

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790319
 研究課題名(和文) ネクチン-アフアディン系の上皮-間葉・間葉-上皮転換における役割と作用機構
 研究課題名(英文) Roles of the nectin-afadin system in epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions
 研究代表者
 扇田 久和 (OGITA, HISAKAZU)
 神戸大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：50379236

研究成果の概要(和文)：上皮-間葉転換では、細胞間接着の破綻と細胞運動の亢進、逆に、間葉-上皮転換では、細胞間接着の形成と接着面での細胞極性が重要であるが、本研究では、接着分子ネクチンと構造上類似するネクチン様分子、ネクチンの細胞内領域に結合する分子アフアディンおよびその関連分子が増殖因子刺激に対する細胞運動を促進すること、さらに、その分子機構を明らかにした。また、上皮細胞の細胞極性を制御する分子機構に、アフアディンが別のアダプター分子と結合して重要な役割を果たしていることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The disruption of cell-cell junctions and the increase in cell movement play important roles in the epithelial-mesenchymal transition. On the other hand, the cell-cell junction formation and cell polarization at the interface between neighboring cells are crucial for the mesenchymal-epithelial transition. In this study, nectin-like molecules, which resemble cell adhesion molecules nectins in their molecular structure, afadin, which binds to the cytoplasmic region of nectins, and their related molecules were shown to promote the growth factor-induced cell movement. The underlying mechanisms were also elucidated. The interaction of afadin with another adaptor protein was essential for the cell polarization of epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：ネクチン、アフアディン、ネクチン様分子、インテグリン、増殖因子受容体、低分子量Gタンパク質、がん

1. 研究開始当初の背景

上皮組織では隣り合う上皮細胞が細胞間接着装置によって強固に連結し、整列することにより、上皮組織の形態維持と機能発現に重要な役割を果たしている。上皮細胞の細胞

間接着機構についてはこれまでに詳しく解析されており、細胞間接着は細胞同士の物理的な接着のみならず、細胞の極性形成、増殖、運動、生存など様々な細胞機能にとって必須である。上皮細胞の主な細胞間接着装置とし

てタイトジャンクション (TJ) とアドヘレンスジャンクション (AJ) がある。TJ には細胞間隙を水溶性物質が通過しないようにするバリア機能と、細胞膜上にあるタンパク質や脂質が頭頂側と側基底側の間で混在するのを防ぐフェンス機能がある。また、AJ はアクチン線維に富み、主に細胞間の機械的な接着を担っている。

AJ においてはこれまでカドヘリンが主要な接着分子として考えられてきたが (Takeichi M. *Science*. 1991)、カドヘリンの作用だけでは説明のつかない現象も存在する。私が現在研究を行っている研究室で、AJ に局在する新規の接着分子としてネクチンが見出され、様々な研究の結果、ネクチンおよびネクチンと細胞内で結合する分子アフアディンが、カドヘリンによる AJ の形成や、AJ 形成後の TJ 形成において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになっている。私どもはその分子機構の究明に精力的に取り組み、世界に先駆けてその全容をほぼ解明してきた (Ogita H and Takai Y. *IUBMB Life*. 2006; Ogita H and Takai Y. *Int Rev Cytol*. 2008; Takai Y, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008)。すなわち、細胞間接着が形成される際、まず最初に、ネクチン同士の結合により初期の細胞間接着が生じる。次に、このネクチン同士の結合により、細胞内シグナル伝達経路が活性化される。特に、低分子量 G タンパク質 Rap1、Cdc42、Rac の活性化が重要であり、これらの分子の活性化によりアクチン細胞骨格が再編成され、カドヘリンがネクチンによる初期の細胞間接着部位にリクルートされて AJ が形成される。この過程で、アフアディンはカドヘリンの細胞膜上での安定化や接着活性の上昇に関与する。また、ネクチンによる細胞内シグナル伝達の活性化には、細胞-基質間の接着を担うインテグリン $\alpha v \beta 3$ の活性化も必要である。AJ 形成後、AJ の頭頂側に接着分子クローディングがリクルートされて TJ が形成されることにより、一連の細胞間接着形成が完成する。ネクチン-アフアディン系はカドヘリンによる AJ 形成だけでなく、クローディングによる TJ 形成においても重要である。

