

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380185

研究課題名(和文)細胞外基質の硬さの感知に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism for sensing stiffness of extracellular matrix

研究代表者

木岡 紀幸(Kioka, Noriyuki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90234179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：最近、細胞外基質(コラーゲンなど)の物理的な性質、すなわち硬さが細胞の挙動に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。本研究では、接着斑タンパク質のひとつピンキュリンとビネキシンの相互作用は細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサーとして働いており、硬さに依存した細胞の挙動の調節に関わっていることを明らかにした。また、細胞外基質の硬さはがんの悪性化と密接な関係が示唆されている。そこで、ビネキシンと結合するタンパク質Dlg5について前立腺がん細胞で解析を行ったところ、Dlg5はAkt-Gridin経路を調節することで前立腺がんの悪性化に関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Recent evidences have shown that stiffness of extracellular matrix(ECM) plays a critical role in regulating cell behaviors. Our research has clarified that an interaction of a focal adhesion protein vinculin with another focal adhesion protein vinexin works as a sensor for ECM stiffness. In addition, we have also found that Dlg5, a vinexin-binding protein, regulates cell migration and invasion of prostate cancer cell line via Akt-Gridin pathway. These observations shed light on mechanisms for sensing ECM stiffness and directing cell behaviors.

研究分野：応用細胞生物学

キーワード：細胞外マトリックス コラーゲン メカノバイオロジー がん 接着斑

1. 研究開始当初の背景

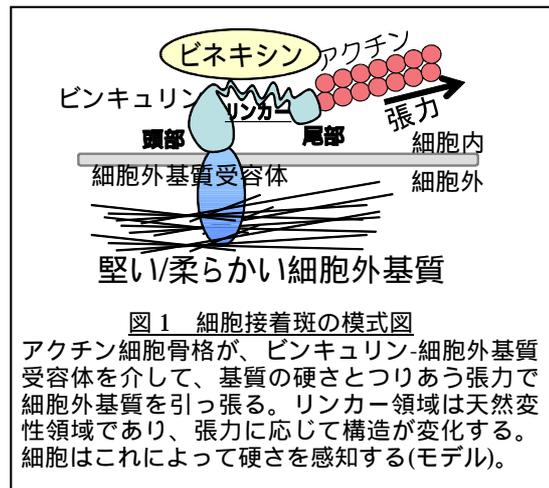
(1)細胞外基質(コラーゲンなど)の硬さが細胞の運命を制御している

ヒトの体は、細胞だけでなくそれを取り巻く細胞外基質(コラーゲンなど)から構成されている。細胞は細胞外基質と接着することで細胞外の環境を感知し、それに基づいて細胞の運命や行動を決定している。例えば、正常細胞は細胞外基質と接着している時のみ増殖し、浮遊状態になるとアポトーシスにより死んでしまう。この仕組みが破綻すると異所性に増殖できるがん細胞となり、浸潤、転移に結びつく。申請者は細胞と細胞外基質との接着領域(細胞接着斑)に局在するタンパク質ピンキュリンとその結合タンパク質ピネキシンが細胞接着の有無を感知する接着センサーとして機能すること、これらが細胞増殖の細胞接着依存性に関わることを明らかにしてきた。最近、細胞接着の有無や細胞外基質分子の種類だけではなく、細胞外基質の物理的な性質、すなわち硬さが細胞の挙動に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。特に、間葉系幹細胞は細胞外基質が骨組織と同程度に硬いと骨細胞へ、脂肪組織と同程度の柔らかさだと脂肪細胞へ分化することや、細胞外基質が硬いと癌が悪性化することが報告され、再生医療や抗がん剤開発といった視点から大きな注目を集めている。現在細胞外基質の硬さを感知する「メカノセンサー」が研究の焦点となっている。細胞は、細胞外基質を接着斑を介して細胞内張力で引っ張り、細胞外基質の硬さに釣り合う張力を知ることによって硬さを感知していると考えられているが、まだその実態はほとんどわかっていない。

(2)メカノセンサー候補の接着斑タンパク質ピンキュリンとピネキシン

接着斑タンパク質のひとつピンキュリンは、細胞内の張力に応じて細胞内局在を変化させることなどから、細胞内張力の感知すなわち細胞外基質の硬さの感知に関わるメカノセンサーである可能性が考えられている。ピンキュリンは頭部と尾部、およびそれらをつなぐリンカー領域からなる(図1)。頭部は細胞外基質受容体と、尾部は細胞内張力を発生するアクチン細胞骨格と結

