

令和元年5月30日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11146

研究課題名(和文) 3細胞間局在ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP蛋白複合体の役割

研究課題名(英文) The role of ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP-protein complex at tricellular contacts of normal and cancer cells

研究代表者

郷久 晴朗 (SATOHISA, SEIRO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10721459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌悪性化における3細胞間局在ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP蛋白複合体の役割について解明した。LSR、ASPP2は内膜癌組織で悪性度とともに発現低下がみられた。癌細胞株では、LSR発現低下によりTEAD1/AREGを介し癌細胞遊走浸潤を亢進した。このメカニズムは1)Hippo pathway、2)AMOT/Merlin経路が考えられた。ASPP2発現低下によりLSR発現低下、YAPリン酸化亢進、癌細胞遊走浸潤を亢進した。正常ヒト子宮内膜上皮細胞では、LSRとASPP2は同様の局在、発現調節がみられた。以上より3細胞間蛋白複合体は子宮内膜癌の悪性化を抑制すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP蛋白複合体の正常および癌細胞における役割の解明は、今までにない新しいアプローチであり、今まで解明されていなかった脂質代謝と正常上皮バリアおよび癌の悪性化の関係も明らかになる。最終的には、ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP蛋白複合体をターゲットとした癌の悪性化の予防および分子標的治療にも繋がり社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found the role and the regulatory mechanisms of ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP-protein complex in the malignancy of cancer cells. In human endometrial cancer tissues, LSR and ASPP2 downregulated during the malignancy. In human endometrial cancer cell line, downregulation of LSR promoted cell migration and cell invasion via transcriptional factor TEAD1/AREG. The mechanisms may be two pathways: 1) the Hippo pathway and 2) YAP/AMOT pathway. Downregulation of ASPP2 decreased LSR, increased phosphorylation of YAP and enhanced cell migration and cell invasion. In normal human epithelial cells derived from the surgery, expression, distribution and regulation of both LSR and ASPP2 were almost similar. Taken together, ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP-protein complex are formed at tricellular contacts and they may prevent the malignancy of endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 正常子宮内膜上皮細胞 ASPP2 悪性化 Hippo pathway TEAD1/AREG LSR YAP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝関連因子である lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)は、最近上皮細胞の3細胞間に局在する膜蛋白として再発見され、3細胞間のバリア機能を調節しているタイト結合分子 tricellulin の局在を調節するなど上皮バリア形成および維持において重要な分子として考えられている。さらに LSR が一部の癌細胞の浸潤および遊走に關与することが報告されている。このことは、LSR は、重要で且つ動的な多機能分子と考えられる。

LSR は、3細胞間において様々な機能分子と相互作用をしている可能性がある。特に癌抑制遺伝子 p53 の細胞死誘導を担い、最近上皮細胞極性分子と会合がみられる apoptosis stimulating proteins of p53 (ASPP) family である ASPP2 は、我々の実験において3細胞間で LSR と共局在し、LSR の発現を調節していた。ASPP2 は子宮内膜癌において発現の低下も報告されている。さらに LSR は、癌抑制作用をもつタイト結合様分子群 angiomomtin (AMOT)/merlin (NF2) および正常細胞の大きさと数を制御し癌幹細胞の増殖にも關与がみられる Hippo pathway の中心分子である YAP/TAZ と膜下で複合体を形成し上皮のホメオスターシスの維持を行っている可能性がある。以上 LSR に焦点を当てた ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP の蛋白複合体の調節および機能の解明は、正常および癌細胞集団における3細胞間発現分子の役割を考える上で非常に重要である。

2. 研究の目的

今回我々は、我々が確立したヒト正常子宮内膜上皮細胞 (Someya et al., 2013) および LSR を高発現している子宮内膜癌細胞株 (Sawano) を用いて、ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP 蛋白複合体の正常および癌細胞集団における役割および発現調節メカニズム (機能、発現調節、分子間相互作用) を多面的に解析する。さらに肥満との関係についても解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト剖検材料を用いて前癌組織 (PanIn、子宮内膜症) および癌組織 (膀胱癌および子宮内膜癌) における LSR、ASPP2、claudin-1 の発現および局在の変化を悪性度 EMT (epithelial-mesenchymal transition) マーカー (Snail, Slug, ZEB) と比較検討する。

(2) LSR を高発現している癌細胞株 (子宮内膜癌細胞株 Sawano、膀胱癌細胞株 HPAC) を用いて、LSR の癌細胞の浸潤および遊走における役割およびそのメカニズムを解明する。

Hippo pathway (YAP/AMOT/merlin) を介した経路

タイト結合分子 claudin-1 を介して MMP 1 を増加させる経路

(3) LSR を高発現している癌細胞株を用いて、LSR を介した肥満との関係をみる。leptin、adiponectin、metformin 処置による LSR の発現調節機構をシグナル伝達経路 (JAK/Stat, AMPK/LKB1/mTOR, PI3K/MAPK/NF-kB) に焦点を当て解析する。さらに metformin 処置による癌細胞の遊走および浸潤の効果を見る。

