

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07575

研究課題名（和文）ゴルジ体微小管の構築制御に基づく癌細胞の集団的浸潤機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of collective invasion of cancer cells based on the regulation of Golgi-derived microtubules

研究代表者

西田 満 (Nishita, Michiru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30379359

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）：癌細胞集団内のリーダー細胞は、高い運動能と極性を持ち、集団浸潤を駆動する。しかし、リーダー細胞の運命決定や特性の発現機構は明らかでない。本研究では、細胞の極性制御に関わるゴルジ体微小管に着目し、リーダー細胞におけるその構築機構と浸潤特性との関係を明らかにすることを目的とした。ヒト大腸癌細胞のマトリジェル内での集団的浸潤能を評価した結果、一次繊毛形成に関わるIFT20タンパク質が集団浸潤を促進することを見出した。また、IFT20はリーダー細胞に特徴的な極性化および安定化したゴルジ体微小管の形成に関わることで、さらに、IFT20がゴルジ体におけるc-Srcの活性化に関与することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、リーダー細胞のゴルジ体微小管の構築が癌細胞の集団浸潤に重要な役割を持つことを見出した点にある。特に、IFT20がリーダー細胞の極性化および安定化したゴルジ体微小管の形成に関与することを示したことで、癌細胞の集団浸潤のメカニズムに新たな知見を提供した。社会的意義としては、リーダー細胞の特性とその制御機構の一部を明らかにしたことで、癌の新たな治療法開発に繋がる可能性を示した点にある。ゴルジ体微小管を標的とした治療法が転移性癌の抑制に有効であることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Leader cells within a cancer cell cluster exhibit high motility and polarity, driving collective invasion. However, the mechanisms behind leader-cell fate determination and the expression of their characteristics remain unclear. In this study, we focused on Golgi-derived microtubules, which regulate cell polarity, aiming to elucidate their organizational mechanisms in leader cells and their roles in invasion characteristics. We evaluated the collective invasive ability of human colon cancer cells in Matrigel and found that the IFT20 protein, which is involved in the formation of primary cilia, promotes collective invasion. Additionally, we discovered that IFT20 plays a role in forming polarized and stabilized Golgi-derived microtubules characteristic of leader cells and is involved in the activation of c-Src in the Golgi apparatus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 癌浸潤 ゴルジ体 細胞極性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼは動物種を越えて保存されており、脊椎動物においては Ror1 と Ror2 が存在する。我々はこれまでに、Ror2 が Wnt5a 受容体として非古典的 Wnt 経路を活性化し、細胞の極性や移動等を制御していることを明らかにしてきた(Nishita *et al.*, J Cell Biol 2006; Nomachi *et al.*, J Biol Chem 2008; Nishita *et al.*, Mol Cell Biol 2010)。また、マウスの腎臓発生過程において、Ror1 と Ror2 が Wnt5a 受容体として協調的に後腎間葉の適切な配置制御を担っていることを明らか上皮性の癌細胞の多くは細胞間接着を保持したまま集団となって浸潤することが知られており、そのような浸潤形態が転移能と密接に関連している(Aceto *et al.* Cell 2014)。癌細胞集団内で浸潤方向の先頭に位置する細胞をリーダー細胞、その後方に位置し細胞間接着を介してつながっている細胞をフォロワー細胞と呼ぶ。リーダー細胞は浸潤方向に沿った極性と高い運動能を有し、フォロワー細胞を牽引することで集団的浸潤を駆動する中心的役割を担っている。興味深いことに、リーダー細胞が疲弊しエネルギー不足に陥ると、背後のフォロワー細胞が新たなリーダー細胞として入れ替わり、集団的浸潤は継続的に進行する(Zhang *et al.* PNAS 2019)。しかし、現状としてリーダー細胞の性質に関する認識は曖昧で、リーダー細胞の運命決定機構やその可塑的浸潤特性の発現・制御機構も不明である。このことを明らかにすることは、集団的浸潤のメカニズム解明と新たな癌の診断・阻害方法の開発にとって重要である。

