

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790254

研究課題名 (和文) 三次元基質中における癌細胞運動様式の可塑性の解析

研究課題名 (英文) Analysis of plasticity of cancer cell motility in 3D substrates

研究代表者

山崎 大輔 (YAMAZAKI DAISUKE)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50422415

研究成果の概要 (和文)：三次元基質中におけるがん細胞の運動様式は、細胞が長く伸展して移動する間葉性運動と細胞が丸くなって移動するアメーバ様運動の二つに分類される。アメーバ様運動の駆動力は Rho/ROCK シグナルにより制御されているアクチンミオシンを基盤とした収縮力である。今回私は間葉性運動が Rac シグナルが長く伸展する仮足形成や細胞基質間の接着形成を介して制御していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The motility of cancer cells in 3D matrices is of two types: mesenchymal motility, in which the cells are elongated and amoeboid motility, in which the cells are round. Amoeboid motility is driven by an actomyosin-based contractile force, which is regulated by the Rho/ROCK pathway. Here I show that the motility of elongated cells is regulated by Rac signaling through formation of elongated pseudopodia and cell-substrate adhesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：癌、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞はコラーゲンゲルのような三次元基質中で培養したときと培養皿のような二次元平面上で培養したときとはその形態や運動様式など著しく異なる振る舞いを示す。このため癌細胞の浸潤・転移機構の研究は生体内の環境を反映した三次元培養系で行うこ

とが望ましい。細胞運動に関する研究はこれまで二次元平面上におけるそれが主流であったが、最近顕微鏡を含めたイメージング技術の発達に伴い三次元培養系を用いたものが注目を集めており、今後この流れは加速すると思われる。本研究でとりあげる癌細胞の多様性や可塑性といった現象は三次元培養

系を用いたときのみ観察される現象であり、この分野の最先端のトピックスである。私は Rac/WAVE が実験動物レベルでの転移および二次元平面上での癌細胞の運動に重要であることを見出した。しかしながら生体内における Rac/WAVE の詳細な役割を検討できておらず、そのため三次元培養系を用いて *in vivo* と *in vitro* の現象を結びつける実験を思い立った。三次元培養系において Rac/WAVE のシグナルを抑制したところ、形態の変化は起こるものの細胞によっては必ずしも細胞運動を阻害せず、それは癌細胞の運動様式の可塑性に起因する可能性が考えられた。そこで運動様式の多様性および可塑性に興味をもちその分子機構を明らかにする研究を着想した。そして私は Rac/WAVE のシグナルが運動様式の可塑性を制御する機構を調べるため、WAVE に結合し Rho のシグナルを制御する分子として ARHGAP4 を新たに同定し機能解析を進めている。

2. 研究の目的

癌細胞運動の特徴として、癌細胞はその由来する組織や細胞の分化の程度により形態的に異なる多様な運動様式を示すこと、また同一の細胞であっても細胞外環境に応じてその運動様式を変化させることが挙げられる。これは特定の運動様式を制御するだけではすべての癌細胞の浸潤・転移を抑制することができないことを意味している。したがって癌細胞運動の抑制を考える場合、癌細胞が示すこのような運動様式の多様性および可塑性について十分に考慮しなければならない。本研究では癌細胞浸潤・転移時における細胞運動制御機構を明らかにすることを目的とし、癌細胞が示す細胞運動様式の多様性および可塑性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞が転移する際に細胞を取り巻く環境は移動する場所により刻々と変化するが、この段階では癌細胞浸潤・転移時の細胞外環境を *in vitro* の培養系で再構築することを目標とする。実験系は生体内の環境をよりよく反映させるため三次元基質中での培養を基本とし、培養系を構成する細胞外基質の種類や濃度が細胞運動に与える影響を検討する。この段階で検討した培養条件は本研究を通して用いることになる。

(2) 癌細胞運動の全体像をつかむことを目的とし、各運動様式の制御機構を同定する。これまでの癌細胞の運動様式の分類は細胞の形態によるものであり、それぞれの運動様式を制御している分子機構について十分に検討されていない。細胞運動の駆動力はアクチン細胞骨格の再編成により生み出されて

おり、それはアクチンフィラメントとミオシンの相互作用により生じる力と新規のアクチン重合による細胞膜を押し出す力に分けられる。この二つの力は前者が Rho/ROCK、後者が Rac/WAVE もしくは Cdc42/N-WASP のシグナルにより制御されており、これらのシグナルの必要性を調べることにより各運動様式の駆動力発生機構を同定することができる。駆動力発生機構の同定は細胞運動の抑制をターゲットとする場合の重要な手掛かりとなるだけでなく、その上流で運動様式を制御する機構の全体像をつかみ本研究の目的のひとつである運動様式の可塑性を検討する際の基盤となる。

(3) 運動様式の可塑性を生み出す分子機構を明らかにするために、以下の二つのアプローチを試みる。

① WAVE とその結合タンパク質の解析。申請者はこれまでに Rac/WAVE のシグナルによる癌細胞運動の制御機構を検討し、このシグナルを阻害すると癌細胞の運動様式に変化が現れることを見出している。Rac/WAVE を足掛かりとして運動様式の可塑性の分子機構を明らかにする。

② マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析。第一段階で検討した運動様式をシフトさせる条件で培養した細胞を用い、どのような遺伝子の発現に変化が起きるのか検討する。同定した遺伝子群に関しては個々に運動様式の可塑性における役割を検討していく。

