

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07198

研究課題名(和文) ガン細胞の浸潤突起形成におけるダイナミンの機能とSrcによる制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating dynamin 2 functions in invadopodia formation by cancer cells and its regulation by Src

研究代表者

竹田 哲也 (Takeda, Tetsuya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30302368

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)：本研究では、Dynamin 2およびBARドメイン蛋白質の、細胞浸潤における機能解析を行った。Dynamin 2は浸潤突起およびポドソームに局在し、細胞浸潤に必須であることが明らかになった。そこで、共免疫沈降法によりdynamin 2結合蛋白質を探索したところ、10種類のBARドメイン蛋白質を同定した。さらに免疫蛍光顕微鏡法により、浸潤突起およびポドソームに局在するBARドメイン蛋白質を多数同定した。これらのBARドメイン蛋白質のうち、特にPACSIN2について機能解析を進め、Dynamin 2と協働して細胞浸潤を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞浸潤は、発生や免疫応答、がん転移に関わる細胞運動である。浸潤突起やポドソームは、細胞浸潤を司る膜構造であるが、その形成や制御メカニズムには未解明な点が多い。本研究では、浸潤突起やポドソームの形成に関わるDynamin 2とBARドメイン蛋白質の機能を明らかにした。そのため本研究は、細胞浸潤に関わる発生や免疫応答機構の理解という学術的意義、さらにDynamin 2やBARドメイン蛋白質を分子標的とした新規がん治療法開発への展開などの社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined functions of dynamin 2 and BAR domain proteins in cell invasion. Dynamin 2 localised to the invadopodia and podosomes playing essential roles in cell invasion. To identify dynamin 2-binding proteins, coimmunoprecipitation-based screening was performed and ten BAR domain proteins were identified. Furthermore, using immunofluorescence microscopy, multiple BAR domain proteins were identified to be localised at the invadopodia and podosomes. Among these BAR domain proteins, PACSIN 2 appeared to regulate cell invasion together with dynamin 2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞浸潤 浸潤突起 ポドソーム ダイナミン BARドメイン蛋白質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死亡原因のトップであり、年間死亡者数の約3割を占める。がん患者の命を奪う原因のほとんどは、浸潤とそれに引き続いて起こる転移である。がん細胞が転移する過程では、基底膜の破壊と間質への浸潤、血管内侵入が起こる。しかし基底膜や間質、血管壁の細胞外基質が物理的障害になるため、がん細胞は細胞外基質を分解して遊走する必要がある。そのため、がん細胞による細胞外基質分解メカニズムの解析は、がん浸潤・転移の分子病態の解明と、それに基づいた革新的がん治療法の開発に重要である。一方、細胞の浸潤は、個体発生、免疫応答など、生理的な生体機能においても重要な役割を持つ。例えば、マクロファージ、破骨細胞、樹状細胞などの単球由来細胞や、血管内皮や平滑筋の細胞などは、細胞外基質を分解して、組織浸潤や細胞外基質のリモデリングを行う。細胞が浸潤する際に、がん細胞は浸潤突起(invadopodia)、またマクロファージや破骨細胞などはポドソーム (podosomes) と呼ばれる構造を形成し、プロテアーゼを分泌して細胞外基質を分解する。浸潤突起とポドソームは、どちらもアクチンに富んだ膜突起構造であり、構成因子の多くが共通であるが、その形成や制御メカニズムには未解明な点が多い。

2. 研究の目的

私たちは、浸潤突起の形成を制御する新規因子として、ダイナミン (Dynammin2) を同定した (Zhang *et al.*, *BBRC* 2016)。ダイナミンは、アクチン細胞骨格制御や細胞内膜輸送において重要な機能を持つ。また他グループの先行研究によって、Dynammin 2 はポドソームの構成因子であることも明らかになっていた。そこで本研究では、浸潤突起およびポドソームにおける Dynammin 2 とその結合蛋白質の機能解析を行い、細胞の浸潤とその制御メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

浸潤突起を形成する膀胱癌細胞 T24 と、ポドソームを形成する NIH-Src をモデル細胞として、

- ① 浸潤突起およびポドソーム形成を司る分子ネットワークの解明
- ② 浸潤突起およびポドソームのアクチン制御におけるダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の機能解析
- ③ 浸潤突起およびポドソームへの細胞内幕輸送におけるダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の機能解明

について細胞生物学的、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

- ① 浸潤突起およびポドソーム形成を司る分子ネットワークの解明

Dynammin 2 の truncation 断片を用いた解析により、浸潤突起およびポドソームへの局在には、C 末端の proline-rich domain (PRD) が必要であることが明らかになった。Dynammin 2 の PRD は、SH3 ドメインを持つ他のタンパク質、特に膜リモデリング因子である BAR ドメイン蛋白質と相互作用することが知られていた。そこで、共免疫沈降法を用いて dynamin 2 と相互作用する BAR ドメイン蛋白質を探索したところ、10 種類の BAR ドメイン蛋白質を同定した。さらに、免疫蛍光顕微鏡法により、膀胱がん細胞 T24 の浸潤突起に局在する BAR ドメイン蛋白質を 9 種類、さらに NIH-Src 細胞のポドソームに局在する BAR ドメイン蛋白質を 16 種類同定した。これらの BAR ドメイン蛋白質のうち、Pacsin 2 がダイナミンと相互作用し (図 1)、浸潤突起およびポドソームへの局在も示した (図 2) ため、以下のような解析を行った。

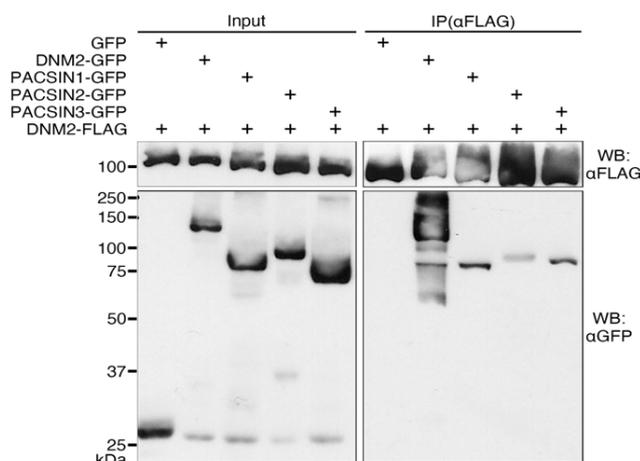


図 1 共免疫沈降法を用いたダイナミン結合タンパク質の探索。PACSIN1, 2, 3 の Dynammin 2 との結合を示す。

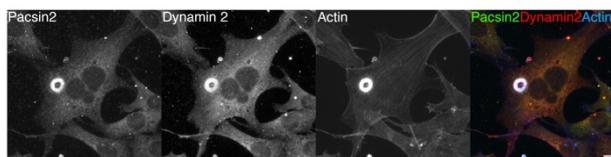


図 2 Pacsin 2 のポドソームへの局在。NIH-Src 細胞における Pacsin 2 (緑)、Dynammin 2 (赤)、アクチン (青) の免疫蛍光顕微鏡像を示す。

② 浸潤突起およびポドソームのアクチン制御におけるダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の機能解析

Dynamin 2 および Pacsin 2 のポドソーム形成における機能を明らかにするために、NIH-Src 細胞において RNAi を行い、ポドソーム形成に及ぼす影響を解析した。その結果、dynamin 2, Pacsin 2 のいずれの RNAi でも、アクチンの集積が正常に起こらずに、ポドソーム形成が阻害された (図 3)。Pacsin 2 の RNAi によるポドソーム形成阻害は、ヒト由来 PACSIN 2 を発現させることによって回復したが、SH3 ドメインを欠損させ Dynamin 2 との結合性を失った PACSIN 2 を用いた場合には、回復が見られなかった。以上の結果から、Pacsin 2 と Dynamin 2 の相互作用が、ポドソーム形成におけるアクチン制御に関与する可能性が強く示唆された。

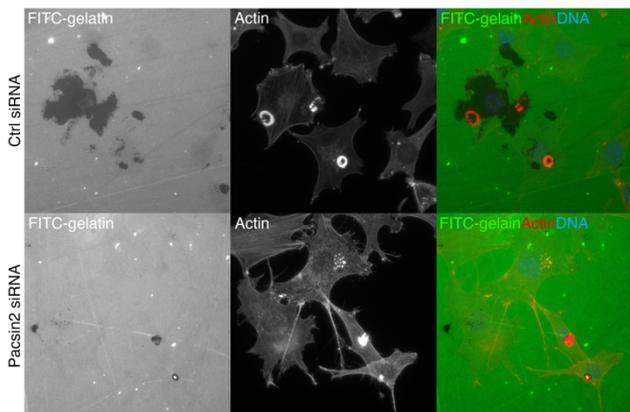


図 3 ポドソーム形成における Pacsin 2 の機能. NIH-Src のコントロール RNAi 細胞 (Ctrl RNAi) および Pacsin 2 RNAi 細胞 (Pacsin2 RNAi) の蛍光顕微鏡像. アクチン (ポドソームマーカー) (赤), FITC-gelatin (細胞外基質) (緑) の局在を示す。

