

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590358

研究課題名（和文） 基底様乳癌の類器官モデル構築と形態形成機構の解明

研究課題名（英文） Establishment of organoid culture for basal-cell like breast cancer and solving the mechanism to maintain the morphology

研究代表者

清川 悦子 (KIYOKAWA ETSUKO)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80300929

研究成果の概要（和文）：

培養細胞から成る類器官培養法に、ライブイメージング・任意のポイントで発現あるいは局在を変化させる系を併せ、正常上皮構造の形態維持機構およびそれが破綻する際の信号伝達の機構を解明することを目指した。良性病変の再現は出来たが、浸潤・転移を示すような悪性病変の再現は出来なかった。今後は本研究で確立した方法を活用し、複数の遺伝子変異を導入し、より生体に近い癌の分子機構を解明することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Using organoid culture, FRET biosensor-based live imaging, and the inducible system which allows manipulating protein expression and localization, I aimed to reveal signal transduction events which regulate normal cell polarity and morphology of the epithelial structures, and malignant situation where the polarity is disrupted. Although in some cases, benign phenotypes such as adenoma or hyperplasia were reconstituted, no malignant phenotypes including invasion were not observed. It should be noted the systems established in this study is useful to dissect a single gene function in the epithelial cells. Using the systems, we are now ready to reconstitute the cancer situation combining several mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん、FRET、腺腫、極性、イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内信号伝達を構成する蛋白質群・脂質群の同定が過去 30 年程度で精力的に行われてきた。これまでの研究はガラス基盤上の細

胞を観察しており、分子機構の解明に有用であったが、生体とは条件が大きく異なっていることが弱点であった。生体器官は基質に囲まれ高次構造を有しており、例えば乳腺組

織・腎臓・肺などは管腔を形成している。今までこの高次構造形成機構に迫れなかったのは、ひとえに厚みのある試料を可視化する技術の不足によるものであった。申請者はこれまで作成した一連の FRET バイオセンサーと近年発展が目覚ましい蛍光顕微鏡を組み合わせ、生体に近い 3 次元構造の構築過程を生きたままで観察し、高次構造を形成する低分子量 G 蛋白質の分子機構を明らかにしつつあった。また世界的にも、類器官を用いた培養法と各種抗体による免疫染色や RNA 干渉法による蛋白質の発現低下方法が汎用となり、3 次元上皮構造における形態維持の分子機構が明らかにされつつあった。

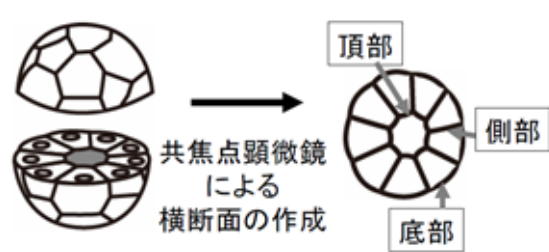
2. 研究の目的

予後が悪く転移能が高い乳癌は、どのような形態をとるのだろうか？本研究課題は、基底様乳癌の類器官モデルを構築し、発癌過程の早期から浸潤する際の形態を制御する信号伝達経路を、生体に近い条件で生きたままで詳細に観察することを目的とする。これにより、乳癌の形態変化・転移機構を理解し、診断に有用な特徴的な形態変化や新たな早期診断マーカー確立の基礎を作り、治療への一助となることを期待する。

また他の臓器の癌で見られる遺伝子異常も導入し、同様の手法で解析し、上皮構造の維持機構の分子基盤を整え、それが破綻する癌の細胞生物学的な理解を深めることも目的とした。