合する。2010年細胞内でこのリンカー領域に様々な強さの張力が実際にかかっていること(つまり細胞はピンキュリンの尾部と頭部を介して細胞外基質を引っ張っている)が示されたことから、硬さや張力の感知におけるピンキュリン、特にリンカー領域の重要性が注目を集めることになった。しかし、これまでピンキュリンのリンカー領域の機能はほとんどわかっていない



2. 研究の目的

本研究では、ピンキュリンのリンカー領域とピネキシンが細胞外基質の硬さの感知に寄与しているとの証拠を示し、その下流で調節される仕組みを同定する。具体的には、様々な硬さの細胞外基質上で細胞を培養したときに、ピンキュリンの挙動が硬さによって制御されること、およびそれにはピネキシンの結合が必要なことを示す。また細胞外基質の硬さに依存して変化する細胞の挙動に与えるピンキュリンやピネキシンの効果を調べる。さらに、ピネキシンについてより詳細に検討するために、ピネキシンの結合タンパク質の機能についても解析する。このピネキシン結合タンパク質 Dlg5 はがんとの関連が報告されており、前立腺に発現が多いにもかかわらず、前立腺がんでの役割については不明であるので、前立腺がん特に着目して解析する。

3. 研究の方法

異なる硬さの細胞外基質の培養基板は、アクリルアミドゲルを用いた。反応させるビスアクリルアミドの濃度を変えることにより、アクリルアミドの架橋度を調節し、異なる硬さのゲルを作成した。このアクリルアミドにクロスリンカーを用いてI型コラーゲンを付

加し、コラーゲン濃度は一定で硬さが異なるゲルを作成した。

このゲル上にマウス胎児繊維芽細胞を播種し、ピンキュリンの挙動を観察した。ピンキュリンの挙動は、トリトン X100 不溶性と接着斑での滞留性を指標とした。トリトン X100 不溶性のピンキュリンはアクチンをはじめとする多くのタンパク質と複合体を作っていると考えられる。接着斑での滞留性は FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) 法により解析した。細胞の遊走能は、*in vitro* 創傷治癒アッセイと xCelligence を用いた改変ポイデンチャンバ一法で行った。

4. 研究成果

(1) 細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサーとしてのピンキュリンとピネキシンの相互作用

ピンキュリンが細胞外基質の硬さを感知するセンサー、つまりメカノセンサーであるという仮説を考えている。この仮説が正しいのであれば、ピンキュリンの挙動は細胞外基質の硬さによって調節されることが予想される。そこで、異なる硬さの細胞外基質上でマウス胎児繊維芽細胞を培養し、その細胞でのピンキュリンの挙動を観察、評価した。まず、アクリルアミドゲル上で培養した細胞をトリトン X100 を含む緩衝液で洗浄し、トリトン X100 不溶性のタンパク質だけを免疫染色により可視化した。トリトン X100 処理をしない条件下では、ピンキュリンは 3.8kPa の柔らかい培養基板上でも 43kPa の硬い培養基板上でも接着斑に局在していた。一方で、トリトン不溶性のピンキュリンは、43kPa の硬い培養基板上では接着斑にきれいに局在が観察できたが、培養基板が軟らかくなるにつれ、その量が低下し、3.8kPa の基板上では、ほとんどが洗い流されていた。他の接着斑タンパク質であるパキシリンや FAK では硬い培養基板上でも柔らかい培養基板上でもトリトン X100 緩衝液によって洗い流されていた。このことから、ピンキュリンが特異的に培養基板の硬さに応答していることが示唆された。また、FRAP 法により、接着斑におけるピンキュリンのターンオーバーについても検討した。硬い培養基板上では安定的に接着斑に局在して細胞質のタンパク質と入れ替わりが起こらないピンキ

ュリン画分が 3 割程度見られたのに対し、軟らかい培養基板上では、2 割に低下した。このことから、ピンキュリンの挙動は、細胞外基質の硬さによって調節されていることが示された。

次に、細胞外基質の硬さによってピンキュリンの挙動が調節される仕組みを明らかにするために、ピンキュリンのリンカー領域に着目した。リンカー領域には、細胞内で様々な強さの張力がかかっていることが報告されており、細胞外基質の硬さの感知に関わっている可能性があると考えた。この領域に突然変異 P2 を導入したところ、培養基板の硬さを硬くしてもトリトン不溶性画分は低いままであり、しかも、接着斑で安定的に局在するピンキュリン画分も小さいままであった。このことから、ピンキュリンのリンカー領域が細胞外基質の硬さによるピンキュリンの挙動の調節に必要であることが示唆された。

