

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06138

研究課題名(和文)がん細胞浸潤突起における小胞輸送と微小管, アクチン繊維のクロストーク

研究課題名(英文)A crosstalk between membrane trafficking and cytoskeletons in invadopodia in cancer cells

研究代表者

井上 弘樹 (Inoue, Hiroki)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：10294448

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文): 浸潤突起は、がん細胞が形成するアクチン繊維に富む細胞膜の突起構造で細胞外基質分解活性を有し、がん細胞の浸潤転移において重要な役割を果たす。浸潤突起の形成と機能には微小管とアクチン繊維の相互作用が不可欠であるが、その分子メカニズムは十分明らかになっていない。また、浸潤突起には小胞輸送により細胞外基質分解酵素などが極性輸送されるがその制御機構についても未解明の点が多く残されている。本研究では、微小管とアクチン繊維のクロストークに関わるMAPタンパク質と浸潤突起への細胞外基質分解酵素の輸送に関わるSNAREタンパク質に特に注目し、浸潤突起形成および浸潤転移機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんによる死因の90%は、がん細胞の浸潤・転移が関係している。乳がんにおいても、転移の無い場合の5年生存率は99%だが、転移すると27%に低下する。本研究は、悪性度の高い乳がん細胞の浸潤転移に関わる機構の一端を分子レベルで解明したものであり、学術的な意義にとどまらず、新規の診断・治療標的として利用できる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文): Invadopodia in invasive cancer cells are actin-enriched structures with an ability to degrade extracellular matrix (ECM) and play crucial roles in invasion and metastasis. A formation of functional invadopodia may require a crosstalk between microtubules and actin filaments, but the molecular mechanisms are not fully understood. In addition, regulatory mechanisms of the polarized transport of metalloproteinases degrading ECM at invadopodia remain elusive. In this study, we have focused on the microtubule-associated protein (MAP) that is associated with the crosstalk between microtubules and actin filaments and the SNARE proteins that function in the transport of metalloproteinases to invadopodia and revealed a part of the molecular mechanisms of invadopodia formation followed by cancer metastasis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：浸潤突起 微小管 アクチン 小胞輸送 細胞外基質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞が形成する浸潤突起は、アクチン繊維に富む細胞膜の微細な突起状構造で、コラーゲン等の細胞外基質 (ECM) を分解する活性を有する。ECM から成る基底膜はがん細胞が転移する際の物理的な障壁となるため、浸潤突起の形成とそれに伴う ECM の分解はがん細胞の浸潤転移を左右する重要なステップの一つであると考えられている。浸潤突起の形成はインテグリンを介した細胞接着や EGF, TGF $\beta$  といった増殖因子などの細胞外シグナルに応答して始まり、Src, N-WASP, cortactin, Arp2/3, イノシトールリン脂質などのシグナル伝達ネットワークによってアクチン繊維の局所的な重合が促進されることにより行われる。

浸潤突起の形成が開始されると、cortactin や Arp2/3 の働きによりアクチン繊維の分岐が促進され、細胞膜が ECM に突出した構造を取るようになる。その後、浸潤突起に微小管が挿入され、浸潤突起における細胞外基質分解で中心的な役割を果たす膜結合型タンパク質分解酵素 MT1-MMP が微小管上を輸送小胞に乗って浸潤突起まで運ばれ、膜融合により細胞外に表出することで ECM の分解が引き起こされる。がん細胞の浸潤転移を理解し、制御するためには、これら一連の過程で働く分子メカニズムの解明が不可欠であるが、近年の精力的な研究にも関わらず、現在まで未解明の点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

MT1-MMP を運ぶ輸送小胞と細胞膜の融合には、ヒトゲノム中に 40 種存在する膜融合タンパク質 SNARE のうち、VAMP7、STX4、SNAP23 が機能することが既に報告されているが、申請者は、現在までに、それらに加えて Bet1 と Vti1b が浸潤性乳がん細胞特異的な新規 SNARE 複合体として機能している可能性があることを見出している。本研究では、Bet1 と Vti1b が MT1-MMP を浸潤突起に輸送する新規 SNARE 分子として実際に機能しているのか、また、そうであるとすれば、その分子メカニズムや制御の機構を明らかにすることを第一の目的とした。

浸潤突起の形成とそれに引き続き起こる ECM の分解では、アクチン繊維と微小管が協動的に相互作用し機能することが欠かせないが、その機構はこれまでのところ十分明らかになっていない。また、浸潤突起における細胞骨格と上述のような小胞輸送のクロストークについてもほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、浸潤突起形成において微小管とアクチン繊維の相互作用を仲介し、浸潤突起の形成とがん細胞の浸潤転移において重要な役割を果たす分子を新たに同定し、その分子メカニズムを明らかにすることを第二の目的とした。本研究は、これら学問的に未解明で、臨床にも深く関わる問題に対して新規分子を同定し、細胞骨格と小胞輸送のクロストークという新しい切り口から解析を試みる点で独自性・創造性を有している。

### 3. 研究の方法

本研究では、主に以下に示す細胞生物学的手法、生化学的手法、分子生物学的手法、免疫学的手法により行なった。

RT-PCR 法

ドミナントネガティブ変異体の過剰発現

Gelatin degradation assay

siRNA を用いた発現抑制

CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊

## イムノプロットティング

免疫染色

生細胞イメージング

安定発現株の樹立

免疫沈降

Proximity ligation assay (PLA) 法

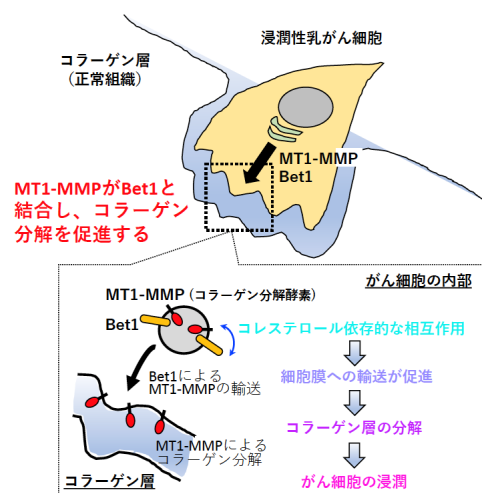
Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法

## 4. 研究成果

### 1) 新規 Bet1 SNARE 複合体による浸潤突起への MT1-MMP 輸送機構

研究代表者は、浸潤性乳がん細胞において発現する SNARE タンパク質 36 種を同定し、それらの dominant negative mutant の過剰発現が浸潤突起における細胞外基質分解に与える影響を評価することにより、浸潤突起への MT1-MMP の輸送に関わる可能性がある SNARE タンパク質をスクリーニングした。その結果、MT1-MMP の輸送に関わる既知の SNARE タンパク質に加えて、Bet1 を同定した。その細胞内局在を調べたところ、通常、小胞体-ゴルジ体間で機能する SNARE である Bet1 が浸潤性乳がん細胞株では MT1-MMP 陽性エンドソームに局在することを見出した。

Bet1 の発現抑制は MT1-MMP の細胞膜への局在化と細胞外基質分解を抑制し、逆に、過剰発現はそれらを促進した。その分子メカニズムを明らかにするため、両者の相互作用を検討したところ PLA 法と BiFC 法により両者の相互作用が認められた。この相互作用はコレステロール除去や caveolin-1 の発現抑制により有意に抑制された。Bet1 と MT1-MMP の膜貫通ドメインにはコレステロール認識モチーフ様の配列が存在しており、それらの変異体では両者の結合が低下した。以上の結果から、Bet1 はコレステロール依存的な相互作用を介して MT1-MMP の細胞膜への効率的な輸送に機能していることが示唆された。



### 2) 微小管結合タンパク質による浸潤突起形成制御機構

アクチン繊維と微小管の協調的相互作用を制御する分子はそれ自身が微小管とアクチン繊維の双方に結合する能力を持つことが期待されるが、研究代表者は、そのような分子の候補として MAP ファミリーのタンパク質に着目した。研究代表者は、これら MAP ファミリーの分子が転移性がん細胞株で発現しているか、また、転移性がん細胞株の浸潤能とその発現パターンに

相関があるかをイムノプロットングにより解析した。その結果、解析した一つの MAP タンパク質は転移性がん細胞でのみ高い発現が認められた。浸潤性乳がん細胞株におけるこの発現パターンはがん浸潤の主要因子である MT1-MMP と良く類似しており、このタンパク質が浸潤突起形成およびがんの浸潤に関与することを強く示唆する。

