(3):1-5, 2009

2. \*Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y,  
Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, McHugh  
KP, Ozawa M. Snail regulates cell-matrix  
adhesion by regulation of the expression  
of integrins and basement membrane  
proteins. J Biol Chem. 査読有り,  
283(35):23514-23, 2008

[学会発表] (計3件)

1 原口みさ子 転写因子スネイルによる  
MDCK 細胞の代謝調節 第82回生化学会大  
会 2009年10月22日 神戸国際会議場

2 原口みさ子 Snail regulates  
cell-matrix adhesion by regulation of the  
expression of integrins and basement  
membrane proteins 第67回癌学会学術総会  
2008年10月29日 名古屋国際会議場

3 原口みさ子 転写因子スネイルはインテ  
グリンや細胞外マトリックスタンパクの発  
現を調節することにより細胞と基質間の接  
着を制御する、第80回生化学会大会 2007  
年12月13日 パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原口 みさ子 (HARAGUCHI MISAKO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准  
教授  
研究者番号 : 10244229

### (2) 研究分担者

小澤 政之 (OZAWA MASAYUKI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教

授

研究者番号 : 90136854

: