

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05736

研究課題名(和文) タイト結合リガンドが誘導する新経路のマクロ飲作用と、それに続く癌重層化の機序解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of LSR ligand-dependent atypical macropinocytosis and following multilayered cell growth.

研究代表者

幸野 貴之 (Kohno, Takayuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10374563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞が癌化を目指して増殖や運動を再開するためには、接触阻害からの離脱が必要であるが、静穏化している細胞が突然増殖を始める機序の理解は乏しい。我々は、接触阻害を打破するシグナルの開始点として細胞間接着に着目した。そして、外来刺激によるタイト結合の制御が、急激な細胞運動能の亢進とその後起こる過剰な重層化増殖を起動させることを見出した。さらに、この過程でマクロ飲作用が先行することを発見した。本研究では、タイト結合関連シグナルに由来するマクロ飲作用の発動が、癌細胞の悪性化増殖開始トリガーであることを明らかにした。本研究の成果は、新たな癌悪性化制御機序の創出につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞間の隙間の閉塞を制御するタイト結合タンパク質LSRについて、そのリガンドを用いることで、人為的にLSRの細胞内局在と発現量を制御できる実験系を確立した。これを用いて、癌細胞が高分化型から低分化型へと至る過程における、タイト結合の機能変化と細胞重層化へと至る分子機序の解析を行った。その結果、LSRの局在変動をトリガーとして、細胞が重層化増殖に至る起始過程にマクロ飲作用が関連することを明らかにした。さらに、マクロ飲作用の抑制が、細胞の悪性化増殖を阻害することを見出した。本成果は、生理的なマクロ飲作用の機序解明に役立つだけでなく、癌悪性化に対する新たな治療戦略の創出に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Withdrawal from contact inhibition is necessary for epithelial cancer precursor cells to initiate cell growth and motility. Nevertheless, little is understood about the mechanism for the sudden initiation of cell growth under static conditions. We focused on cellular junctions as one region where breaking out of contact inhibition occurs. In well-differentiated endometrial cancer cells, the ligand administration for tricellular tight junction protein LSR, which transiently decreased the robust junction property, caused an abrupt increase in cell motility and consequent excessive multilayered cell growth despite being under contact inhibition conditions. We observed that macropinocytosis essentially and temporarily occurred as an antecedent event for the above process at intercellular junctions. We concluded that the formation of macropinocytosis, which is derived from tight junction-mediated signaling, was triggered for the initiation of cell growth in static precancerous epithelium.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マクロ飲作用 マクロピノサイトーシス 重層化増殖 癌細胞 上皮細胞 タイト結合

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

細胞が外来因子を取り込む経路において、受容体介在エンドサイトーシスと食作用（phagocytosis）は、取り込む対象が特異的かつ能動的な取り込み経路である。一方、飲作用は非特異的に細胞外液を取り込む経路であるが、その目的や意義、制御機序には不明な点が多い。飲作用のうち、数  $\mu\text{m}$  程度の大きな小胞の形成を伴うものは、マクロ飲作用と呼ばれる。マクロ飲作用は、1931年にマクロファージで発見された知見であり、原生生物のアメーバや細胞性粘菌でも確認できる広く知られた生命現象の一つである。

マクロ飲作用や食作用は、ウイルス感染経路でもある。インフルエンザウイルスはシアル酸や糖鎖を標的としたエンドサイトーシスや食作用で取り込まれる。また、サイトメガロウイルスはヘパラン硫酸を、ヘルペス 6 ウイルスは CD46 をそれぞれ標的としたエンドサイトーシスで取り込まれる。エボラウイルスやサルモネラ菌などはマクロ飲作用を利用して細胞内に取り込まれる。さらに、乳幼児の呼吸器感染症として重要な RS ウイルスもまた、マクロ飲作用で取り込まれることが報告されている。

マクロ飲作用や食作用の標的細胞は、一般に異物除去に関与する単球やマクロファージ、樹状細胞である。一方、上皮細胞から侵入するウイルスも存在し、コクサッキーウイルスはタイト結合タンパク質の Occludin や CAR を標的とすることが報告されている。上皮細胞は、ウイルス感染や発癌過程の基底組織であり、その制御機序が疾患予防や治療と密接に関連する。しかしながら、マクロ飲作用が関与する疾病誘導について、その機序はほとんど明らかではない。本研究では、上皮細胞の発癌過程や癌悪性化の過程におけるマクロ飲作用の関与に着目し、その発生機序の解明に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