2. 研究の目的

一般に、上皮細胞の分化過程において、微小管は中心体性から非中心体性へと変化することが知られている(Nishita *et al.* J Biochem (Review) 2017)。すなわち、分化前の細胞では中心体から微小管が伸びており、分化に伴い微小管は中心体から解離し、そのマイナス端が上皮細胞の頂端膜直下に係留されることで頂底極性に沿った微小管構造が形成される。我々は、上皮形質を保持している大腸癌細胞株(DLD1)をマトリゲル中で培養すると、微小管の多くがゴルジ体にマイナス端を付着した状態「ゴルジ体微小管」として存在することに気が付いた。また、細胞集団の中では、リーダー細胞のみが浸潤方向に配向(極性化)し、かつ高度に安定化したゴルジ体微小管を構築すること、また、リーダー細胞の極性化・安定化ゴルジ体微小管の構築において、IFT20 (Intraflagellar transport 20)と呼ばれるゴルジ体局在タンパク質が必須な役割を担っていることを見出した(Aoki, Nishita *et al.* Cancer Sci 2019)。しかし、IFT20 が如何にしてゴルジ体微小管の構築を制御しているのか、その分子機構は明らかでない。私は、これまでの微小管動態解析の結果などを踏まえ、「DLD1 細胞のゴルジ体微小管は、中心体微小管がゴルジ体に転移することで形成され、特にリーダー細胞では IFT20 依存的に極性化・安定化される」のではないかと考えた。本研究ではこの仮説を検証することで、リーダー細胞におけるゴルジ体微小管の構築制御機構とその可塑的浸潤特性における役割を明らかにする。さらに、リーダー細胞とフォロワ

一細胞の形態的・機能的違いをもたらす分子基盤を解明し、リーダー細胞の運命決定機構の理解を目指す。

3．研究の方法

各種ヒト大腸癌細胞株 DLD1、HCT116、SW480 は、10% FBS を含む RPMI-1640 を使用し 37℃、5% CO₂ 下で培養した。細胞への siRNA のトランスフェクションは、lipofectamine RNAiMAX を用いた。ウェスタンブロットティングには、一次抗体として抗 Ror2 抗体、抗 IFT20 抗体、抗 tubulin 抗体、二次抗体として goat anti-rabbit IgG(H+L)-HRP または goat anti-mouse IgG(H+L)-HRP を用いた。

浸潤能の評価のため、2 well culture-insert の各 insert に confluent になるまで細胞を培養し、insert を除去した細胞集団を Matrigel で覆い、さらに培地を添加して培養した。2 well culture-insert により分けた二つの細胞集団間のギャップの面積を計測し浸潤能を評価した

EB1-GFP を安定に発現する DLD1 細胞株を作製するため、DLD1 細胞に EB1-GFP plasmid をエレクトロポレーション(CUY21Edit, Nepagene)を用いて導入した。その後、最終濃度 500 μg/ml の G418 を含む 10%FBS+RPMI-1640 で培養しクローン単離を行った。

EB1-GFP を安定発現する DLD1 細胞のライブセルイメージングは、LSM700 を用いて行い、MatLab (Mathworks Inc.)およびアドインソフトの U-Track を用いて EB1-GFP のトラッキングを行った。