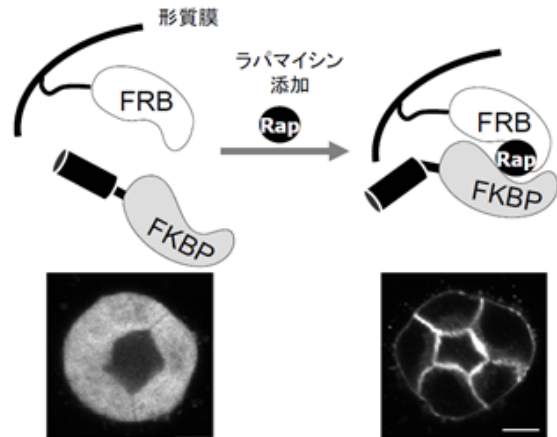
3. 研究の方法

FRET バイオセンサーや蛍光蛋白質を付加した蛋白質を導入した細胞株を用いて、極性をもつ生きた類器官における信号伝達の可視化を共焦点顕微鏡を用いて行う(次図)。



成熟した上皮組織として、イヌ腎尿細管由来の MDCK 細胞や、ヒト乳腺由来の MCF10A 細胞、あるいはマウス乳腺由来の EPH 細胞やその垂株の J3B1 細胞を用いる。変化させる遺伝子としては、BRCA1 の発現を低下させる機能を持つことが知られている Id4、癌での変異が知られている低分子量 G 蛋白質 K-Ras、乳癌・腎癌などで活性化が知られている低分子量 G 蛋白質 Rac1 を用いた。

更に、任意のポイントで発現のオン・オフが出来る植物ユビキチンシステムと、任意のポイントで局在を変化させるラパマイシンによる FRB-FKBP のヘテロオリゴマーシステムを用いて上述の遺伝子を導入し、成熟した組織における形態維持の機構を検索する。



上図下のパネルは蛍光蛋白質を FKBP との融合蛋白質に付加しておき、ラパマイシン添加によって膜移行している実験例を示す。

4. 研究成果

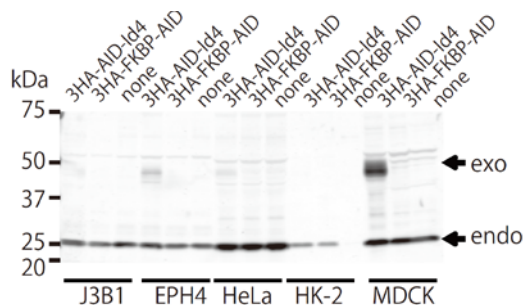
(1) Ras および Rac1b の発現：

任意のポイントで蛋白質の発現変化あるいは局在を変化を引き起こす系として、植物ホルモンによるユビキチンを介した分解系である AID システムを発現する細胞株を構築し、癌で見られる K-Ras の活性型変異体や、前癌病変から特異的に発現が見られる低分子量 G 蛋白質 Rac1 のスプライズバリエント Rac1b を MDCK 細胞から成る成熟した類器官において発現を誘導することに成功した。前者では囊胞壁の一行に並ぶ細胞から内腔に向かって細胞が遊走する現象が観察された。更に下流分子との会合を特異的にするアミノ酸置換を活性化 Ras に導入し、また阻害剤を用いることで、このフェノタイプには Raf および PI3K の両方が必要であることを見出した。またこの時、細胞周期の進行を早くし、アノキスに耐性になっていることを細胞周期の蛍光インディケーターである Fucci、あるいはアポトーシスの際に活性化することが知られている Caspase3 の FRET バイオセンサーを発現する類器官を構築して観察した(論文③)。 Rac1b の場合は、内腔に細胞が入るフェノタイプは観察されるものの有意ではなかった。Rac1b は癌の発生というよりは癌の悪性化あるいは浸潤の過程に関与していることが示唆された(論文①)。

(2) Id4 による基底細胞様乳癌の構築：

乳腺上皮細胞の類器官モデルのための細胞選定を行った。MDCK 細胞、MCF10A 細胞、Eph4 細胞、J3B1 細胞はマトリゲルあるいはコラーゲンゲル内で生体に類似の 3 次元構造を取るが、J3B1 細胞では球状ではなく分岐したチューブ様の構造を取ることが確認された。これら乳腺細胞の他に、ヒト甲状腺由来の N-tyr-ori3-1 細胞、ヒト尿管由来の HK-2 細胞の類器官培養を試みたが、マトリゲル内では極性を持った 3 次元構造を形成することはなかった。

BRCA1 の発現を低下させる Id4 を AID との融合蛋白質として発現する様々な上皮由来の細胞株を構築した。Id4 を発現する乳腺細胞株を樹立したが、内因性の Id4 に比べて過剰に発現した細胞は MDCK 細胞のみで、乳腺細胞における過剰発現の影響は見ることが出来ないと結論した(下図：レトロウイルスに目的の蛋白質を発現するレトロウイルスを作成し、様々な細胞株に感染させた後、発現細胞を薬剤耐性にて選択した。細胞を溶解し、SDS-PAGE で展開し、抗 Id4 抗体にてウェスタンブロットした。矢印と Exo は 3HA-AID-Id4、endo は内因性の Id4 の位置を示す)。



上皮細胞の維持機構はどの細胞でも共通の原理に基づいていると考え、MDCK 細胞の成熟した類器官において、発現誘導をかけたが、発現によるフェノタイプは観察されなかった。類器官を紫外線照射した際にはアポトーシスを抑制する傾向が見られたが、この時 BRCA1 の発現を見てみると Id4 の発現によって変化は見られず、Id4 の機能は BRCA とは独立であることが示唆された。

(3) FRET バイオセンサーによる観察に基づいた上皮形態維持機構の解明：

FRET バイオセンサーを用いた観察では、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性は成熟した組織でアピカル側が低いという結果が得られた。Rac1 の活性化因子、あるいは、不活性化因子を FKBP との融合蛋白質として発現させ、任意のタイムポイントでラパマイシンを添加することで FRB とヘテロオリゴマーを組ませ

ることで局在を変化させる FRB-FKBP の系を用いて、Rac1 の活性を変化させた影響をみたところ、Rac1 のアピカルでの不活性化が解除されると、タイトジャンクションに局在する蛋白質群の分布が乱れ、細胞分裂軸が変化し、細胞が内腔に満ち重層化を示すことが観察された(論文④)。

更に成熟した類器官においてアピカル側で Rac1 の活性を抑えている分子として、キメリンを同定した。これは、類器官形成の初期と後期における RNA の発現をマイクロアレイ法によって比較して得られた情報から、脂質の FRET イメージングによってジアシルグリセロールがアピカル側に濃縮することをヒントに、この脂質に結合するドメインをもつ分子を選択した。キメリンの発現低下のみではフェノタイプは観察されなかったが、増殖因子の刺激を加えると内腔が細胞で埋まることを観察した。この時、基底膜に伸展する突起数は変化がないことから、異なる不活性化分子が細胞のアピカル側・基底側で機能していることが示唆された(論文②)。

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 9 件)

- ① Mori Y., Yagi S., Sakurai A., Matsuda M., Kiyokawa E*: Insufficient ability of Rac1b to perturb cystogenesis. *Small GTPases*:4(1) 9-15, 2013 査読有
- ② Yagi S., Matsuda M., Kiyokawa E*: Chimaerin suppresses Rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. *PLOS ONE*: 7(12), e52258, 2012 査読有
- ③ Sakurai A., Matsuda M., Kiyokawa E*: Activated ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby canine kidney cystogenesis. *J Biol Chem.*: 287(38): 31703-31711, 2012 査読有
- ④ Yagi S., Matsuda M., Kiyokawa E*: Suppression of Rac1 activity at the apical membrane of MDCK cells is essential for cyst structure maintenance. *EMBO Rep*: 13(3), 237-243, 2012 査読有
- ⑤ Kumagai Y., Kamioka, Y., Yagi S., Matsuda M., Kiyokawa E*: A genetically encoded Förster resonance energy transfer (FRET) biosensor for two-photon excitation microscopy. *Anal. Biochem.* 413(2), 192-199, 2011 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 清川悦子 Mechanisms for luminal cell filling detected by fluorescent live imaging 第 71 回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日 北海道 札幌
- ② 清川悦子 Mechanisms for luminal cell filling induced by active Rac and K-Ras 第 34 回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011 年 12 月 13-16 日 横浜
- ③ Sakurai A, Matsuda M, Kiyokawa E Mechanism of Ras-induced polyp formation in vitro FASEB Summer Research Conference on Gastrointestinal Tract XIV 2011 年 8 月 14-18 日 Colorado, USA

[その他]

ホームページ等

<http://medicine-pathol1.kanazawa-med.la-bos.ac/one/>

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~pathol1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清川 悦子 (KIYOKAWA ETSUKO)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80300929