申請者は、単層増殖期と重層化を薬剤で制御可能なヒト上皮癌細胞を見出し、それをモデルとして、癌細胞の重層化増殖と細胞間接着装置の性状変化との関連を研究してきた。本研究の目的は、細胞の重層化増殖に先立って起こる「マクロ飲作用」の役割の解析である。予備検討において、上皮細胞のタイト結合を外来因子にて刺激したときに、細胞と細胞の接着領域で大規模にマクロ飲作用が発生することを見出した。さらに、この飲作用が癌細胞の重層化の開始直前に一過性に起こることを見出した。興味深いことに、飲作用を抑制すると、癌細胞の重層化が抑制される可能性を見出した。このことは、飲作用にこれまで知られていない、新しい生理作用があることを示唆している。

本研究の遂行により、細胞重層化の過程になぜ、飲作用が関連するか、という疑問に対する解が得られる。この成果をさらに発展させることにより、マクロ飲作用の新たな役割の解明と、新たな癌治療標的の創出が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、タイト結合タンパク質 LSR を介する情報伝達経路に着目する。このタンパク質は、3つの上皮細胞に囲まれた焦点領域に集積する性質を有し、さらにそのことが成熟した上皮バリアの完成に必要であることが知られている。申請者らは、このタイト結合関連タンパク質 LSR に対するリガンド（以下、ABD）を作成し、LSR に対する機能変化と細胞への影響を検討してきた。その過程で、細胞への ABD の投与がマクロ飲作用を誘導することを見出した。

本研究では、ABD で刺激された際に誘導されるマクロ飲作用について、その発生機序や細胞の形態変化、およびマクロ飲作用の開始に関与する情報伝達経路の解明を目指す。これにより、発癌過程や癌悪性化の過程におけるマクロ飲作用の役割を明らかにする。なお、本研究では、ヒト子宮内膜腺癌に由来する Sawano 細胞を使用した。この上皮癌細胞は、KRas G13D 変異を有するが、MAPK 阻害剤存在下では高分化度を保ち、一定期間、単層培養が可能である。さらに、高密度培養により、重層化増殖を開始する特徴を有する。これら単層上皮シートから重層化への相転移は可逆的である。従って、この細胞は上皮癌の悪性化の機序の一つである重層化を自在に制御できる、よい疾患モデルである。以下に本課題の研究方法を示す。

#### (1) LSR リガンド ABD 添加後の細胞形態変化の観察

ABD を添加後、Sawano 細胞にマクロ飲作用が誘導される過程を、共焦点顕微鏡を用いて解析する。さらに、ABD 添加前後での細胞形態の変化を生細胞観察し、細胞形態の時系列的な変化を詳細に解析する。

#### (2) マクロ飲作用が発生する部位の解析

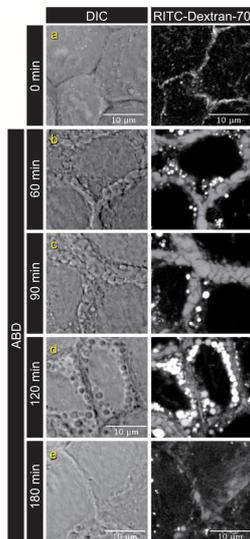
透過型電子顕微鏡を用いて、ABD 刺激前後での細胞形態の変化について、特にマクロ飲作用の誘導前後の細胞形態の変化を詳細に解析し、マクロ飲作用が細胞のどの領域で形成されるかを明らかにする。

#### (3) マクロ飲作用に依存的な細胞機能変化の解析

ABD に依存的なマクロ飲作用を抑制する阻害剤を探索し、マクロ飲作用の形成により生じる細胞機能の変化を解析する。LSR は成熟した上皮バリア機能の維持に必要なタイト結合関連タンパク質である。そのリガンドである ABD を投与することで、LSR の細胞内局在や発現量が変化することが示唆される。そこで、LSR の局在変化や発現変動を解析し、それが細胞の悪性化増殖能に影響するかを観察する。

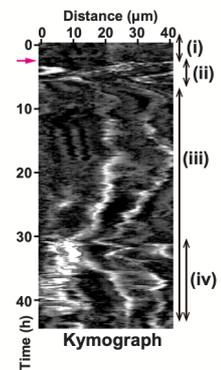
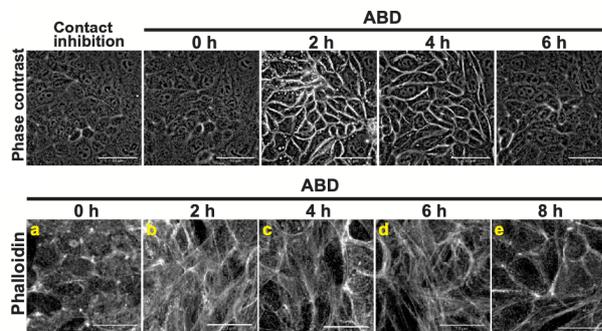
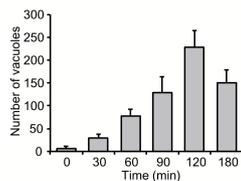
## 4. 研究成果