③ 浸潤突起およびポドソームへの細胞内幕輸送におけるダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の機能解析

MT1-MMP は膜型マトリックスメタロプロテアーゼで、浸潤突起やポドソームに局在して細胞外基質の分解を促進する。そこで、Dynamin 2 および Pacsin 2 の RNAi による MT1-MMP のポドソームへの局在を解析した。その結果、Dynamin 2 の RNAi によって MT1-MMP のポドソームへの局在が阻害された (図 4)。一方、Pacsin 2 RNAi によって MT1-MMP の局在に影響は見られなかった。以上の結果より、Dynamin 2 と Pacsin 2 の相互作用は、ポドソーム形成において必要であることが明らかになった。

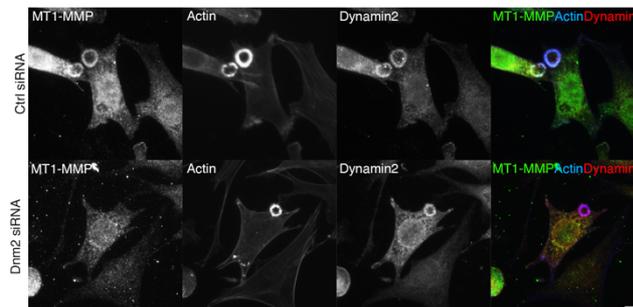


図 4 ポドソームへの MT1-MMP の局在における Dynamin 2 の必要性. NIH-Src のコントロール RNAi 細胞 (Ctrl RNAi) および Dynamin 2 RNAi 細胞 (Dnm2 RNAi) の蛍光顕微鏡像. MT1-MMP (緑), アクチン (青), Dynamin 2 (赤) の局在を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Noguchi, S., *Takei, K., and *Takeda, T.	4. 巻 296
2. 論文標題 Mutant BIN1-Dynamins 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 100077-100089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 La, T.M., Tachibana, H., Li, S., Abe, T., Seiriki, S., Nagaoka, H., Takashima, E., Takeda, T., Ogawa, D., Makino, S., Asanuma, K., Watanabe, M., Tian, X., Ishibe, S., Sakane, A., Sasaki, T., Wada, J., Takei, K., Yamada, H.	4. 巻 34(12)
2. 論文標題 Dynamins 1 is important for microtubule organisation and stabilisation in glomerular podocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 16449-16463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202001240RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Abe, T., La, T.M., Miyagaki, Y., Oya, E., Wei, F.Y., Sumida, K., Fujise, K., Takeda, T., Tomizawa, K., Takei, K., Yamada, H.	4. 巻 54(2)
2. 論文標題 Phosphorylation of cortactin by cyclin-dependent kinase-5 modulates actin bundling by the dynamin 1-cortactin ring-like complex and formation of filopodia and lamellipodia in NG108-15 glioma-derived cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 550-558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 竹居 孝二, 山田 浩司, 竹田 哲也	4. 巻 59(5)
2. 論文標題 ダイナミン複合体による新規の膜切断機構：クラスターゼ・モデル	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 001-007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.59.255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe, T., La, T.M., Miyagaki, Y., Oya, E., Wei, F.Y., Sumida, K., Fujise, K., Takeda, T., Tomizawa, K., Takei, K., Yamada, H.	4. 巻 54(2)
2. 論文標題 Phosphorylation of cortactin by cyclin-dependent kinase-5 modulates actin bundling by the dynamin 1-cortactin ring-like complex and formation of filopodia and lamellipodia in NG108-15 glioma-derived cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 550-558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeda, T., Kozai, T., Yang, H., Ishikuro, D., Seyama, K., Kumagai, Y., Abe, T., Yamada, H., Uchihashi, T., Ando, T., Takei, K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin rings regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e30246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.30246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹田 哲也
2. 発表標題 再構成アプローチで解明する中心核ミオパチーの発症機序と診断応用への試み
3. 学会等名 2020 (R2) 年度 筋ジストロフィー研究班合同班会議 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Takei, K., Noguchi, S. and Takeda, T.
2. 発表標題 Dysregulated membrane remodeling in pathogenesis of congenital diseases
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会, シンポジウム「膜のリモデリングと組織化の分子基盤」 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田 哲也, 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二
2. 発表標題 細胞の形態形成における膜-細胞骨格の動的相互作用
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会, ワークショップ「細胞操作と定量イメージングで知る細胞骨格ダイナミズム」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤瀬賢志郎, 山田浩司, 竹居孝二, 竹田哲也
2. 発表標題 筋疾患変異型BARドメイン蛋白質BIN1による膜リモデリング異常の解析
3. 学会等名 2020年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Li Jianzhen, Liu Man, 岡本瑞生, Kristina Curry, 山田浩司, 竹居孝二, 竹田哲也
2. 発表標題 Unveiling functions of Dynamin and BAR domain proteins in podosome
3. 学会等名 2020年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田 哲也
2. 発表標題 再構成アプローチで解明する中心核ミオパチーの発症機序と診断応用への試み
3. 学会等名 令和2年度「筋レポジトリーの拡充とそれを活用した筋ジストロフィー関連疾患の病態解明と診断・治療法開発」(2-5)西野班会議(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Takei, K., Noguchi, S. and Takeda, T.
2. 発表標題 Dysregulated membrane remodeling in pathogenesis of congenital diseases
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田 哲也, 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二
2. 発表標題 細胞の形態形成における膜-細胞骨格の動的相互作用
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹居 孝二, The Mon La, 阿部 匡, 竹田 哲也, 藤原 郁子, 成田 哲博
2. 発表標題 ダイナミン GTPアーゼはアクチン線維の束化と分散を機械的に制御する
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 筋疾患変異型BARドメイン蛋白質BIN1による膜リモデリング異常の解析
3. 学会等名 2020年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Li Jianzhen, Liu Man, 岡本 瑞生, Kristina Curry, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 Unveiling functions of Dynamin and BAR domain proteins in podosome
3. 学会等名 2020年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤愛美, 藤瀬賢志郎, 竹田哲也, 戸井基道
2. 発表標題 ダイナミンのSNP変異が引き起こすミオパチーとニューロパチーの発症メカニズム解析システム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 The Mon La, Tadashi Abe, Masayuki Morita, Eizo Takashima, Tetsuya Takeda, Katsuhiko Asanuma, Kohji Takei, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 Amphiphysin 1 is important for actin cytoskeletal regulation with synaptopodin in glomerular podocytes
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenshiro Fujise, Hiroshi Yamada, Kohji Takei, Tetsuya Takeda
2. 発表標題 Regulation of skeletal muscle membrane robustness by membrane remodeling proteins BIN1 and Dynamin-2
3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹居 孝二, The Mon La, 阿部 匡, 竹田 哲也, 藤原 郁子, 成田 哲博
2. 発表標題 ダイナミン GTPアーゼはアクチン線維の束化と分散を機械的に制御する
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 Mechanical stress-responsive membrane remodeling in muscle cells
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 筋細胞膜リモデリングにおけるメカニカルストレス応答の解析
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 中心核ミオパチー型BIN1およびDNM2変異体による膜リモデリング異常の解析
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会 (日本蛋白質科学会合同大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤瀬 賢志郎, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 筋細胞膜の形態形成における張力応答メカニズムの解析
3. 学会等名 2019年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 瑞生, 李 建振, 山田 浩司, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 ダイナミンによる浸潤突起形成に関わる新規因子の探索
3. 学会等名 2019年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田 哲也, 藤瀬 賢志郎, 延永 裕太, 山田 浩司, 竹居 孝二
2. 発表標題 Elucidating pathogenesis of congenital muscular and neuronal diseases caused by defective membrane remodeling of dynamin GTPase
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤瀬 賢志郎, 背山 佳穂, 山下 恭加, 山田 浩司, 戸井 基道, 竹居 孝二, 竹田 哲也
2. 発表標題 膜リモデリングおよびリン脂質代謝異常に起因する先天性ミオパチー発症機序の解明
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Takeda and Motomichi Doi
2. 発表標題 Using non-mammalian model organisms for human disease study and drug screening
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会 シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenshiro Fujise, Kaho Seyama, Yasuka Yamashita, Hiroshi Yamada, Kohji Takei and Tetsuya Takeda
2. 発表標題 Elucidating pathogenesis of congenital myopathy caused by defective membrane remodeling
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/takeda1126
--

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

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			
英国	MRC-LMB			