

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：55501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15499

研究課題名（和文）癌細胞転移における新規Wntシグナル伝達経路の分子機序解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of a novel Wnt signalling pathway in cancer cell metastasis.

研究代表者

小林 和香子（Kobayashi, Wakako）

宇部工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：30735337

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）：LEF-1による上皮-間葉転換（EMT）に関して、 β -カテニンが必要ない事が証明された。LEF-1が β -カテニンとは違う分子と結合し、EMTを引き起こしていると考え、LEF-1のEMT誘導境界領域の探索とLEF-1の新規結合相手の探索を行った。LEF-1によるEMT誘導において重要な部分が、LEF-1のアミノ酸198-211番目であることを突き止めた。EMTを誘導した細胞株は、EMTを誘導しない細胞株に比べ、遊走能、浸潤能も亢進していた。LEF-1の新規結合相手の探索に関しては、Smad分子をターゲットとしたが、免疫沈降による共沈は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナルは一般的には下流の転写因子LEF-1が β -カテニンと結合し、EMT誘導転写因子の転写を活性化させる。しかし、本研究結果は β -カテニンと結合できないLEF-1変異体でもEMTを誘導し、EMT誘導の境界を同定することができた。実際、臨床検体ではLEF-1と β -カテニンの非共局在や、 β -カテニン結合部位であるN末端を欠損したNLEF-1で皮脂腺腫瘍を形成するという報告がある。今回の研究成果は、「 β -カテニン非存在下でもLEF-1によるEMT誘導が起こる」ことを意味し、「 β -カテニンとは独立したLEF-1が絡む新たなシグナル伝達経路」の存在を示したことに学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The absence of β -catenin for epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by LEF-1 has been demonstrated. In the search for new binding partners of LEF-1, the Smad molecule was targeted, but no coimmunoprecipitation was obtained by immunoprecipitation, and Co-precipitation by immunoprecipitation was not obtained.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：LEF-1 EMT β -カテニン Wntシグナル CRISPR/Cas9 Smad

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的なWntシグナル伝達経路は、Wnt受容体にWntタンパク質が結合すると、細胞内にβ-カテニンが蓄積し、一部は核内に移行する。核内に入ったβ-カテニンはLEF-1と結合し、EMT誘導転写因子*Slug*の転写を活性化する^[1]。しかし、β-カテニンと結合できず、EMT誘導転写因子の転写を活性化し得ないとされるNLEF-1変異体でも皮脂腺腫瘍を引き起こす^[2]。また、臨床検体でもβ-カテニンの必要性が疑問視されている。以上から、LEF-1による発癌やEMT誘導にβ-カテニンが本当に関わるのか未だ明確な回答はなかった。

これまでのLEF-1によるEMT誘導に関する研究は、β-カテニンが引き金となると考えられており、β-カテニン蓄積量が多いと言われるヒト大腸癌細胞株を用いた研究に限定されていた。「β-カテニン分解系は正常で、且つ、EMT研究に広く用いられるMDCK細胞」を用いた場合、大腸癌細胞株を用いて得られた結果と同じになるのか、これが本申請の動機となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌細胞転移に関わる転写因子LEF-1のEMT誘導に重要な領域を同定する事、さらには、LEF-1に結合し、EMTを誘導する新たな分子を見つけることである。

3. 研究の方法

研究方法は以下のとおりである。

1) NLEF-1変異体シリーズ(全8種類)の作製及びLEF-1によるEMT領域の同定

β-カテニン結合領域であるN末端を欠損したNLEF-1変異体をMDCK細胞に遺伝子導入した際、EMTを誘導した。このことから、EMT誘導に重要なLEF-1領域を決定するため、NLEF-1変異体シリーズを作製し、EMTを誘導する変異体と、そうでない変異体の境界を形態学的、分子生物学的に解析する。

2) 候補分子Smadの検討

LEF-1と結合することが既に報告されているSmad分子に着目し、LEF-1とSmadの結合を免疫沈降を用いて行う。また、CRISPR/Cas9システムによるSmadノックアウトも試みる。LEF-1による免疫沈降後、銀染色を行いLEF-1結合分子の探索も行う。

4. 研究成果

1) NLEF-1変異体シリーズ(全8種類)の作製及びLEF-1によるEMT領域の同定

LEF-1のアミノ酸1-56番目はβ-カテニン結合部位であり、その領域を欠損したNLEF-1をMDCK細胞に導入したところEMTを誘導したことが分かっていた。また、β-カテニンをノックアウトしたMDCK細胞にLEF-1を導入したところ、EMTを誘導していた^[3]。そのため、LEF-1によるEMT誘導にβ-カテニンが必要ないことが分かっていたが、ではLEF-1のどの領域がEMT誘導に重要であるのかが重要になる。これを調べるために、図1に示す8種類のN末端欠損LEF-1変異体(HAタグ付き)を作

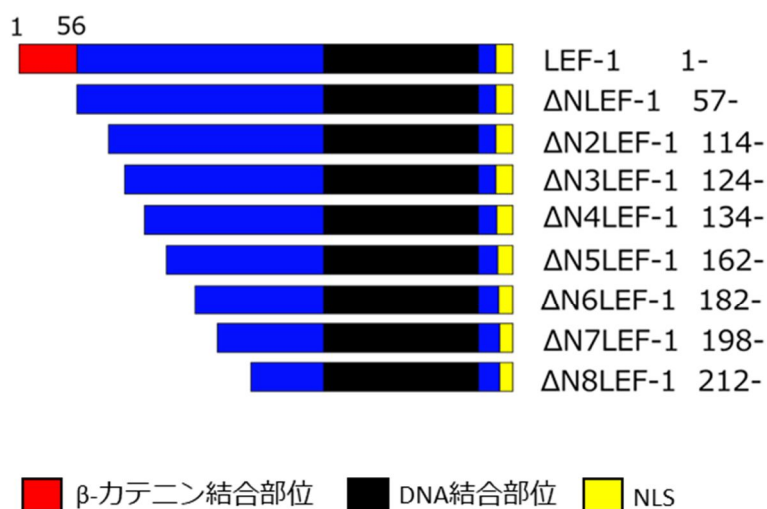


図1 ΔNLEF-1変異体シリーズの模式図

製し、MDCK 細胞に遺伝子導入して安定発現株を得た。

その結果、LEF-1 のアミノ酸 198 番目からの N7LEF-1 変異体では線維芽細胞様の形態変化と E-cadherin の消失、p120-カテニンのアイソフォームスプライシングパターンの変化、間葉系マーカーであるビメンチンのたんぱく発現が増加していた。しかし、LEF-1 のアミノ酸 212 番目からの N8LEF-1 変異体では、上皮様の形態を維持しており、EMT マーカーの変化も得られなかった (図 2)。このことから、LEF-1 による EMT 誘導には LEF-1 のアミノ酸 198-211 番目が重要であることが分かった。