4. 研究成果

(1) がん細胞が三次元コラーゲンゲル内で示す細胞形態と活性化型 Rac および活性化型 RhoA の量を比較検討した。解析に用いたのは HT1080 fibrosarcoma 細胞、U87MG glioblastoma 細胞、T98G glioblastoma 細胞、SW480 colon adenocarcinoma 細胞、SW620 colon adenocarcinoma 細胞の五種類の細胞である。これらの細胞を三次元コラーゲンゲル内で培養した後ホルマリンで固定し、アクチンフィラメントを染色して細胞の形態を観察した。U87MG glioblastoma 細胞および T98G glioblastoma 細胞は細長く伸びたスピンドル様の細胞形態を示したが、SW480 colon adenocarcinoma 細胞および SW620 colon adenocarcinoma 細胞は丸い細胞形態を示した。一方 HT1080 fibrosarcoma 細胞では細長く伸びたスピンドル様の細胞と丸い細胞形態を示す細胞が混在していた。次にこれらの細胞の抽出液を用意し、その中に含まれる活性化型の Rac および活性化型 RhoA の量をエフェクタープルダウン法により比較検討した。丸い細胞形態を示す SW480 colon adenocarcinoma 細胞および SW620 colon

adenocarcinoma 細胞と比較して、細長く伸びたスピンドル様の細胞形態を示す HT1080 fibrosarcoma 細胞、U87MG glioblastoma 細胞、T98G glioblastoma 細胞のほうが活性化型の Rac の量が多いことが明らかになった。一方、活性化型の RhoA の量は丸い細胞形態を示す SW480 colon adenocarcinoma 細胞および SW620 colon adenocarcinoma 細胞のほうが、細長く伸びたスピンドル様の細胞形態を示す HT1080 fibrosarcoma 細胞、U87MG glioblastoma 細胞、T98G glioblastoma 細胞よりも多いことが明らかになった。このことからがん細胞が三次元コラーゲンゲル内で示す細胞形態と活性化型 Rac および活性化型 RhoA の量には密接な関係があることが示唆された。

(2) 細長く伸びたスピンドル様の細胞と丸い細胞形態を示す細胞が混在している HT1080 fibrosarcoma 細胞において RhoA および Rac1 が三次元コラーゲンゲル内での細胞形態に与える影響を検討した。RNA 干渉法を用いて HT1080 fibrosarcoma 細胞における RhoA および Rac1 の発現の抑制を行ったところ、RhoA の発現が抑制されている細胞ではコントロールの細胞に比べて細長く伸びたスピンドル様の細胞形態を示す細胞の割合が増加していた。一方 Rac1 の発現が抑制されている細胞ではコントロールの細胞に比べて丸い細胞形態を示す細胞の割合が増加していた。またこれらの細胞を三次元コラーゲンゲル内で培養したときに運動する様子を位相差顕微鏡でタイムラプス観察したところ、RhoA の発現が抑制されている細胞では運動方向に細長く伸びた突起を形成している様子が観察されたが、Rac1 の発現が抑制されている細胞ではそのような突起形成が認められなかった。以上の結果から HT1080 fibrosarcoma 細胞において RhoA および Rac1 が三次元コラーゲンゲル内での細胞形態を制御していることが明らかになった。

(3) 細長く伸びたスピンドル様の細胞の運動における Rac シグナルの役割を調べるために細長く伸びたスピンドル様の細胞形態を示す U87MG glioblastoma 細胞において RNA 干渉法を用いて Rac1 および Rac3 の発現の抑制を行った。Rac1 もしくは Rac3 の発現を単独で抑制した場合には細胞形態に大きな影は認められなかったが、Rac1 および Rac3 の発現を同時に抑制したところ、細長く伸びたスピンドル様の細胞形態を示す細胞の割合が顕著に低下することが明らかになった。また全ての Rac タンパク質の機能を同時に阻害することができると考えられる Rac1 T17N 変異体を U87MG glioblastoma 細胞に発現させたところ、細長く伸びたスピンドル様の細胞

形態を示す細胞の割合が顕著に低下することが明らかになった。以上の結果から Rac シグナルは細長く伸びたスピンドル様の細胞の形態をとるのに必須の役割を果たしていることが示された。

(4) Rac シグナルがどのような機構で細長く伸びたスピンドル様の細胞の形態を制御しているのかを明らかにするため、HT1080 fibrosarcoma 細胞 および U87MG glioblastoma 細胞において RNA 干渉法を用いて Rac1 および Rac3 の発現の抑制を行い、それらの細胞をコラーゲンコートした二次元基質の上にまき、細胞基質間の接着形成を検討した。HT1080 fibrosarcoma 細胞において Rac1 の発現を抑制すると細胞基質間の接着形成が顕著に抑制されることが明らかになった。また U87MG glioblastoma 細胞において Rac1 および Rac3 の発現を同時に抑制すると細胞基質間の接着形成が顕著に抑制されることが明らかになった。以上の結果から Rac シグナルは細胞基質間の接着形成を介して細長く伸びたスピンドル様の細胞の形態を制御していることが明らかになった。

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 1 件)

① 山崎大輔、栗栖修作、竹縄忠臣、Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates、Oncogene 誌、28 巻、2009、1570-1583

[学会発表] (計 3 件)

① 山崎大輔、Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates、第 61 回日本細胞生物学会、2009 年 6 月 4 日、名古屋国際会議場

② 山崎大輔、Regulation of actin reorganization by WAVE family proteins during morphogenesis、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

③ 山崎大輔、がん細胞におけるアクチン細胞骨格制御因子の役割、第 60 回日本細胞生物学会、2008 年 6 月 3 0 日

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 大輔 (YAMAZAKI DAISUKE)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50422415