

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430104

研究課題名(和文)細胞外基質の硬さに誘引される転写調節因子ATF5の活性と浸潤能亢進の機序

研究課題名(英文)Stiff Substrates Enhances ATF5-Signaling-Mediated Invasive Ability in Cancer Cells

研究代表者

芳賀 永 (HAGA, HISASHI)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：00292045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、基質の硬さが誘引するがん細胞の浸潤能との関係を調べ、がん細胞が悪性化する機序の解明を目指した。その結果、基質の硬さによって転写因子ATF5が活性化し、基質接着タンパク質であるインテグリンの発現に關与することでがん細胞の浸潤能が亢進することを明らかとした。さらに、がん細胞株を硬さの異なる基質中で培養したところ、硬い基質上では、ATF5が核内に移行する現象を見出した。加えて、ATF5の欠失変異体をごん細胞に発現させ、核内移行の機序を調べたところ、核外搬出シグナル(NES)が關与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：High matrix stiffness triggers cancer progression; however, detailed molecular mechanisms of this phenomenon are not clear. Hence, it is necessary to identify transcription factors that contribute to malignant alteration in response to increasing substrate stiffness. In this study, we found that activating transcription factor 5 (ATF5) enhances the invasiveness of cancer cells. In addition, we revealed that ATF5 regulates the expression of genes encoding integrins, which are important for substrate stiffness sensing. Based on these observations, ATF5 possibly drives cancer progression due to stiff matrix. We also examined ATF5 localization on substrates with different rigidity. Matrix rigidity affects ATF5 transport to the nucleus.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん細胞 浸潤 メカノセンス 炎症性反応 転写調節因

1. 研究開始当初の背景

細胞が運動することは、生体組織の形成や維持など様々な生命現象において重要な役割を果たす。例えば、胚の発生では、細胞の集団が協調的に特定の位置へ移動することによって組織や器官が形成される。また、組織の一部が傷ついたとき、細胞が傷口に向かって一斉に移動することで組織が再生される。しかし、がん細胞の場合、悪性度が進むにつれて浸潤能を獲得し、生体内を「無秩序」に移動することで生命そのものを脅かすことになる。このことから、がん細胞の浸潤を抑制することは、がんの治療につながると考えられる。しかし、がん細胞の浸潤メカニズムは未だ明らかでない。これまでに、がん細胞の浸潤能が亢進する要因の一つとして、細胞外基質の硬化が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外基質の硬化が炎症性反応をもたらす、がん細胞の浸潤を誘発するという新たな視点から、がん細胞の浸潤能が亢進する機序の解明を目指す。これまでに、悪性化したがん細胞を3次元コラーゲンゲル中で培養し、がん細胞が浸潤する様子を顕微鏡下でリアルタイム観察することに成功している。さらに、培養基質が硬くなると、炎症に関わる転写因子 NF- κ B の活性が上昇することを発見した。様々ながん細胞を硬い基質と軟らかい基質で培養し、NF- κ B のサブユニットである p65 の局在と活性を比較したところ、基質の硬さに依存して炎症性反応が亢進することを見出した。このことは、がん細胞が基質の硬さをストレスと感じ、炎症性の反応を示した結果といえる。そこで、本研究では、基質の硬さが誘引する炎症性反応と浸潤能との関係を調べ、がん細胞が悪性化する機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 肺がん細胞、乳がん細胞、肉腫細胞など数種のがん細胞株を硬さの異なる基質中で培養し、基質との接着タンパク質であるインテグリンの発現及び活性を調べる。さらに、アクトミオシンの収縮力を更新するリン酸化酵素である ROCK、MLCK、ZIPK、ILK を候補としてその活性を調べる。これらの mRNA およびタンパク質の発現をリアルタイム PCR 法、ウェスタン・ブロット法、免疫蛍光染色法を用いて調べ、RNA 干渉法を用いて発現を抑制し、NF- κ B への影響を検証する。

(2) NF- κ B を活性化させたがん細胞において、ATF5 の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いて調べる。さらに、NF- κ B の活性を失活させたがん細胞(ドミナントネガティブ変異株)を硬い基質中で培養し、ATF5 が活性化していないこと、および浸潤能が上昇しないことの2点を検証する。

(3) 基質の硬化に起因する炎症性反応と ATF5 の活性化によって、浸潤に関与するタンパク質であるインテグリンやミオシンの発現が上昇するかどうかを観察する。これらに加え、アクチン結合のタンパク質であるフィラミン、細胞外基質分解酵素である MMP などががん細胞の浸潤を司るといわれている一連のタンパク質の発現(あるいは活性)と ATF5 との関係を調べる。とくに、フィラミンではフィラミン B を、MMP ファミリーの中ではマトリライシン (MMP7) に着目し、ATF5 を過剰発現、あるいは発現抑制したがん細胞株を樹立し、硬さの異なる基質中に3次元培養し、浸潤に関与するタンパク質の mRNA およびタンパク質の発現を調べる。

4. 研究成果

(1) がん細胞株を硬さの異なる基質中で培養し、基質との接着タンパク質であるインテグリンの発現および活性を調べた。その結果、多くのがん細胞株において、インテグリン β 1 の発現と活性が上昇し、さらにインテグリン α 2 の発現が上昇している細胞種も観察された。とくに、食道がん細胞株においては、軟らかい基質中で集団で浸潤する様子を観察することに成功し、さらに、インテグリン β 1 の活性を阻害することで集団としての協調性を失わせることに成功した。次に、アクトミオシンの収縮力を制御するシグナル経路を調べた。培養基質の硬さがもたらす刺激を模倣するために、積極的に細胞に機械的な刺激を加えた。その結果、ROCK というリン酸化酵素が基質の硬さを感知する上で重要な役割を担うことが明らかとなった。

(2) NF- κ B と ATF5 の関係を明確にするには至らなかったものの、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いることで、ATF5 が種々のがん細胞においてインテグリンの転写を制御することを発見した。インテグリンの転写機構はこれまで解明されていなかったもので、この発見は学術的に大きな意義があるといえる。

(3) ヒト大腸がん細胞株において、基質分解酵素の一つであるマトリライシン (MMP-7) の発現が基質の硬さによって誘引されることを見出した。NF- κ B、ATF5 との関係は明確にはならなかったが、インテグリン、細胞内張力、YAP/TAZ という転写シグナル経路が関与している事実を明らかにした。さらに、中間径フィラメントであるケラチンの mRNA の発現が基質の硬さによって上昇するという新たな知見を得た。

(4) 基質の硬さによって ATF5 が核内に移行する現象を見出した。さらに、ATF5 の欠失変異体のがん細胞に発現させ、核内移行の機序を調べたところ、核外搬出シグナル(NES)が関与していることが明らかとなった。これ

らの結果から、ATF5 が基質の硬さによって核内に移行し、インテグリンなどの転写に関与することでがん細胞の浸潤能を亢進することが明らかとなった。

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 11 件)

Akihiro Nukuda, Hiroki Endoh, Motoaki Yasuda, Takemi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga: Role of ATF5 in the Invasive Potential of Diverse Human Cancer Cell Lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol.474, 2016, pp.509-514.
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.04.131

Ayuko Sakane, Shin Yoshizawa, Masaomi Nishimura, Yuko Tsuchiya, Natsuki Matsushita, Kazuhisa Miyake, Kazuki Horikawa, Issei Imoto, Chiharu Mizuguchi, Hiroyuki Saito, Takato Ueno, Sachi Matsushita, Hisashi Haga, Shinji Deguchi, Kenji Mizuguchi, Hideo Yokota, and Takuya Sasakia: Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides ‘law and order’ in collective cell migration, *Molecular Biology of the Cell*, 査読有, Vol.27, 2016, pp.3095-3108.
DOI:10.1091/mbc.E16-05-0332

Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, and Kazushige Kawabata: Data Set for Comparison of Cellular Dynamics between Human AAVS1 Locus-modified and Wild-type Cells, *Data in Brief*, 査読有, Vol.6, 2016, pp.793-798.
DOI:10.1016/j.dib.2015.12.053

Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga: An Improved Method for Western Blotting When Extracting Proteins from Mammalian Cells Cultured on a Collagen Gel under Serum-free Conditions, *Cytotechnology*, 査読有, Vol.68, 2016, pp.25-32.
DOI:10.1007/s10616-014-9766-4

Tamaki Yamada, Masumi Tsuda, Takanori Wagatsuma, Yoichiro Fujioka, Mari Fujioka, Aya O. Satoh, Kosui Horiuchi, Shinya Nishide, Asuka Nanbo, Yasunori Totsuka, Hisashi Haga, Shinya Tanaka, Masanobu Shindoh & Yusuke Ohba: Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.6, 2016, 23545, pp.1-16.
DOI:10.1038/srep23545 cancers

Takeomi Mizutani, Rui Li, Hisashi Haga, and Kazushige Kawabata: Transgene Integration into the Human AAVS1 Locus Enhances Myosin

II-Dependent Contractile Force by Reducing Expression of Myosin Binding Subunit 85, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol.465, №2, 2015, pp.270-274.

DOI:10.1016/j.bbrc.2015.08.018

Yuta Iguchi, Seiichiro Ishihara, Yoshimi Uchida, Kaori Tajima, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga: Filamin B enhances the invasiveness of cancer cells into 3D collagen matrices, *Cell Structure and Function*, 査読有, Vol.40, 2015, pp.61-67.
DOI:10.1247/csf.15001

Akihiro Nukuda, Chie Sasaki, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kiminori Nakamura, Tokiyoshi Ayabe, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga: Stiff Substrates Increase YAP-Signaling-Mediated Matrix Metalloproteinase-7 Expression, *Oncogenesis*, 査読有, Vol.4, 2015, pp.e165.
DOI:10.1038/oncsis.2015.24

Seiichiro Ishihara, Motoaki Yasuda, Akihiro Ishizu, Masayori Ishikawa, Hiroki Shirato, and Hisashi Haga: Activating Transcription Factor 5 Enhances Radioresistance and Malignancy in Cancer Cells, *Oncotarget*, 査読有, Vol.6, 2015, pp.4602-4614.
DOI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25682872>

Kenji Takemoto, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga: Compressive Stress Induces Dephosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain via RhoA Phosphorylation by the Adenylyl Cyclase/Protein Kinase A Signaling Pathway, *PLOS ONE*, 査読有, Vol.10, 2015, e0117937 pp.1-17.
DOI:10.1371/journal.pone.0117937

Naoya Yamaguchi, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga: Leader Cells Regulate Collective Cell Migration via Rac Activation in the Downstream Signaling of Integrin Beta1 and PI3K, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.5, №7656, 2015, pp.1-8.
DOI:10.1038/srep07656

[学会発表] (計 9 件)

Akihiro Nukuda, Motoaki Yasuda, and Hisashi Haga: Role of ATF5 in cancer cell invasion of several diverse human cancer cell lines, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Toshiki Takahashi, Akihiro Nukuda,

Masayuki Kano, Hisahiro Matsubara, and Hisashi Haga: Fascin-1 promotes cancer cell invasion via activation of Stat3, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

温田 晃弘, 安田 元昭, 水谷 武臣, 川端 和重, 芳賀 永: 転写因子 ATF5 による多様ながん細胞株の浸潤促進, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016 年 6 月 14 日, 京都テルサ (京都府京都市)

Akihiro Nukuda, Niroke Endo, Seiichiro Ishihara, Motoaki Yasuda, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, and Hisashi Haga:

Activating transcription factor 5 promotes cancer cell invasion through transcriptional activation of integrins, 2015 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 12th-16th December, 2015, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Akihiro Nukuda, Seiichiro Ishihara, Motoaki Yasuda, and Hisashi Haga: Activating

transcription factor 5 promotes invasion of cancer cells via transcriptional activation of integrins, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

温田 晃弘, 石原 誠一郎, 水谷 武臣, 中村 公則, 綾部 時芳, 川端 和重, 芳賀 永: 基質の硬さによって促進される大腸がん細胞の悪性化: 転写因子 YAP を介した基質分解酵素 MMP-7 の発現亢進, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015 年 7 月 1 日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

Seiichiro Ishihara, Motoaki Yasuda, Tsuyoshi Nishioka and Hisashi Haga: Activating

Transcription factor 5 enhances radioresistance and malignant phenotypes in lung cancer cells, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Hiroki Endoh, Seiichiro Ishihara, Tsuyoshi Nishioka, Motoaki Yasuda, and Hisashi Haga:

Invasive ability is regulated by activating transcription factor 5 in high invasive cancer cells, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Akihiro Nukuda, Seiichiro Ishihara, Kiminori Nakamura, Tokiyoshi Ayabe, and Hisashi Haga:

Substrate stiffness enhances expression of matrix metalloproteinase 7 via myosin phosphorylation in colon cancer cells, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 永 (HAGA HISASHI)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 00292045

(2) 研究分担者

なし