4．研究成果

各種ヒト大腸癌細胞株を用いて、集団的癌細胞浸潤におけるゴルジ体微小管の構築制御機構について検討した。まず、ゴルジ体微小管の形成制御に関わる IFT20 とその発現制御に関わる Ror2 が、用いた大腸癌細胞株に発現しているのかどうか Western blot 法によって解析した。その結果、HCT116 細胞と SW480 細胞では Ror2 の発現がほぼ同じレベルで認められたが、DLD1 細胞では Ror2 の発現は検出されなかった。一方、IFT20 の発現はこれら全ての細胞株で認められ、中でも DLD1 細胞では他に比べて高いレベルの発現が確認された。次に、Ror2 の発現が確認された HCT116 細胞と SW480 細胞において、Ror2 ノックダウンが IFT20 の発現に与える影響を検討した。その結果、HCT116 細胞では Ror2 ノックダウンによって IFT20 の顕著な発現低下が認められたが、SW480 細胞では IFT20 の発現レベルに変化は認められなかった。したがって、Ror2 による IFT20 の発現誘導は細胞種特異的な現象であると考えられた。次に、これらの大腸癌細胞株のマトリジェル内における集団的浸潤能を解析した。その結果、HCT116 細胞では Ror2 ノックダウンにより集団的浸潤能が低下したが、SW480 細胞では Ror2 ノックダウンによる集団的浸潤能への影響は認められなかった。一方、HCT116 細胞と SW480 細胞ともに IFT20 ノックダウンによって集団的浸潤能が顕著に低下した。さらに、Ror2 の発現が検出されない DLD1 細胞においても、IFT20 ノックダウンによって集団的浸潤能が顕著に低下した。これらの結果から、IFT20 は、Ror2 の発現の有無に関わらず、大腸癌細胞の集団的浸潤を促進する役割を担っていることが示唆された。

次に、DLD1 細胞を用いて集団的浸潤過程での、リーダー細胞とフォロワー細胞におけるゴルジ体由来および 中心体由来微小管の動態について検討した。安定化微小管のマーカであるアセチル化チューブリンの免疫蛍光染色を行った結果、癌細胞集団の中でも、特にリーダー細胞において浸潤方向へ極性化したアセチル化チューブリンの強い染色が観察され、微小管が安定化し蓄積していることが確認された。そこで、リーダー細胞での微小管安定化における IFT20 の役割について検討するため、IFT20 をノックダウンした DLD1 細胞を用いて同様の解析を行った。その結果、IFT20 をノックダウンしたリーダー細胞においては、アセチル化チューブリンで染色される微小管が浸潤方向とは関係ない方向に伸びたり、曲がったりしていることが観察された。同様の結果は、HCT116 細胞においても認められた。したがって、リーダー細胞において IFT20 は極性化した安定化微小管のネットワーク形成に必須な役割を担っていることが示された。一方、これらの実験において観察されたアセチル化チューブリンのほとんどは、中心体に接していなかったことから、ゴルジ体由来微小管である可能性が考えられた。実際、アセチル化チューブリンとゴルジ体の二重染色を行った結果、ほとんどの、アセチル化チューブリンはゴルジ体と接していることが観察された。さらに、IFT20 をノックダウンすることによりゴルジ体周囲のアセチル化チューブリンの蛍光強度が低下した。したがって、IFT20 はリーダー細胞においてゴルジ体由来微小管の安定化と極性化に寄与することが示された。

以上の結果を踏まえ、IFT20 がゴルジ体由来微小管の安定化・極性化を制御する機構を理解するため、ゴルジ体由来微小管の動態をライブセルイメージングによって解析した。まず、複数の大腸癌細胞株に微小管プラス端マーカである EB1-GFP の発現プラスミドを導入し、安定発現株を複数樹立した。これらの各細胞株について、ライブセルイメージング解析により EB1-GFP の移動速度を計測した。その結果どの細胞株も同じスピードで EB1-GFP が移動することが確認されたため、以降は DLD1 細胞の 1 クロウンを主に用いて解析した。IFT20 が浸潤細胞の微小管動態にどのような役割を担っているのか検討するため、EB1-GFP 発現 DLD1 細胞の 2D invasion assay において、リーダー細胞でのライブイメージング解析を行った。EB1-GFP のトラッキング解析のため、MatLab およびアドインソフト の U-Track を用いた。各トラックの浸潤方向に対する角度（浸潤方向に伸長するものが 0° 、中心側へ伸長するものが 180° となる）を計測した結果、コントロール細胞に比べ IFT20 ノックダウン細胞では浸潤方向（ 0° 方向）に伸長する微小管の数が低下した。さらに、IFT20 をノックダウンしたリーダー細胞において、微小管伸長が一時的に停止する頻度が増加した。一方、微小管の伸長速度自体は IFT20 ノックダウンによる変化は認められなかった。以上の結果から、DLD1 細胞の集団的浸潤において、IFT20 はリーダー細胞における極性化した微小管伸長を制御していることが示唆された。