このようにして形成された細胞間接着はいったん完成すると不変なものではなく、増殖因子や物理的的刺激によって活発にリモデリングを繰り返している。特に、上皮細胞ががん化すると細胞間接着は破綻し、上皮細胞は間葉系細胞様に形態を変化させ、細胞の運動と増殖が亢進する。この現象は上皮-間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) と呼ばれている。この結果、がん細胞は浸潤・転移能を獲得し悪性化する。ネクチン-アフアディン系が EMT に関わる機構として、肝細胞増殖因子 (HGF) などの刺激に

よって活性化したメタロプロテアーゼによりネクチンの細胞外領域が切断され、細胞間でネクチン同士の結合が減少し、このことがエンドサイトーシス機構の亢進などを惹起して、カドヘリンなどの細胞間接着分子を細胞表面から減少させ、EMT の原因の一つである全面的な細胞間接着の破綻に進展することが挙げられる。また私どもは、AJ の形成に必要なインテグリン $\alpha v \beta 3$ の活性化が、AJ 形成後、速やかに不活性化される過程において、ネクチンが脱リン酸化酵素 PTP μ を活性化し、インテグリンの活性化を促進する I 型ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼの作用を抑制するといった新しい分子機構を明らかにしている (Sakamoto Y, et al. *J Biol Chem*. 2008)。このキナーゼによるインテグリン $\alpha v \beta 3$ の持続的な活性化は、細胞間接着の破綻を引き起こし、細胞の運動能を亢進させることから、AJ 形成後のインテグリン $\alpha v \beta 3$ の不活性化は細胞間接着を安定化させ、EMT を抑制する方向に作用するものと考えられる。細胞間接着が破綻すると細胞は遊走を始めるが、運動している細胞の先端にはネクチンと結合しないアフアディンが集積し、このアフアディンは増殖因子によって活性化される細胞運動に必要な細胞内シグナル伝達を制御することも見出している (Nakata S, et al. *J Biol Chem*. 2007)。

このように、ネクチンやアフアディンは細胞間接着の形成だけでなく、細胞間接着の破綻、細胞運動といった EMT の過程にも深く関わっている。しかし、EMT の分子機構についてはまだ不明な点が多く残されている。逆に、EMT のシグナル伝達機構を抑制することや、間葉系細胞における特異的な細胞現象を制御することなどにより、間葉-上皮転換 (Mesenchymal-epithelial transition: MET) を誘導しようと考えられる。実際、肝幹細胞をある条件下で培養すると機能を持った肝上皮細胞へ変化し、MET が生じることが報告されているが、この MET の分子機構についてもこれまでほとんど明らかにされていない。EMT はがん細胞の浸潤・転移能獲得と深く関連し、がんの悪性を強く促進する。そこで逆に、がん細胞に MET を誘導させることによりがん細胞の運動・増殖を抑制し、さらには正常上皮細胞へと戻すことが可能になれば、この研究成果は将来、がん治療などにおける一大ブレイクスルーとなり得る。このように、EMT と MET の分子機構の解明は生物学的のみならず、医学的にも大きな意義があり、世界的にも極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

不明な点がまだ多く残されている EMT や MET の分子機構の解明に向けた研究を行うことを主要目的とする。具体的には、ネクチン、アフアディンやネクチンと構造上類似するネクチン様分子 (Necl) に着目し、これらの分子間での相互作用やこれらの分子が制御するシグナル伝達機構がどのように EMT や MET に関わっているか詳細に検討し明らかにする。さらに、上皮細胞をがん化させた際や、逆に、幹細胞を上皮細胞に変化させた際、ネクチン、アフアディン、Necl と相互作用する分子としてどのようなものが存在するのか出来るだけ網羅的に解析し、この解析によって新しく見出された分子がネクチン、アフアディンまたは Necl と共にどのような機序で EMT や MET の誘導、進展に関わっているか検討し明らかにする。このように、本研究ではネクチン-アフアディン系に焦点を当て、この新しい接着分子システムを中心に、これまででない新しい観点から EMT と MET の分子機構の解明を目指し、さらには、本研究成果の医療応用への可能性を追求していく。

