

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659162

研究課題名(和文)細胞極性可視化トランスジェニックマウスを用いた生体内細胞融合の解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of cell polarity during cell-cell fusion

研究代表者

及川 司(Oikawa, Tsukasa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：20457055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：イノシトールリン脂質による細胞極性の可視化を個体に応用するために、イノシトールリン脂質結合ドメインを発現するトランスジェニックマウスの作製を行っている。極性可視化に用いるイノシトールリン脂質結合ドメインの持つ潜在的な毒性を考慮に入れ、発現部位と発現時期をコントロールできる、KH2 ES 細胞からマウスを樹立することを試みている。目的遺伝子を保持するKH2 ES 細胞をエレクトロポレーション法で作出し、選別した。サザンブロットで目的遺伝子の保持を確認し、さらにmRNA、タンパクの発現チェック及び共焦点顕微鏡による蛍光シグナルの確認も行った。

研究成果の概要(英文)：Among various phosphatidylinositols (PI) on the plasma membrane, the most abundant product, PI(4,5)P2 and locally-produced PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 seem to be particularly important in polarity formation of the cells. The PH domain of PLC delta1 binds to PI(4,5)P2 while the PH domain of Akt binds to PI(3,4)P2 and PI(3,4,5)P3, which is locally produced depending on PI3-kinase activity. By using these domains, I succeeded in observing the polarity of fusing cells. To apply this system in vivo, KH2 ES cells which can express those domains fused to GFP or RFP in response to doxycyclin were generated. Now that genetic quality of the ES cells were confirmed, the mice who express the polarity probe is being generated.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：細胞極性

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来細胞とがん細胞の融合が、がんの発生や転移に大きく関与している可能性があるという以下のような報告がある。(1) アルビノマウスにメラノーマ細胞を皮下移植すると肺に転移し、メラニン産生性の黒い腫瘍を形成するが、ここから得られる細胞のDNA量は30-40%増加しており、ジェノタイプも移植がん細胞と宿主とのハイブリッドであることを示す。さらに移植部位の組織病理学的な解析では、移植がんの浸潤部位にはマクロファージの集積が見られる(Chakraborty, A. et al., *Cancer Res.*, 2000)。(2) ミエローマ患者の破骨細胞を観察すると、破骨細胞の核のうち30%以上は、ミエローマ細胞由来の転座した染色体を持つ(Andersen, T. et al., *J. Pathol.*, 2007)。しかし現在のところ、このような細胞融合は「結果」を検出することでしか起こっていることを推測する術はなく、実際にヘテロな細胞融合がいつ、どこで、どのように起こっているのか、融合した細胞はどのように振る舞うのか、という疑問に対しては全く答えることができていない。研究代表者は、イノシトールリン脂質(PI)結合ドメインを用いて細胞極性を可視化することにより、マクロファージ・破骨前駆細胞であるCD11b陽性細胞(以下、CD11b細胞)どうしが融合する際には、細胞膜の融合面に phosphatidylinositol 3(PI3)-kinase 産物 [PI(3,4)P2 や PI(3,4,5)P3]が濃縮し、一方の細胞が他の細胞に浸潤していくようにして融合することを見いだした。PI(3,4)P2 や PI(3,4,5)P3 の濃縮は、がん細胞が間葉系の形質を獲得し、基質に浸潤する際に作る浸潤突起(ポドソーム)の先端にも見られることから、がん細胞が骨髄由来細胞と融合する際にも同じようなメカニズムが働いていると考えられる。そこで細胞極性の可視化を個体に応用し、生体内で直接 CD11b 細胞とがん細胞の融合を捉え、追跡したいと考えるに至った。