以上のように、IFT20 がゴルジ体の浸潤側への再配置を制御していることやリーダー細胞における安定化微小管の形成に関与していることを見出したが、それらの研究を遂行する過程で、IFT20 のノックダウンによってゴルジ体における c-Src のリン酸化レベルが顕著に減弱することを見出した。ゴルジ体における c-Src の活性化はタンパク質の順行性輸送を促進することが知られている。そこでリーダー細胞において IFT20 が c-Src を介してタンパク質輸送を制御し

ている可能性について検討した。IFT20 が MT1-MMP のゴルジ体内輸送を促進することを以前報告しているため、研究アプローチとして MT1-MMP の輸送に焦点を当てた。まず、リーダー細胞における MT1-MMP のゴルジ輸送効率を定量解析するため、MT1-MMP を温度感受性 VSVG(水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質) 変異体との融合タンパク質として DLD1 細胞に発現させ、培養温度を変化させることによって MT1-MMP の小胞体 シスゴルジ トランスゴルジネットワーク (TGN) 細胞膜の各輸送速度を解析した。これらの結果、IFT20 の発現抑制によって VSVG-MT1-MMP の小胞体から細胞膜への輸送効率が低下したが、c-Src 阻害剤処理や恒常的活性型変異体である v-Src を過剰発現させた細胞では、ゴルジ体の形態が異常となったため、VSVG-MT1-MMP の輸送効率を正確に評価することは難しいと判断した。したがって、IFT20 は c-Src のゴルジ体におけるリン酸化を促進するが、その意義の解明にはさらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saji Takeshi, Nishita Michiru, Ikeda Kazuho, Endo Mitsuharu, Okada Yasushi, Minami Yasuhiro	4. 巻 298
2. 論文標題 c-Src-mediated phosphorylation and activation of kinesin KIF1C promotes elongation of invadopodia in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102090 ~ 102090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102090	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 Okamoto Daiki, Yamauchi Natsuko, Takiguchi Gosuke, Nishita Michiru, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro, Kamizaki Koki	4. 巻 27
2. 論文標題 Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 368 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12933	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 Sonoda Dai, Kamizaki Koki, Matsuo Yukiko, Aruga Kana, Mikubo Masashi, Yamashita Keishi, Nishita Michiru, Minami Yasuhiro, Satoh Yukitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Characterization of morphological alterations in micropapillary adenocarcinoma of the lung using an established cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	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) 10.3892/or.2021.8230	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 Okamoto Daiki, Yamauchi Natsuko, Takiguchi Gosuke, Nishita Michiru, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro, Kamizaki Koki	4. 巻 -
2. 論文標題 Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	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) 10.1111/gtc.12933	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 Nishita Michiru, Kamizaki Koki, Hoshi Kyoka, Aruga Kana, Nishikaku Ikumi, Shibuya Hiroshi, Matsumoto Kunio, Minami Yasuhiro	4. 巻 299
2. 論文標題 Rho family small GTPase Rif regulates Wnt5a-Ror1-Dvl2 signaling and promotes lung adenocarcinoma progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105248 ~ 105248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105248	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡部祐亮、星京香、紙崎孝基、澁谷浩司、南康博、西田満
2. 発表標題 Rif低分子量Gタンパク質の細胞内局在と機能の制御機構
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koki Kamizaki, Michiru Nishita, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Rif regulates Wnt5a-Ror1 signaling to induce filopodia-mediated progression of lung adenocarcinoma cells
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐事 武、西田 満、遠藤 光晴、岡田 康志、南 康博
2. 発表標題 c-Src mediated phosphorylation and activation of KIF1C promotes invadopodia maturation in cancer cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙崎孝基、南康博、西田満
2. 発表標題 Ror1-Rif signaling mediates filopodia formation to promote invasion and vasculogenic mimicry of lung adenocarcinoma cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙崎孝基、佐事武、南康博、西田満
2. 発表標題 Wnt5a-Rorシグナルが制御する細胞膜突起形成とがん細胞浸潤
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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

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