3. 研究の方法

(1) 細胞間接着部位に局在するネクチン-アフアディン系が上皮細胞の細胞極性を制御する分子機構

これまでの私の研究により、ネクチン-アフアディン系が細胞極性の形成に必要であることは明らかになっているが、その分子機構についてはまだまだ不明な点が多く残されている。マウス胚性幹 (ES) 細胞を適切な条件下で培養すると、胚様体が形成され、その内部の細胞では細胞間で AJ、TJ が形成される。一方、アフアディンをノックアウトした ES 細胞から胚様体を形成させても、胚様体内の細胞間接着は非常に減弱し、AJ、TJ の形成は不良になることを私どもは見出している。この実験系を用いて、ES 細胞から胚様体が形成される際に発現が変化する分子や、野生型とアフアディンをノックアウトした胚様体で異なる発現がみられる分子を調べ、ネクチン-アフアディン系が MET に重要な細胞極性を制御する分子機構を解析した。

(2) 細胞運動におけるアフアディンの作用機構

上皮細胞は、EMT の過程において細胞間接着が破綻すると遊走を開始する。アフアディンは細胞内でネクチンと結合することにより、細胞間接着の形成において重要な役割を果たしているが、一方で、アフアディンは運動する細胞の先端端にも集積して細胞

運動に関わるシグナル伝達を制御している (Nakata S, et al. *J Biol Chem.* 2007)。ところで、ネクチンは運動先端端に集積しないことから、運動先端端におけるアフアディンはネクチンと結合していないと考えられる。これまでの予備的実験により、アフアディンが細胞運動の方向性決定において重要であることを私どもは見出しているが、その分子機構については明らかでない。そこで、アフアディンをノックダウンした細胞やアフアディンノックアウトマウスから分離した細胞を用いることにより、その分子機構に関わるシグナル伝達系を解析した。また、アフアディンと結合することが分かっているアダプター分子 ADIP や細胞の運動を制御する低分子量 G タンパク質についても、GFP タグをつけたこれらの分子を発現させ、“生きた細胞”において細胞運動時のそれぞれの分子の局在・活性を時空間的に詳細に解析した。

(3) 運動先端端における Necl-5、PDGF 受容体、インテグリン $\alpha\beta 3$ の三者複合体とアフアディンとの相互作用

運動している細胞の先端端には Necl ファミリーメンバーの一つである Necl-5、PDGF 受容体およびインテグリン $\alpha\beta 3$ の三者が複合体を形成して局在し、細胞の運動・増殖に必須の役割を果たしている (Ikeda W, et al. *J Biol Chem.* 2004; Minami Y, et al. *J Biol Chem.* 2007; Amano H, et al. *Genes Cells.* 2008)。しかし、この複合体とアフアディンがどのように相互作用して細胞の運動・増殖に関わっているかその分子機構は明らかでない。アフアディンと Necl-5 は直接結合しない。また、予備的実験からアフアディンと PDGF 受容体も直接結合しないことが分かっている。以上より、アフアディンは Necl-5 や PDGF 受容体の下流で作用する分子あるいはインテグリン $\alpha\beta 3$ と相互作用する可能性が考えられる。そこで、アフアディンの種々の領域欠損変異体を作成して、共免疫沈降法やリコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析によりこの相互作用を検討した。さらに、アフアディンが Necl-5 を含む三者複合体とどのように連携して細胞の運動・増殖を制御しているのか解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞間接着部位に局在するネクチン-アフアディン系が上皮細胞の細胞極性を制御する分子機構