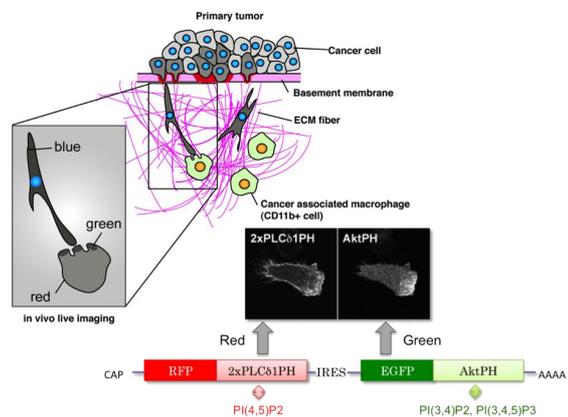
2. 研究の目的

そこで本研究では、CD11b細胞特異的な細胞極性可視化マウスの作製と、これを用いた in vivo 細胞融合の可視化及び、融合細胞の動態解析を行うことを目的とした。このマウスを用いることで、これまで事実上不可能であった生体内細胞融合をライブで可視化でき、初めて「生体内のどこで、どのように細胞融合が起こり、融合細胞がどう振る舞うのか」という疑問に、最も直接的に答えることができるかと期待された。

3. 研究の方法

本研究では以下の手順で CD11b 細胞特異的に細胞極性を可視化するマウスを作製し、CD11b 細胞と移植がん細胞の融合を可視化する。(1) KH2 ES 細胞に、目的遺伝子である蛍光タンパク融合イノシトールリン脂質結合

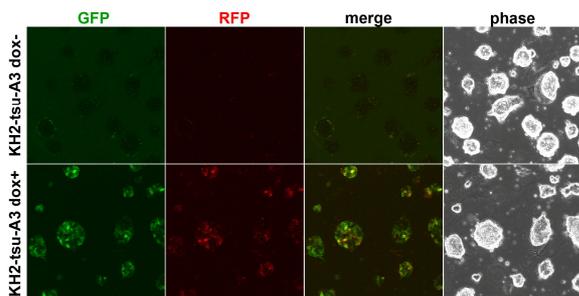
ドメインである、RFP-2xPLC δ 1PH-IRES-EGFP-AktPH(下図)を、DNA組換え酵素 Flippase により特定の遺伝子座に保持させる。KH2 ES 細胞は Rosa26 遺伝子の下流に、抗生物質 doxycyclin を投与すると活性化する転写因子(rtTA)を持っており、目的遺伝子の発現が doxycyclin で誘導できる。さらに、このアレルをクロスアウトし、CD11b 細胞系譜特異的に rtTA を発現するマウスと掛け合わせることで、発現組織を特定の細胞系譜または臓器に限定することができる。(2)CD11b 細胞系統特異的 rtTA 発現マウスの作製。(3)(1),(2)から得られたマウスの乳腺上皮周辺脂肪帯(mammary fat pad)に、BALB/c マウス由来の乳がん細胞株(4T1)を移植し、doxycyclin 投与による CD11b 細胞特異的な極性可視化分子の誘導後、二光子励起顕微鏡を用いてライブ観察する。この時がん細胞は CellTracker blue (invitrogen)でラベルしておく。CD11b 細胞はがん細胞との融合面に、ポドソームが形成されていることを示す green のシグナルを集めると考えられる(下図)。



4. 研究成果

イノシトールリン脂質による細胞極性の可視化を個体に応用するために、イノシトールリン脂質結合ドメインを発現するトランスジェニックマウスの作製を行っている。極性可視化に用いるイノシトールリン脂質結合ドメインの持つ潜在的な毒性を考慮に入れ、発現部位と発現時期をコントロールできる、KH2 ES 細胞からマウスを樹立することを試みている。これは DNA 組換え酵素 Flippase により、染色体の特定の遺伝子座 (CoIA1 下流)に、doxycyclin 感受性プロモーターとともに目的遺伝子を 1 コピーだけ保持させることができるものである(Hochedlinger K. et al. *Cell*, 2005)。さらに KH2 細胞は Rosa26 遺伝子の下流に、抗生物質 doxycyclin を投与すると活性化する転写因子(rtTA)を持っており、目的遺伝子の発現が doxycyclin で誘導できる。このアレルをクロスアウトし、細胞系譜特異的に rtTA を発現するマウスと掛け合わせることで、発現組織を特定の細胞系譜または臓器に限定することができる。ま

ず目的遺伝子を保持する KH2 ES 細胞をエレクトロポレーション法で作出し、選別した。サザンブロットで目的遺伝子の保持を確認し、さらに mRNA、タンパクの発現チェック及び共焦点顕微鏡による蛍光シグナルの確認も行った(下図)。この ES 細胞を aggregation 法で桑実胚に導入し、偽妊娠マウスへ移植し、移植胚由来のマウス(キメラマウス)を得たが、ES 細胞由来の目的遺伝子が生殖細胞を通じて次世代に伝えられる個体はまだ得られていない。用いた ES 細胞の質に問題があると考え、別のストック由来のもの新たに購入し、再度キメラマウスの産生を行っている。