(4) LSR に細胞外から特異的結合するリガンド Angubindin-1 を作製処置し LSR の機能特にバリア機能を阻害した時の癌細胞の遊走・浸潤の変化を解析する。

(5) LSR と同様に3細胞間に局在がみとめられ、LSR の発現を調節可能な Apoptosis-stimulating p53 protein 2 (ASPP2) を siRNA を用いて発現低下させた時の癌細胞の遊走・浸潤の変化を解析する。

(6) ASPP2 に対する特異的抗体を作製処置し ASPP2 の機能阻害した時の癌細胞の遊走・浸潤の変化を解析する。

(7) 正常培養ヒト上皮細胞 (子宮内膜上皮細胞) を用いて、siRNA により LSR および ASPP2 の発現を低下させ、他のタイト結合分子の変化をみる。

4. 研究成果

(1) 免疫染色により前癌組織 (子宮内膜症) および癌組織 (子宮内膜癌) から LSR の局在変化がみられ、悪性度とともにその発現は低下していた。ASPP2 においても同様な変化がみられた。LSR の発現が低下している子宮内膜癌の浸潤部において一部 claudin-1 の発現亢進もみられた。

(2) 癌細胞株 (子宮内膜癌細胞株 Sawano) において、siRNA による LSR の発現低下が、転写因子 TEAD1/増殖因子 AREG を介して癌細胞の遊走、浸潤を亢進していた。

(3) LSR の発現低下による癌細胞の浸潤および遊走の亢進メカニズムとして a) Hippo pathway (YAP/AMOT/merlin) を介した経路、b) タイト結合分子 claudin-1 誘導を介して MMP 1 を増加させる経路が認められた。

(4) 子宮内膜癌細胞株に leptin、adiponectin、metformin 処置した結果、leptin 処置で LSR の発現低下、adiponectin および metformin 処置で LSR の発現亢進がみられた。これらの発現変化は、JAK2/SAT をはじめとした様々なシグナル伝達経路で調節されていた。さらに metformin 前処置は、siRNA および Leptin 処置による LSR の低下を阻害し、癌細胞の遊走および浸潤の亢進も阻害した。

(5) 子宮内膜癌細胞株を用いて ASPP2 を siRNA により発現低下させた結果、LSR の発現低下とともに癌細胞の遊走・浸潤の亢進がみられた。

(6) 正常培養ヒト上皮細胞（子宮内膜上皮細胞、腓管上皮細胞）を用いて、siRNA により LSR の発現を低下させ結果、claudin-1 の発現誘導がみられた。さらに正常子宮内膜上皮細胞に leptin、adiponectin、metformin 処置した結果、子宮内膜癌細胞株同様に leptin 処置で LSR の発現低下、adiponectin および metformin 処置で LSR の発現亢進がみられた。

(7) ASPP2 は子宮内膜癌組織において、悪性度とともに LSR および PAR3 同様に発現の低下がみられた。

(8) 子宮内膜癌細胞株において、LSR、Tricellulin および PAR3 と共局在がみられた。さらに細胞密度により局在の変化がみられ、高密度において一部 3 細胞間に発現が認められた。

(9) 子宮内膜癌細胞株を用いて ASPP2 を siRNA により発現低下させた結果、LSR の発現低下、claudin-1、-4、-7 の発現亢進がみられた。さらに LSR の発現低下細胞同様に、癌細胞の遊走・浸潤の亢進もみられた。

(10) 子宮内膜癌細胞株を用いて ASPP2 を siRNA により発現低下させた結果、LSR の発現低下細胞同様に、YAP のリン酸化亢進がみられた。さらに ASPP2 および YAP の siRNA 同時処置により癌細胞の遊走・浸潤の亢進は抑制された。

(11) ASPP2 に対する特異的抗体を作製し、子宮内膜癌細胞株に処置した結果、claudin-1、-4、-7 の発現亢進および YAP のリン酸化亢進がみられた。さらに抗体処置により、YAP 依存性の癌細胞の遊走・浸潤の亢進もみられた。

(12) ASPP2 の発現低下および ASPP2 抗体処置により 3 細胞間 F-actin の変化がみられた。

(13) 子宮内膜癌細胞株を用いて高濃度グルコース培地、Leptin および Adiponectin 処置、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(TSA, HDAC1 および HDAC6 特異的阻害剤)により ASPP2 の発現および局在の変化がみられた。

(14) 手術よりえられた正常培養ヒト子宮内膜上皮細胞を用いて、ASPP2 の発現および局在をみた結果、LSR と同様の発現および局在がみられ、ASPP2 の発現低下により、LSR 同様 claudin-1、-4 の発現亢進がみられた。

以上のことは、新規 3 細胞間タイト結合分子 LSR の低下は複雑なメカニズムで癌細胞の悪性化に密接に関与していることが考えられた。さらに ASPP2 においては、2 細胞間だけでなく 3 細胞間においても ASPP2/LSR/YAP 蛋白複合体を形成し、子宮内膜癌の悪性化を抑制していると考えられた。3 細胞間局在 ASPP2/LSR/AMOT/Merlin/YAP 蛋白複合体の発現変化は、一部癌の補助診断に有用であり、分子標的治療のターゲットになる可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shimada H, Satohisa S, Kohno T, Konno T, Takano K, Takahashi S, Hatakeyama T, Arimoto C, Saito T, Kojima T. Downregulation of LSR promotes cell invasion via claudin-1-mediated MMPs in human endometrial cancer. *Oncology Letters* 2017 14:6776-6782.