アフアディンをノックアウトした ES 細胞を用いて胚様体を形成させると、上述のように、胚様体は内胚葉層と外胚葉層を形成するものの、これらの層を構成する細胞間接着構造および細胞極性は著しく乱れていた。その

分子機構の一つとして、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ の発現異常および Cdc42 と極性因子 Par-3 の活性低下が認められることを明らかにした。

次に、上皮細胞の MDCK 細胞を用いた実験では、TJ が AJ の頭頂側に位置するためには、細胞間接着形成過程において、アフアディンと TJ の構成分子である ZO-1 との一時的な結合が必要であることを見出した。さらに、アフアディンと ZO-1 の結合に必要なドメインを明らかにし、このドメインを欠失したアフアディンを導入した MDCK 細胞では TJ の形成が大幅に遅延し、TJ 機能が著しく阻害されるという結果を得た。

(2) 細胞運動におけるアフアディンの作用機構

アフアディンが低分子量 G タンパク質 Rap1、Rac、RhoA の活性を制御して、方向性を持った細胞の運動を促進していることを明らかにした。すなわち、アフアディンは運動先端端において Rap1 と Rac を活性化し、RhoA の活性を抑制した (図 1)。その機序として、アフアディンは Rap1 の活性化因子 C3G、Rac の活性化因子 Vav2 を活性化し、RhoA の抑制因子 ARAP の作用を促進していた。また、Vav2 の活性化にはアフアディンに結合する別のアダプター分子 ADIP が Vav2 と結合することが必要であった。以上のような分子機構により、アフアディンは、PDGF 刺激による運動先端端の形成を効率的に促進し、刺激方向に対する方向性を持った細胞運動を促進していることが明らかになった。

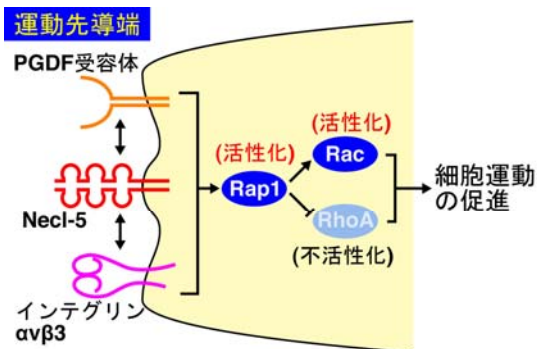


図 1: 運動先端端における低分子量 G タンパク質の活性制御機構

(3) 運動先端端における Necl-5、PDGF 受容体、インテグリン $\alpha 6 \beta 3$ の三者複合体とアフアディンとの相互作用

運動している細胞の先端端には Necl ファミリーメンバーの一つである Necl-5、PDGF 受容体およびインテグリン $\alpha 6 \beta 3$ の三者が複合体を形成して局在し、細胞の運動先端端形成や細胞運動に必須の役割を果たしていることを以前に報告にした。また、アフアディ

ンがネクチン非依存的に運動先端端に集積し、運動先端端の形成に必要なこともこれまでに明らかにしたが、本研究ではさらに詳細な分子機構を解明した。

アフアディンは PDGF 受容体とは直接相互作用しないが、活性化した PDGF 受容体に結合するアダプター分子 Crk、Crk の下流で Rap1 活性化因子として作用する C3G および活性化した Rap1 を介して PDGF 受容体と間接的に相互作用することを見出した。この相互作用により、Necl-5、PDGF 受容体およびインテグリン $\alpha 6 \beta 3$ からなる三者複合体の運動先端端での局在が安定化した。また、活性化した Rap1 はアフアディン内の RA ドメインに結合するが、RA ドメインを欠失したアフアディンを導入した細胞では運動先端端の形成が抑制された。

ところで、Necl-5 の発現とがんの予後に関する臨床研究も行い、肺癌患者の手術時切除標本において、Necl-5 の発現が認められた症例で、有意に術後生存率が低下するとの結果が得られた (図 2)。上述のように、Necl-5 は運動する細胞の先端端に存在し、細胞運動に重要なことから、Necl-5 を発現する肺癌患者が予後不良となる原因として、がん細胞の運動亢進によるがんの浸潤・転移の増加があると推測された。