当初の予定よりも大幅に遅れてしまったが、CD11b 細胞系統特異的 rtTA 発現マウスは既に得ているため、この極性可視化トランスジェニックマウスができて次第掛け合わせ、目的のマウスを得、解析を行いたい。

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 5 件)

1. Oikawa T, Nakamura A, Onishi N, Yamada T, Matsuo K, Saya H. : Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer Res*, 73(16), 5100-5109, 2013
査読あり
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0274
2. Oikawa T, Okamura H, Dietrich F, Senju Y, Takenawa T, Suetsugu S. : IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-3T3 cells. *PLoS ONE*, 8(3), e60528, 2013
査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0060528
3. Oikawa T, Kuroda Y, Matsuo K. : Regulation of osteoclasts by membrane-derived lipid mediators. *Cell Mol Life Sci*, 270(18), 3341-3353, 2013
査読あり
doi: 10.1007/s00018-012-1238-4

4. Oikawa T and Matsuo K. : Possible role of IRTKS in Tks5-driven osteoclast fusion. *Commun Integr Biol*, 5(5), 511-515, 2012
査読あり
doi: 10.4161/cib.21252
5. Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, Matsuo K. : Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol*, 197(4), 553-568, 2012
査読あり
doi: 10.1083/jcb.201111116

[学会発表](計 9 件)

1. 及川 司.
“がん-マクロファージ細胞融合による、がん悪性化機構の解析” (招待講演)
第 2 回蛍光バイオイメージングミニシンポジウム、2013 年 9 月 20 日、北海道大学電子科学研究所(札幌市)
2. 及川 司, 尾山大明, 秦 裕子, 中村敦子, 大西伸幸, 上原俊介, 宇田川信之, 山田健人, 佐谷秀行, 松尾光一.
“アダプター分子 Tks5 依存的なポドソーム/インバードポディア形成と、これを介した破骨/がん細胞融合の解析” (口頭発表・シンポジウム)
第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、パシフィコ横浜(横浜市)
3. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Shunsuke Uehara, Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Saya, Koichi Matsuo.
“Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion” (ポスター発表)
ASBMR (American Society for Bone

Mineral Research) 2012 Annual Meeting,
2012年10月11日-15日、Minneapolis
Convention Center (Minneapolis, USA)

4. Tsukasa Oikawa, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential

podosomes/invadopodia mediates

cell-cell fusion” (ポスター発表)

第30回日本骨代謝学会、2012年7月19
日-21日、京王プラザホテル(東京都新
宿区)

5. Tsukasa Oikawa, Atsuko Nakamura,
Koichi Matsuo, Hideyuki Saya

“NFATc1 promotes cancer cell invasion
via altered E-cadherin regulation”

(ポスター発表)

第64回日本細胞生物学会、2012年5月
28日-31日、神戸国際会議場(神戸市)

6. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Saya,
Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)

Bio-Rheumatology International
Congress、2011年11月14日-16日、
Sheraton Grande Tokyo Bay Hotel
(Urayasu, Japan)

7. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Shunsuke Uehara,
Nobuyuki Udagawa, Hideyuki Saya,
Koichi Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates

cell-cell fusion” (ポスター発表)

Podosomes, Invadopodia and Focal
Adhesions in Physiology and Pathology,
2011年9月18日-21日、Ayre Gran Hotel
Colon (Madrid, Spain)

8. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Hideyuki Saya, Koichi
Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)

第29回日本骨代謝学会、2011年7月28
日-30日、大阪国際会議場(大阪市)

9. Tsukasa Oikawa, Masaaki Oyama, Hiroko
Kozuka-Hata, Hideyuki Saya, Koichi
Matsuo.

“Tks5-dependent formation of
circumferential podosomes mediates
cell-cell fusion” (ポスター発表)

第63回日本細胞生物学会、2011年6月
27日-29日、北海道大学(札幌市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/oikawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 司 (Oikawa Tsukasa)
北海道大学 大学院医学研究科 特任講師
研究者番号：20457055

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：