Shimada H, Abe S, Kohno T, Satohisa S, Konno T, Takahashi S, Hatakeyama T, Arimoto C, Kakuki T, Kaneko Y, Takano K, Saito T, Kojima T. Loss of tricellular tight junction protein LSR promotes cell invasion and migration via upregulation of TEAD1/AREG in human endometrial cancer. *Sci Rep.* 2017 7:10935.

Shimada H, Satohisa S, Kohno T, Takahashi S, Hatakeyama T, Konno T, Tsujiwaki M, Saito T, Kojima T. The roles of tricellular tight junction protein lipolysis-stimulated lipoprotein receptor in malignancy of human endometrial cancer cells. *Oncotarget* 2016

Mar 28.

〔学会発表〕(計12件)

嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、幸野貴之、小島隆、齋藤豪 子宮内膜癌の悪性化における ASPP2 の役割 第71回日本産科婦人科学会名古屋 4月11-14日 2019年

小島隆、嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、齋藤豪、幸野貴之 子宮内膜癌の悪性化における ASPP2 の役割 第41回日本分子生物学会 横浜 11月28日-30日 2018年

金野匠、嶋田浩志、郷久晴朗、齋藤豪、幸野貴之、小島隆 3細胞間タイト結合分子 Angulin-1/LSR リガンド Angubindin-1 による上皮バリア調節機構 第41回日本分子生物学会 横浜 11月28日-30日 2018年

金野匠、幸野貴之、菊池真、嶋田浩志、郷久晴朗、齋藤豪、近藤昌夫、小島隆 3細胞間タイト結合分子 LSR リガンド Angubindin-1 による JNK/cofilin/actin を介した上皮バリア調節機構 第13回日本臨床ストレス応答学会 小樽 10月26-27日 2018年

Seiro Satohisa, Hiroshi Shimada, Takayuki Kohno, Takumi Konno, Masato Tamate, Motoki Matsuura, Mizue Teramoto, Taishi Akimoto, Masahiro Iwasaki, Takashi Kojima, Tsuyoshi Saito The role of claudin-2 on the malignancy of human endometrioid carcinoma ESGO Sate of the Art Conference(国際学会) Lyon 10月4日-6日 2018

金野匠、嶋田浩志、郷久晴朗、齋藤豪、幸野貴之、小島隆 3細胞間タイト結合分子 LSR の発現低下によるがん細胞の悪性化機序 第107回日本病理学会 ワークショップ 札幌 6月21日-23日 2018年

金野匠、幸野貴之、菊池真、嶋田浩志、郷久晴朗、齋藤豪、小島隆 細胞質分裂における3細胞間タイト結合分子の局在と役割 2017年生命科学系学会合同年次大会 12月6-9日 2017年

嶋田浩志、金野匠、郷久晴朗、阿部秀悦、幸野貴之、齋藤豪、小島隆 子宮内膜癌(endometrioid)におけるタイト結合分子 claudin-2 の役割 第49回日本臨床分子形態学学会 9月15,16日 2017年

郷久晴朗、嶋田浩志、阿部秀悦、玉手雅人、岩崎雅宏、寺田倫子、鈴木美和、寺本瑞絵、田中綾一、小島隆、齋藤豪 3細胞間タイト結合分子 LSR は AMOT により活性化された Hippo pathway を介して子宮内膜癌の悪性化に関与する 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 7月27-29日 2017年

阿部秀悦、嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、齋藤豪、幸野貴之、小島隆 3細胞間タイト結合蛋白 LSR は YAP/AMOT/merlin を介して子宮内膜癌の悪性化へ関与する 第69回日本細胞生物学会 6月13-15日 2017年

金野匠、幸野貴之、及能大輔、嶋田浩志、郷久晴朗、角木拓也、金子躍人、高野賢一、齋藤豪、小島隆 がん細胞の上皮バリアおよび悪性化における糖代謝の役割 第68回日本細胞生物学会 6月13-15日 2017年

嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、有元千尋、高橋俊太、畠山翔翼、幸野貴之、齋藤豪、小島隆 LSR/YAP/AMOT/merlin による子宮内膜癌の悪性化への関与 第48回日本分子形態学学会 9月 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小島 隆

ローマ字氏名：KOJIMA takashi

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：30260764

研究分担者氏名：齋藤 豪

ローマ字氏名：SAITO tsuyoshi

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90145566

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。