### (1) LSR リガンド ABD 添加後の細胞形態変化の観察

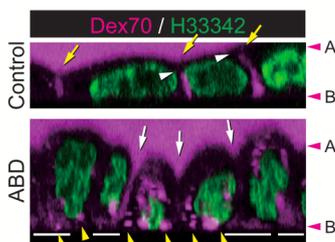


左図では、マクロ飲作用を可視化するために、細胞培養液中に RITC 標識デキストラン（平均分子量 70kDa）を含む条件で LSR リガンドである ABD を添加し、生存条件にて Sawano 細胞を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、ABD 添加により、一過性の細胞間領域の拡張と、マクロ飲作用に伴う小胞の形成がみとめられた。

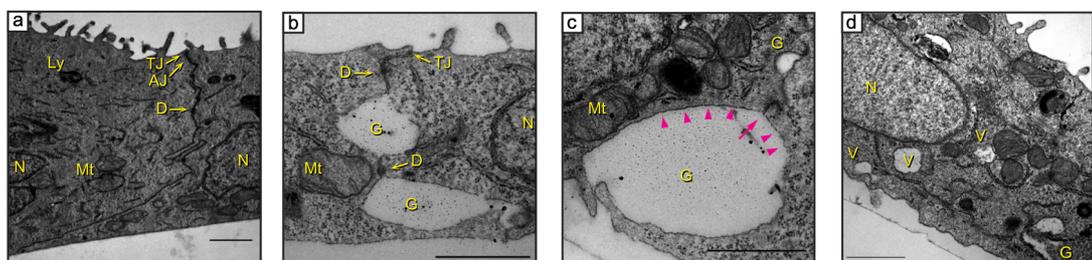
さらに、下図では、ABD 添加の前後での細胞動態を経時的に生細胞観察した。その結果、ABD 添加により平面細胞運動能が一過性かつ急激に亢進することを見出した。



### (2) マクロ飲作用が発生する部位の解析



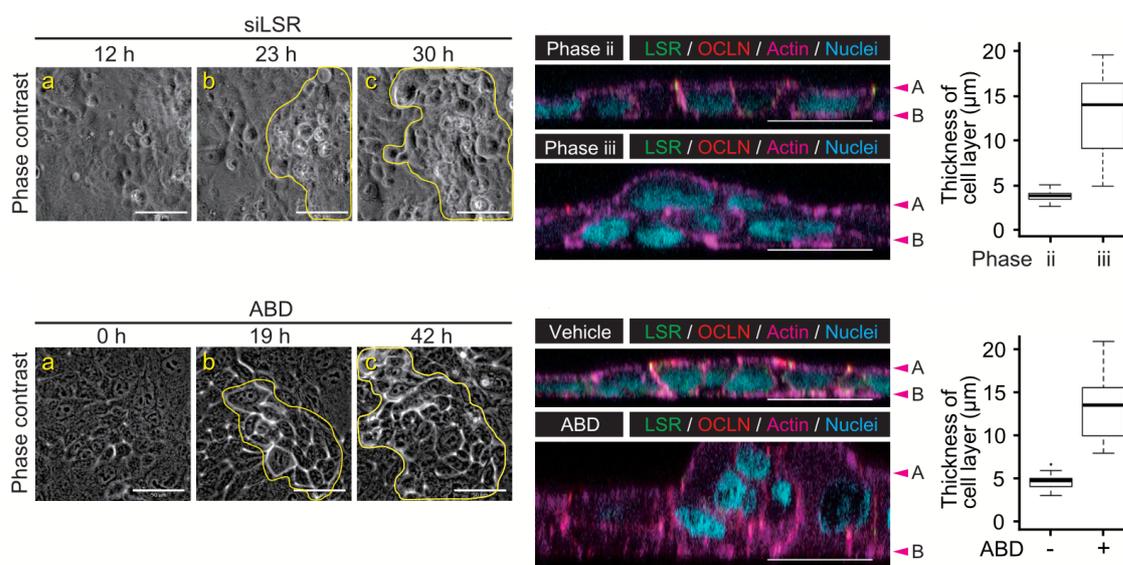
マクロ飲作用が発生する部位を確認するために、RITC 標識デキストラン存在下で ABD を添加し、その後の細胞を共焦点顕微鏡にて生細胞観察した。その結果、左図に示す x-z 断面像より、マクロ飲作用に伴う小胞は、隣接細胞間領域の培養基質側で形成されることが確認された。