この MAP タンパク質が浸潤突起形成で必須の機能を果たしているかどうかを明らかにするため、発現抑制細胞において浸潤突起形成と細胞外基質分解活性を評価した。その結果、MAP タンパク質の発現抑制により浸潤突起形成と細胞外基質分解活性ともに強く抑制された。さらに、CRISPR/Cas9 法により MAP タンパク質の遺伝子破壊細胞を作製し、遺伝子破壊細胞においても浸潤突起形成と細胞外基質分解活性が強く抑制されることを確認した。この遺伝子破壊細胞では、*in vitro* の細胞増殖が抑制される傾向が認められ、*in vivo* (ヌードマウス) の造腫瘍活性も有意に低下した。

MAP タンパク質による浸潤突起形成の分子メカニズムを明らかにするため、浸潤突起関連タンパク質との相互作用を解析した。その結果、浸潤突起を構成するアクチン重合促進タンパク質と相互作用することを見出した。また、この浸潤突起構成タンパク質が微小管と相互作用することも見いだした。さらに、詳細な分子メカニズムを明らかにするため、免疫沈降と質量分析により結合タンパク質を網羅的に解析したところ、これら浸潤突起構成タンパク質に加え、細胞接着の制御や細胞外基質分解酵素の小胞輸送に関わるタンパク質とも相互作用する可能性が示唆された。現在、これら結合について評価を行っており、細胞骨格と小胞輸送のクロストークにおけるそれら複合体の詳細な機能の解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakana, Y., Hayashi, K., Nemoto, T., Watanabe, C., Taoka, M., Angulo-Capel, J., Garcia-Parajo, M. F., Kumata, H., Umemura, T., Inoue, H., Arasaki, K., Campelo, F. and Tagaya, M.	4. 巻 220
2. 論文標題 The ER cholesterol sensor SCAP promotes CARTS biogenesis at ER-Golgi membrane contact sites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e202002150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202002150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyagawa, T.,* Hasegawa, K.,* Aoki, Y.,* Watanabe, T.,* Otagiri, Y., Arasaki, K., Wakana, Y., Asano, K., Tanaka, M., Yamaguchi, H., Tagaya, M. and Inoue, H. (*, These authors contributed equally to this work.)	4. 巻 218
2. 論文標題 MT1-MMP recruits the ER-Golgi SNARE Bet1 for efficient MT1-MMP transport to the plasma membrane.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 3355-3371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201808149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugo Masashi, Kimura Hana, Arasaki Kohei, Amemiya Toshiki, Hirota Naohiko, Dohmae Naoshi, Imai Yuzuru, Inoshita Tsuyoshi, Shiba Fukushima Kahori, Hattori Nobutaka, Cheng Jinglei, Fujimoto Toyoshi, Wakana Yuichi, Inoue Hiroki, Tagaya Mitsuo	4. 巻 37
2. 論文標題 Syntaxin 17 regulates the localization and function of PGAM5 in mitochondrial division and mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e98899 ~ e98899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201798899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arasaki Kohei, Nagashima Haruki, Kurosawa Yuri, Kimura Hana, Nishida Naoki, Dohmae Naoshi, Yamamoto Akitsugu, Yanagi Shigeru, Wakana Yuichi, Inoue Hiroki, Tagaya Mitsuo	4. 巻 19
2. 論文標題 MAP1B LC1 prevents autophagosome formation by linking syntaxin 17 to microtubules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e45584 ~ e45584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201745584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田拓, 林楽人, 多賀谷光男, 井上弘樹
2. 発表標題 浸潤突起形成因子Tks5と微小管の相互作用
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上弘樹
2. 発表標題 Bet1は浸潤性乳がん細胞においてコレステロール依存的にMT1-MMPと相互作用し、細胞外基質分解を促進する
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田切ゆか, 長谷川花奈, 多賀谷光男, 井上弘樹
2. 発表標題 MT1-MMPは浸潤性乳がん細胞においてER-Golgi SNARE Bet1と相互作用し、Bet1をエンドソームにリクルートする
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	多賀谷 光男  (Tagaya Mitsuo)  (30179569)	東京薬科大学・生命科学部・教授    (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------