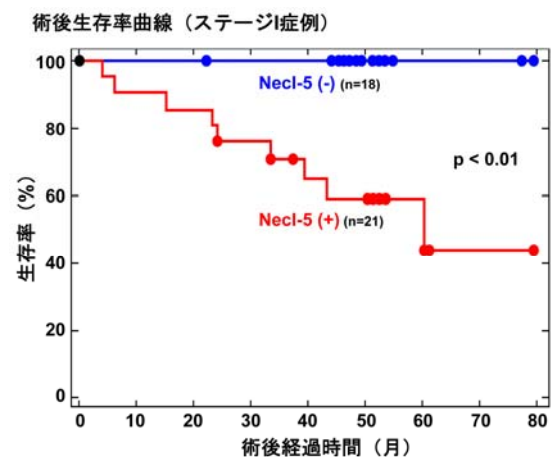


図 2: Necl-5 の発現と術後予後

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 8 件)

全て査読有り。

1. Tawa H, Rikitake Y, Takahashi M, Amano H, Miyata M, Satomi-Kobayashi S, Kinugasa M, Nagamatsu Y, Majima T, Ogita H, Miyoshi J, Hirata K, Takai Y. Role of afadin in vascular endothelial growth factor- and sphingosine

- 1-phosphate-induced angiogenesis. *Circ Res* 106: 1731-1742 (2010)
- Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, Ogita H, Takai Y. Involvement of the Interaction of Afadin with ZO-1 in the Formation of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J Biol Chem* 285: 5003-5012 (2010)
 - Ogita H, Rikitake Y, Miyoshi J, Takai Y. Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86: 621-629 (2010)
 - Nakai R, Maniwa Y, Tanaka Y, Nishio W, Yoshimura M, Okita Y, Ohbayashi C, Satoh N, Ogita H, Takai Y, Hayashi Y. Overexpression of Necl-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 101: 1326-1330 (2010)
 - Miyata M, Rikitake Y, Takahashi M, Nagamatsu Y, Yamauchi Y, Ogita H, Hirata KI, Takai Y. Regulation by Afadin of cyclical activation and inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA Small G proteins at leading edges of moving NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 284: 24595-24609 (2009)
 - Miyata M, Ogita H, Komura H, Nakata S, Okamoto R, Ozaki M, Majima T, Matsuzawa N, Kawano S, Minami A, Waseda M, Fujita N, Mizutani K, Rikitake Y, Takai Y. Localization of nectin-free afadin at the leading edge and its involvement in directional cell movement induced by platelet-derived growth factor. *J Cell Sci* 122: 4319-4329 (2009)
 - Majima T, Ogita H, Yamada T, Amano H, Togashi H, Sakisaka T, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Takai Y. Involvement of afadin in the formation and remodeling of synapses in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 539-544 (2009)
 - Kawano S, Ikeda W, Kishimoto M, Ogita H, Takai Y. Silencing of ErbB3/ErbB2 signaling by immunoglobulin-like Necl-2. *J Biol Chem* 284: 23793-23805 (2009)

[学会発表] (計 3 件)

- 扇田久和 新しいがん浸潤・転移のメカニズム (がん研究入門コース) 日本癌学会

学術総会 2010年9月23日、大阪市

- 扇田久和、池田わたる、高井義美 接着分子と増殖因子受容体の相互作用とそのがん治療への応用に向けて (シンポジウム) 日本癌学会学術総会 2009年10月2日、横浜市
- 扇田久和、高井義美 ネクチン-アフアディン系による細胞の運動と接着制御におけるホスファターゼの役割と作用機構 (シンポジウム) 日本生化学会大会 2009年10月23日、神戸市

[図書] (計 1 件)

Togashi H, Ogita H, Takai Y. Nectins and Nectin-Like Molecules in the Nervous System. *The Sticky Synapse* 185-206. (2009) Springer.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇田 久和 (OGITA, HISAKAZU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50379236