

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ~ 2009

課題番号：20790255

研究課題名（和文） 膜脂質変化から始まる浸潤突起形成のメカニズムを解く

研究課題名（英文） Molecular Mechanisms of podosome formation

研究代表者

及川 司 (OIKAWA TSUKASA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20457055

研究成果の概要（和文）：がん細胞は、周囲の正常組織を破壊しながら増殖し続けて腫瘍を形成し、さらに悪性度を増して周囲の組織に浸潤し、他の遠隔臓器に転移する。このようながん細胞の特性は、正常細胞において、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子に何らかの変異が生じると発現する。しかし、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の変異から浸潤・転移を説明することはほとんどできていない。従って細胞外基質との接着面に形成される浸潤突起(インバードポディア、ポドソーム)についても、その生理的な上流シグナルはごく一部がわかっているにすぎない。本研究課題において研究代表者は、浸潤突起形成とイノシトールリン脂質について次のことを見出した。浸潤突起の形成はPI3-kinaseの制御を受ける。浸潤突起形成においてはイノシトールリン脂質の一つであるPI(3,4,5)P3だけでなく、PI(3,4)P2の関与も重要である。PI(3,4)P2の産生は接着斑(フォーカルアドヒージョン: FA)で起こっており、このことが浸潤突起と通常の接着斑との違いの一つである、つまり浸潤突起形成の引き金になっている。PI(3,4)P2の下流で浸潤突起形成に関わる分子として、アダプター分子Tks5に注目し、質量分析による結合タンパクの探索を中心にその機能解析を行った結果、Tks5はそのPXドメインでPI(3,4)P2やPI(3,4,5)P3と相互作用し、SH3ドメインなどでアクチン重合に関わるN-WASPやFAに局在するアダプター分子Grb2と相互作用することで、上に述べたFAにおけるイノシトールリン脂質の変化をアクチン重合へと変換する働きをしている。

研究成果の概要（英文）：The great majority of cancers occur in epithelial tissues, yielding carcinomas. Given that epithelial cells are on the basement membrane underneath, they must degrade it to travel to distant sites. To initiate the invasion process, they must make contact with the extracellular matrices (ECM). Thus, the cell-matrix interactions must be one of the triggers that allow cancer cells to invade. To penetrate into the ECM, actin-rich adhesion structures called invadopodia or podosomes is thought to play pivotal roles for degrading it. I have studied the mechanism of invadopodium /podosome formation in Src-transformed NIH3T3 cells. In this study, based on the results of RNAi, identification of binding proteins by mass spectrometry, protein interaction and live-cell imaging analysis, I have established a stepwise mechanism for invadopodium formation. Invadopodia initiate from focal adhesions (FAs) due to changes in the phosphorylation status of proteins and in the composition of phosphoinositides on the plasma membrane. The onset of actin polymerization is triggered by PI(3,4)P2 production and Tks5 recruitment followed by N-WASP accumulation. This step involves intricate interactions of Tks5 with both PI(3,4)P2 and Grb2 at FAs

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：がん、浸潤、イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

浸潤突起は束ねられたアクチン繊維から成るコアを持ち、アクチン重合に関わるタンパクや Src に代表されるチロシンキナーゼ、アダプター分子、インテグリンなどの接着分子、プロテアーゼが集積する複雑な構造である。詳しく解析が進んでいるタンパクのひとつである WASP と N-WASP (neural WASP) は上流の様々なシグナルを受け、Arp2/3 複合体を活性化することで急速なアクチン重合を引き起こし、フィロポディア(糸状仮足)形成に関わる分子であることが示された。N-WASP と Arp2/3 複合体の発現とがんの悪性度との相関も報告されており、これらのタンパクの浸潤・転移への重要な関与が示唆されている。WASP は主に血球系に、N-WASP は脳その他、様々な組織で発現が認められ、いずれも上流の因子である Cdc42 や Grb2、Src によるリン酸化、イノシトールリン脂質による活性や局在の制御を受けている。N-WASP は v-Src で形質転換した繊維芽細胞において浸潤突起形成と細胞外基質分解に必須であることや、上皮細胞の管腔形成において、三次元のコラーゲンゲル中を遊走する際の浸潤突起形成に関わることが示されている。N-WASP と同様に WASP も、マクロファージなどの血球系の細胞で見られる浸潤突起形成に必須であることが知られている。実際、WASP 遺伝子に変異が入ることによって引き起こされる疾患、WAS の患者から採取されたマクロファージは浸潤突起を形成することができない。WASP や N-WASP はア

クチン重合の活性化因子であることから、浸潤突起でも、突起形成のマシーナリーとしての機能を果たしていると考えられている。このように個々の構成分子の役割は次第に明らかになってきているが、それらの時空間的な制御機構と三次元における浸潤突起の生理的な役割についてはほとんどわかっていなかった。がんや骨疾患などに対する効果的かつ選択性の高い(副作用の少ない)治療を考えたとき、各々で見られる浸潤突起は有望なターゲットといえ、その形成メカニズムの解明及び三次元における動態の解析が果たす役割は大きいと考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者らのグループはこれまで、細胞膜におけるイノシトールリン脂質の細胞運動における関与について研究を行ってきたが、その過程で上に挙げた浸潤突起についても、イノシトールリン脂質の制御を受けている可能性を見出した。ホスファチジルイノシトール(PI)をはじめとするイノシトールリン脂質は、イノシトール環と脂肪酸から成る脂質であり、細胞膜の内側の膜を構成する成分のひとつである。他のリン脂質に比較して 2-10% と少ない成分であるが、様々な細胞内のシグナル伝達に関わる重要な分子であることが知られている。イノシトール環へのリン酸の結合する部位(1,2,3,4,5)によって結合するタンパク分子が異なり、これによってシグナル伝達の経路の分配が行なわれている。特に PI(3,4,5)P3 は、細胞膜に最も多く存在するイノシトールリン