私たちはこれまでにピンキュリンのリンカー領域に別の接着斑タンパク質ピネキシリンが結合することを報告している。そこでピネキシリンの役割について調べるために、ピネキシリン遺伝子破壊細胞を用いてピンキュリンの挙動を調べた。ピネキシリン遺伝子破壊細胞では、硬い培養基板上で細胞を培養しても、ピンキュリンのトリトン X100 不溶性は低いままであり、接着斑で安定的に局在する画分も小さいままであった。このことから、リンカー領域に結合するピネキシリンがピンキュリンの細胞外基質の硬さに応じた挙動の調節に必要であることが示された。

さらに、この仕組みについて調べるために、ピンキュリンとピネキシリンの結合について免疫沈降法によって調べた。その結果、硬い培養基板上ではピンキュリンとピネキシリンは複合体を作っていることが示唆されたが、ミオシン II を阻害して細胞内張力を低下させるとこの複合体量が低下した。また、軟らかい培養基板上では硬い培養基板上に比べ、ピンキュリンとピネキシリンの複合体量が少なかった。このことは、硬い細胞外基質上ではピネキシリンとピンキュリンが結合して機能していることを示唆している。さらに、ピネキシリンの結合がピンキュリンに与える効果について *in vitro* で調べるために、ピンキュリンとピネキシリンを大腸菌で発現、精製した。こ

のタンパク質を用い、FRET 法にてピンキュリンの構造変化に与えるピネキシンの効果について検討した。その結果、ピネキシンの結合は、ピンキュリンをアクチン低親和型の構造から、アクチン高親和型の構造に変化させることがわかった。

ピンキュリン-ピネキシ系が実際に細胞外基質の硬さに依存した細胞の挙動の調節に関わる可能性について検討するために、異なる硬さの培養基板上での細胞遊走を *in vitro* 創傷治癒アッセイにより行った。野生型細胞は、硬い培養基板上で速い遊走能を示したのに対し、軟らかい培養基板上では遅い遊走能しか示さなかった。一方、ピネキシ遺伝子破壊細胞は、硬い培養基板上でも柔らかい培養基板上でも遅い遊走能しか示さず、硬さによる違いが見られなかった。

以上の結果から、ピンキュリンとピネキシンの相互作用は細胞外基質の硬さを調節するメカノセンサーとして働いており、硬さに依存した細胞の挙動の調節に関わっていることが明らかとなった(図2)。

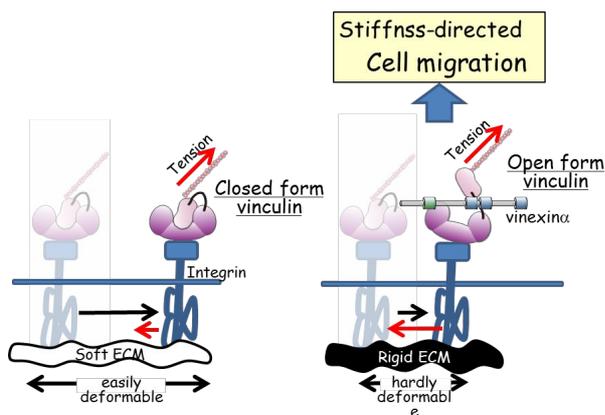


図 2

(2) ピネキシ結合タンパク質 Dlg5 の前立腺がん細胞における機能

細胞外基質の硬さはがんの悪性化と密接な関係が示唆されている。また、ピネキシ結合タンパク質 Dlg5 はがんとの関連が示唆されている。近年日本人男性の前立腺がんの罹患率が大きく上昇しており、Dlg5 が前立腺で高い発現を示すにもかかわらず、Dlg5 の前立腺がんでの役割は不明であった。そこで、ピ

ネキシ結合タンパク質 Dlg5 について前立腺がんでの機能解析を行った。前立腺がん組織を Dlg5 抗体によって免疫染色したところ、正常前立腺組織に比べ、がん組織では Dlg5 の発現が低下していることが示唆された。ただし、進行がんでは特に高い Dlg5 の発現を示す例もあり、複雑な役割を持つ可能性が示された。つぎに、前立腺がん細胞 PC3 を用いて、*in vitro* 創傷治癒アッセイ、xCelligence アッセイ、*in vitro* 浸潤アッセイ、を行ったところ、Dlg5 の発現抑制により、遊走能および浸潤能が上昇することが示唆された。この遊走能、浸潤能の上昇には、Akt 経路が関わることを阻害剤を用いた実験により示唆された。この仕組みについてさらに検討するために、Dlg5 結合タンパク質を探索したところ、Akt の基質 Girdin が単離された。さらに確認したところ、Dlg5 と Girdin は細胞内で一部共局在し、Girdin のリン酸化を抑制していること、Girdin のノックダウンにより、Dlg5 による遊走能の制御が見られなくなることがわかった。これらの結果から、ピネキシ結合タンパク質 Dlg5 は Akt-Girdin 経路を調節することで前立腺がんの悪性化に関わっていることが示された(図 3)。今後この仕組みとピンキュリンおよび細胞外基質の硬さの感知との関連について調べていくことは非常に重要な課題となるであろう。