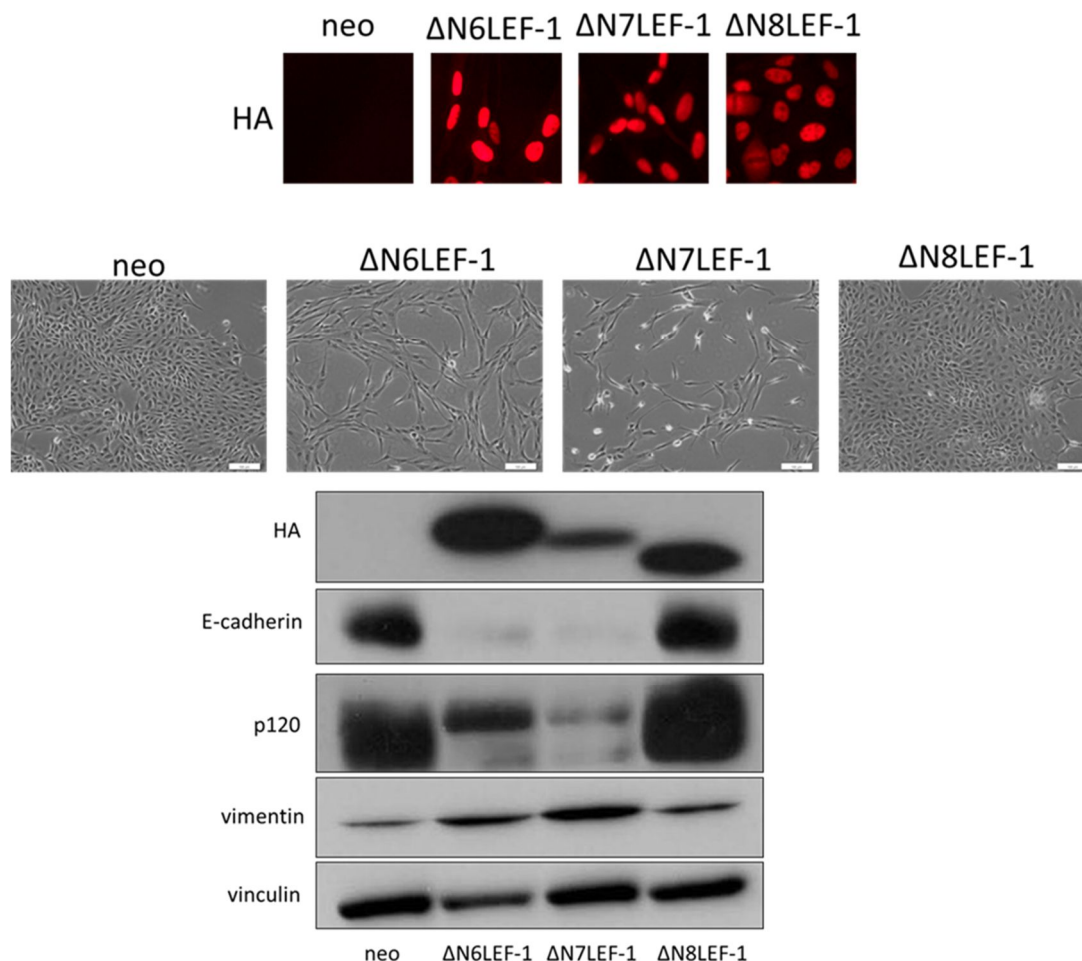


図 2 LEF-1変異体によるEMT誘導の境界の同定

2) 候補分子Smadの検討

これまでの報告から、Smad 分子は LEF-1 と結合し、癌細胞転移にも関わる分子である^[4]。EMT を誘導した N7LEF-1 変異体と、EMT を誘導しなかった N8LEF-1 変異体で Smad 分子との結合を確かめるため、免疫沈降を行った。しかし、LEF-1 変異体と Smad の結合を確認することはできなかった。Smad 分子のノックアウトベクターを作製し、EMT 誘導細胞に遺伝子導入をすることで、細胞形態や EMT マーカーの発現に変化がみられるか検討をした。gRNA を設計し、gRNA クローニング部位とヒト Cas9 をコードする all-in-one ベクターである pCGSap を用いて LEF-1 変異体発現細胞に遺伝子導入をしたが、クローンを得ることができなかった。

LEF-1 変異体に結合する分子をさらに探索するために、LEF-1 (HA タグ) で免疫沈降後、銀染色を行った。EMT 誘導の有無で、銀染色の結果に差がみられるか確かめたが、顕著な差がみられるバンドは得られなかった。

<引用文献>

- [1] Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7(344), 2015
- [2] Niemann C et al. Dual role of inactivating Lef1 mutations in epidermis: tumor promotion and specification of tumor type. *Cancer Res.* 67 (7):2916-21, 2007
- [3] Kobayashi W, Ozawa M. The epithelial-mesenchymal transition induced by transcription factor LEF-1 is independent of β -catenin. *Biochem Biophys Res.* 15:13-18, 2018
- [4] LaGamba D et al. Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dyn.* 234 (1):132-42, 2005

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林和香子
2. 発表標題 転写因子LEF-1変異体による上皮-間葉転換誘導領域の同定
3. 学会等名 第62回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木衣織, 小林和香子
2. 発表標題 癌細胞転移関連転写因子 Snailによる糖転移酵素の発現解析
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松丸和樹, 小林和香子
2. 発表標題 SW480細胞における糖転移酵素fucosyltransferase-3 (FUT-3)導入による接着性解析
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryusei Sato, Wakako Kobayashi
2. 発表標題 The transcription factor of Snail suppresses glycosyltransferase expression
3. 学会等名 The 5th NIT-NUU Bilateral Academic Conference (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------