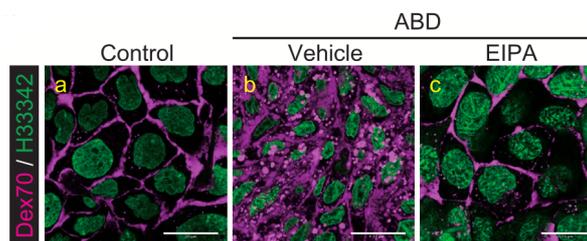
上図 4 枚は、ABD 添加前 (a) または添加後 (b-d) における、隣接細胞間領域を観察した過型電子顕微鏡像 (TEM) である。図 a で確認されたタイト結合 (TJ) や接着結合 (AJ)、デスモソーム (D) といった細胞間接着装置は、ABD 添加後も維持されているこ

とが確認された。一方で、ABD 添加に伴い、細胞間隙が開裂するとともに空隙が形成され (図 b 及び c の G), さらに小胞の形成が観察された (図 d の V)。これらの結果より、ABD 添加に依存的なマクロ飲作用は、隣接細胞間隙の開裂に端を発する、これまでに報告されていない新しい形態のマクロ飲作用であることが明らかになった。

### (3) マクロ飲作用に依存的な細胞機能変化の解析



上図の上段は LSR 遺伝子をノックダウンした細胞において、高密度培養下での重層化増殖を観察したものである。LSR の非存在下では、野生型 (図表示なし) と比較して、速やかに重層化増殖を開始した。一方、上図の下段は ABD を添加したときの細胞重層化増殖を示す。LSR の細胞内局在について、定常状態では 3 細胞間のタイト結合領域に局在したが、ABD 添加により、Rab5 との共局在を伴って細胞内小胞へと移行した (図表示なし)。これにより、細胞表面での発現量は減少し、平面細胞運動能の亢進を示した。(図表示なし)。さらに、ABD 依存的なマクロ飲作用を EIPA により抑制すると (右図)、ABD 投与に依存的な平面細胞運動能の亢進が抑制され、重層化増殖も抑制した (図表示なし)。



以上の結果より、3 細胞が会合するタイト結合領域から LSR が排除されることで、細胞に一過性のマクロ飲作用が誘導され、これが平面細胞運動能の亢進とその後の重層化増殖を開始させるトリガーであることが明らかになった。癌悪性化過程にマクロ飲作用が必要であることを示した報告はこれが最初であったため、本研究成果を論文にまとめ、*The FASEB Journal* (doi: 10.1096/fj.202100299R.) にて公開した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kohno Takayuki, Konno Takumi, Kikuchi Shin, Kondoh Masuo, Kojima Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Translocation of LSR from tricellular corners causes macropinocytosis at cell-cell interface as a trigger for breaking out of contact inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100299R	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 Takayuki Kohno, Takumi Konno, Takashi Kojima	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of Tricellular Tight Junction Protein Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR) in Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3555 ~ 3555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20143555	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7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸野貴之
2. 発表標題 癌悪性化に付随する新しい細胞形態変化
3. 学会等名 第101回 北海道医学大会 第123回癌談話会例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸野貴之, 金野匠, 菊池真, 近藤昌夫, 小島隆
2. 発表標題 細胞間隙からのマクロピノサイトーシスに起因する急激な細胞運動の誘導
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸野貴之, 菊池真, 金野匠, 岡田匡水, 斉藤公人, 近藤昌夫, 郷久晴郎, 齋藤豪, 小島隆
2. 発表標題 接触阻害からの離脱による細胞運動能の再獲得を上皮バリアが制御する
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 幸野貴之, 菊池真, 金野匠, 近藤昌夫, 小島隆
2. 発表標題 上皮細胞における隣接細胞接着領域からの細胞外液取り込み誘導機序の解析
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 幸野貴之, 菊池真, 金野匠, 近藤昌夫, 小島隆
2. 発表標題 Angubindin-1は隣接細胞間隙からの小胞形成を誘導する
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸野貴之, 菊池真, 金野匠, 近藤昌夫, 郷久晴郎, 齋藤豪, 小島隆
2. 発表標題 子宮内膜癌細胞で観察された, タイト結合刺激後の細胞間隙の一過性開裂現象と細胞機能への影響
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸野貴之, 金野匠, 近藤昌夫, 嶋田浩志, 齋藤豪, 小島隆
2. 発表標題 Angubindin-1による癌細胞の集団運動能の亢進
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takayuki Kohno, Takumi Konno, Takashi Kojima	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 146
3. 書名 Tight Junctions: Classification, Structure and Functions, A Resourceful Alteration of Tricellular Tight Junction Proteins: Roles in Endometrial Cancer Progression	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------