Dlg5 regulates prostate cancer cell migration via modulation of PI3K/Akt/Girdin signaling

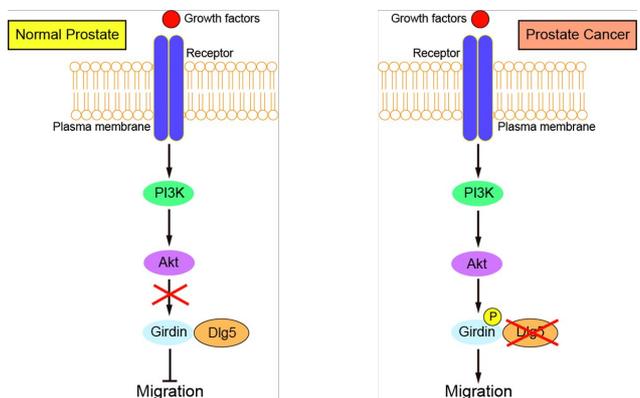


図 3

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 13 件)

1. Tomiyama, L., T. Sezaki, M. Matsuo, K. Ueda, N. Kioka Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation. *Oncogene*. **34** 1141. 2015.

2. Yamashita, H., T. Ichikawa, D. Matsuyama, Y. Kimura, K. Ueda, S.W. Craig, I. Harada, N. Kioka The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin alpha in sensing the stiffness of the extracellular matrix. *J Cell Sci*. **127** 1875. 2014.

3. Chiba, T., T. Sakurada, R. Watanabe, K. Yamaguchi, Y. Kimura, N. Kioka, H. Kawagishi, M. Matsuo, K. Ueda Fomiroid A, a Novel Compound from the Mushroom *Fomitopsis nigra*, Inhibits NPC1L1-Mediated Cholesterol Uptake via a Mode of Action Distinct from That of Ezetimibe. *PLOS One*. **9** e116162. 2014.

4. Takemoto, N., T. Suehara, H.L. Frisco, S. Sato, T. Sezaki, K. Kusamori, Y. Kawazoe, S.M. Park, S. Yamazoe, Y. Mizuhata, R. Inoue, G.J. Miller, S.U. Hansen, G.C. Jayson, J.M. Gardiner, T. Kanaya, N. Tokitoh, K. Ueda, Y. Takakura, N. Kioka, M. Nishikawa, M. Uesugi Small-molecule-induced clustering of heparan sulfate promotes cell adhesion. *J Am Chem Soc*. **135** 11032. 2013.

5. Sezaki, T., L. Tomiyama, Y. Kimura, K. Ueda, N. Kioka Dlg5 interacts with the TGF-beta receptor and promotes its degradation. *FEBS letters*. **587** 1624. 2013.

6. Ohnishi, K., S. Ohkura, E. Nakahata, A. Ishisaka, Y. Kawai, J. Terao, T. Mori, T. Ishii, T. Nakayama, N. Kioka, S. Matsumoto, Y. Ikeda, M. Akiyama, K. Irie, A. Murakami Non-specific protein modifications by a phytochemical induce heat shock response for self-defense. *PLoS one*. **8** e58641. 2013.

7. Chen, K., L. Gao, Y. Liu, Y. Zhang, D.S. Jiang, X. Wei, X.H. Zhu, R. Zhang, Y. Chen, Q. Yang, N. Kioka, X.D. Zhang, H. Li Vinexin-beta protects against cardiac hypertrophy by blocking the Akt-dependent signalling pathway. *Basic*

Res Cardiol. **108** 338. 2013.

[学会発表](計 74 件)

1. 2012.12.15-19 Takafumi Ichikawa, Hiroshi Yamashita, Yasuhisa Kimura, Ichiro Harada, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka Vinculin-vinexin a interaction plays a key role in sensing extracellular matrix stiffness 2012 Annual Meeting of The American Society for Cell Biology San Francisco, CA, USA
ポスター

2. 2013.7.6 市川尚文, 山下寛, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸 細胞外マトリクスの硬さの感知におけるピンキュリン-ピネキシン 相互作用 第 480 回農芸化学会関西支部講演会 大阪 口頭

3. 2013.8.7-9 木岡紀幸 細胞外マトリクスの硬さを感知するメカノセンサーとしての“接着斑” 理研シンポジウム「最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオラマン 2017- 松山 口頭
招待

4. 2014.3.29 喜多真弘、市川尚文、瀬崎拓人、松尾道憲、植田和光、木岡紀幸 結合能と接着斑増強効果を指標としたピネキシンファミリー (Sorbs) タンパク質の機能の比較解析 日本農芸化学会 2014 年度大会 東京 口頭

5. 市川尚文, 山下寛, 木村泰久, 植田和光, 木岡紀幸 ピネキシンの N 末端側領域は細胞外マトリクスの硬さの感知に必要である 日本農芸化学会 2014 年度大会 東京 口頭

6. 長里彩花, 山下寛, 市川尚文, 松尾道憲, 植田和光, 木岡紀幸 接着斑タンパク質ピンキュリンによる細胞外基質の硬さ感知には、ピンキュリンの脂質ラフト局在化が必要である 日本農芸化学会 2014 年度大会 東京 口頭

7. 2014.3.29 黒田美都、和田洋樹、植田和光、木岡紀幸 脂肪細胞分化の「細胞外マトリクスの硬さ」依存性に接着斑タンパク質ピンキュリンが必要である 日本農芸化学会 2014 年度大会 東京 口頭

8. Takafumi Ichikawa, Hiroshi Yamashita, Daisuke Matsuyama, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Susan W. Craig, Ichiro Harada, and Noriyuki Kioka Interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin

alpha in sensing extracellular matrix stiffness International symposium on Mechanobiology 2014 International symposium on Mechanobiology 2014 岡山 山口頭

9. Takafumi Ichikawa, Hiroshi Yamashita, Mito Kuroda, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Ichiro Harada, and Noriyuki Kioka
Interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin alpha in sensing extracellular matrix stiffness 第 66 回日本細胞生物学会 The 66th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 奈良 シンポジウム、若手優秀発表賞選考会、ポスター

10. 黒田美都、和田洋樹、植田和光、木岡紀幸
接着斑タンパク質ピンキュリンは間葉系幹細胞の ECM の硬さ依存的な脂肪細胞分化に必要である 第 19 回日本肥満学会アディポサイエンスシンポジウム 大阪 ポスター

10. 市川尚文、山下寛、木村泰久、植田和光、木岡紀幸
細胞外マトリクスの硬さの感知におけるピンキュリン-ピネキシン 相互作用 平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ 長野 ポスター

11. 梶谷友紀、木村泰久、植田和光、木岡紀幸
軟骨細胞分化における接着斑タンパク質ピネキシンの役割 "2014 年度日本農芸化学会関西支部大会 日本農芸化学会創立 90 周年・関西支部創立 80 周年記念大会奈良 山口頭

12. Lucia Tomiyama, Takuhito Sezaki, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka
Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation 2014 Annual Meeting of The American Society for Cell Biology Philadelphia, Pennsylvania, USA ポスター

13. Takafumi Ichikawa, Masahiro Kita, Takuhito Sezaki, Shian-Huey Chiang, Alan R. Saltiel, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka
Comparison of the effect of the vinexin family proteins on vinculin-mediated mechanosensing 2014 Annual Meeting of The American Society for Cell Biology Philadelphia, Pennsylvania, USA ポスター

14. 2015/3/26-29 木岡紀幸 細胞外基質の硬さを感知するメカノセンサー 日本農芸化学会 2016 年度大会 岡山 シンポジウム

(招待)

15. 2015/3/26-29 日野直也、市川尚文、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 接着斑タンパク質ピネキシンの両親媒性ヘリックスはピンキュリンと相互作用する 日本農芸化学会 2015 年度大会岡山 山口頭

16. 2015/3/26-29 大町朋弘、市川尚文、木村泰久、植田和光、木岡紀幸 細胞外マトリクスの硬さ感知におけるピンキュリンのアクチン繊維結合能の重要性 日本農芸化学会 2015 年度大会岡山 山口頭

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木岡紀幸 (Kioka, Noriyuki)

京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90234179

(2)

連携研究者

原田 伊知郎 (ハラダ イチロウ)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号：00361759

木村 泰久 (キムラ ヤスヒサ)

京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10415143