脂質である PI(4,5)P₂ から、PI3-kinase によって合成され、Akt へのシグナル伝達を介して細胞増殖に関わり、がんの発生の鍵を握る分子として知られている。研究代表者は PI(3,4)P₂ が浸潤突起に特異的に濃縮していることを見だし、これが浸潤突起形成に果たす役割及び生成メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PI(3,4)P₂ の産生に関わっている酵素群の同定：抗体染色、RNAi 法により PI(3,4)P₂ 産生に関わるイノシトールリン脂質代謝酵素を探索した。PI(3,4)P₂ の産生は、PI(3,4,5)P₃ の 5 位のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼ、SHIP や synaptojanin の関与が考えられた。それぞれに特異的な抗体を用いた免疫染色、RNAi 法による発現抑制を行い、PI(3,4)P₂ 産生(特異的結合ドメインを用いて可視化)や浸潤突起形成に及ぼす影響を調べた。

(2) PI(3,4)P₂ とアクチン重合を結ぶタンパクの同定とその性質の解析：浸潤突起に存在することが知られる既存のタンパクの中から、脂質結合ドメインを持つものを抽出し、各々の脂質結合特異性を調べた。脂質結合特異性はリポソーム共沈法にて確認した。さらにこの分子を RNAi 法による発現抑制を行い、浸潤突起形成に及ぼす影響を調べた。

(3) 二次元及び三次元環境における浸潤突起形成の分子イメージング：上記(1),(2)による浸潤突起形成メカニズムに関する知見について、イメージングにより検証した。FA における分子の動態観察には、全反射蛍光(TIRF)顕微鏡を用いた。また、実際のがん細胞の置かれている三次元の環境下でも当てはまるのかを、コラーゲンゲル内で培養した条件で顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

研究代表者は本研究において、以下のことを明らかにした。

(1) 様々なイノシトールリン脂質結合ドメインを用いて、活性化型 Src で形質転換した細胞内のイノシトールリン脂質の局在を可視化したところ、PI(3,4)P₂ が浸潤突起に強く濃縮している。

(2) PI(3,4)P₂ の産生には PI3-kinase と、

PI(3,4,5)P₃ の 5 位の脱リン酸化酵素である synaptojanin2 とが関与しており、いずれも浸潤突起形成及び浸潤に必須である。

(3) RNAi 法により浸潤突起形成に関わるいくつかのタンパクの発現を抑制し、浸潤突起が形成されていない状態で、(1)と同様に様々なイノシトールリン脂質結合ドメインを用いて細胞内のイノシトールリン脂質の局在を観察すると、やはり PI(3,4)P₂ がフォーカルアドヒージョン(FA)に濃縮していた。通常の FA には PI(3,4)P₂ は存在しないことから、FA における PI(3,4)P₂ の産生が浸潤突起形成の引き金になっている可能性が考えられる。

(4) この下流で浸潤突起形成に関わる分子として、2005 年に同定されたアダプター分子 Tks5 に注目し、質量分析による結合タンパクの探索を中心にその機能解析を行った。その結果、Tks5 はその PX ドメインで PI(3,4)P₂ や PI(3,4,5)P₃ と相互作用し、SH3 ドメインで dynamin やアクチン重合に関わる N-WASP と相互作用することで、上に述べた FA におけるイノシトールリン脂質の変化をアクチン重合へと変換する働きをしていることが示唆された。

(5) Tks5 はさらに、Src の活性依存的にもうひとつのアダプター分子である Grb2 と結合した。このことが FA での Tks5-PI(3,4)P₂ 相互作用を安定化させていると考えられる。

本研究により、細胞内にごく微量存在するイノシトールリン脂質である、PI(3,4)P₂ が浸潤突起形成を制御していることが示された。浸潤や骨代謝における浸潤突起の重要性と、この構造の持つ特異性、そして限局された PI(3,4)P₂ 産生という事実から、本研究による PI(3,4)P₂ の産生機構やターゲット分子を介したシグナル伝達とその制御メカニズムの解明は、基礎科学においてのみならず、がんや骨代謝疾患の治療にも貢献するものであると考えられる。

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 2 件)

Oikawa T and Takenawa T.

PtdIns(3,4)P₂ instigates focal adhesions to generate podosomes
Cell Adhesion and Migration
2009 3, 195-197 (査読有り)

Oikawa T, Itoh T, Takenawa
T.

Sequential signals toward
podosome formation in NIH-src
cells

J Cell Biol. 2008 182, 157-169 (査読有り)

[学会発表](計 1件)

Sequential Signals Toward Podosome
Formation in NIH-src cells

及川 司、伊藤俊樹、竹縄忠臣

第 60 回日本細胞生物学会大会 (横浜)

2008 年 6 月 29 日 - 7 月 1 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/oikawa/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

及川 司 (OIKAWA TSUKASA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 20457055

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし