

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790328

研究課題名(和文)

がん細胞浸潤突起の形成と退縮の分子機構

研究課題名(英文)

Molecular mechanisms of the formation and reduction of invadopodia

研究代表者

白壁 恭子 (SHIRAKABE KYOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00345315

研究成果の概要(和文): 癌細胞が高い運動能を持つ上で重要な役割を果たしていると考えられている膜構造である“浸潤突起”の形成と退縮を制御する分子機構を、シェディングと呼ばれる膜蛋白質のプロセッシングとの関係に注目して解析した。極めて残念ながら HeLa 癌培養細胞での浸潤突起の形成と退縮にはシェディングが関与しない事が示唆されたが、浸潤突起と良く似た構造体である podosome の融合や細胞自身の融合にシェディングが関与する事を示唆する結果を Raw 264.7 マクロファージ細胞を用いて得る事ができた。

研究成果の概要(英文): I have analyzed the relationship between molecular mechanisms of the formation and reduction of invadopodia, a structure permit cancer cells to have high mobility, and shedding, a processing mechanism of membrane proteins. Unfortunately, it has been indicated that there are no relationship between invadopodia and shedding in HeLa cancer cells, but I got the result indicating the relationship between podosome, a structure resembling with invadopodia, and shedding in Raw 264.7 macrophage 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
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学・細胞生物学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：浸潤突起・シェディング・podosome

1. 研究開始当初の背景

PTA (podosome-type adhesion) と総称される細胞表面の突起構造は、その細胞外表層に蛋白質分解酵素を多く有し高い細胞外基質分解能を持つとともに、その細胞内表層にはアクチン繊維による強固な裏打ち構造を有し高い細胞膜伸長能をあわせ持っている。そしてこれら細胞内外の分子の協調的な働きにより、PTA は細胞外基質を分解してその方向に伸長するという効率的な細胞運動を可能にする構造であると考えられている。

PTA は特に高い運動能を持つ細胞種である、感染箇所へと特異的に移動する能力を持つ樹状細胞や原発巣から転移先へと移動する能力をもつ癌細胞、で多く観察され、それぞれ podosome(樹状細胞)・浸潤突起(癌細胞)と呼ばれている。本研究を開始した当初、樹状細胞においてグラム陰性菌の感染時に podosome が退縮する事、そしてその退縮にシェディングと呼ばれる膜蛋白質のプロセッシング機構が必要である事を示唆する結果が報告されていた(JCB, 182, 993 (2008))。シェディングとは膜貫通型蛋白質を細胞外

の膜近傍で選択的に切断し、可溶化した細胞外領域と細胞膜に残されるフラグメントを形成するという極めてユニークで効果的な膜蛋白質に対する翻訳後修飾機構であり、先述の論文は PTA 全般の退縮に何らかの膜蛋白質のシェディングが必要である可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、本研究では特に癌細胞における PTA である“浸潤突起”に注目し、その退縮及び形成の過程にシェディングが関与するかどうか明らかにする事を第一の目的とした。浸潤突起の形成や退縮の分子機構を理解する事は癌の転移への理解を深める事ができると考えられるため、本研究の遂行は癌の征圧に向けての大きな一歩となる可能性があった。また浸潤突起の形成や退縮にシェディングが関わる事がわかった場合には、どのような膜蛋白質のシェディングが関わるのか、プロテオミクス技術を用いてシェディング標的蛋白質を明らかにする事を第二の目的とした。更にはプロテオミクス技術を用いて同定された膜蛋白質のシェディングがどのような分子機構で浸潤突起の形成や退縮に関わるのか明らかにする事で、浸潤突起の形成と退縮の分子機構に関する理解を深める事を第三の目的とした。

3. 研究の方法

まず様々な癌培養細胞を蛍光ラベルした細胞外基質の上で培養し、細胞外基質の分解とアクチン繊維の裏打ちとが共存する浸潤突起を観察しやすい細胞を特定する。更にその細胞でシェディングが効率的に行われている事を既知のシェディング標的蛋白質を用いて確認し、浸潤突起の観察が可能でかつ効率的なシェディングがみられるような、本研究に適した癌培養細胞の特定を試みる。次いで浸潤突起の形成や退縮をリアルタイムで観察するために、蛍光ラベルしたアクチンを恒常的に発現する癌培養細胞の構築を試みる。次に、蛍光ラベルしたアクチンを発現する癌培養細胞に浸潤突起の形成や退縮を誘導する事が知られている増殖因子や分化因子を添加する事によって、リアルタイムで浸潤突起の形成及び退縮の観察ができる事を確認する。更に浸潤突起の形成や退縮にシェディングが関与するかどうか、シェディングを阻害する事で検討する。シェディングの阻害はシェディングを行う主な蛋白質分解酵素であるメタロプロテアーゼの阻害剤を用いて行う。浸潤突起の形成もしくは退縮にシェディングが関与する事が明らかになった場合には、どのような膜蛋白質のシェディン

グが浸潤突起の制御に関わるか明らかにするために、プロテオミクス技術を用いたシェディング標的蛋白質のスクリーニングを行う。次いで浸潤突起の形成及び退縮時にシェディングされる事が明らかになった膜蛋白質について、シェディング不能型変異体やシェディングによって生成する切り株変異体を人為的に作製して癌培養細胞に強制発現する事により、同膜蛋白質のシェディングがどのような分子機構で浸潤突起の形成及び退縮に関わるのか明らかにする。

4. 研究成果

様々な癌培養細胞について浸潤突起を観察できるか検討した結果、上皮系の癌培養細胞である HeLa 細胞においてアクチン繊維を蛍光染色すれば浸潤突起を効率的に観察できる事がわかった。そこで HeLa 細胞においてシェディングが効率的に行われているかどうか解析した。研究代表者自身がマクロファージ細胞においてシェディングされる事を初めて明らかにした膜蛋白質を、細胞外領域に Myc タグを付加した形で強制発現し、培養上清に Myc タグを有する細胞外領域が放出されるかウエスタンブロッティングを用いて検討した。その結果このシェディング標的蛋白質の細胞外領域が HeLa 細胞においてもメタロプロテアーゼ活性依存的なシェディングを介して培養上清に放出される事が明らかになり、HeLa 細胞が高いシェディング活性を有する事が明らかとなった。また外来遺伝子を発現した HeLa 細胞を用いて浸潤突起のリアルタイム観察を行うには、免疫染色なしで外来遺伝子を発現した細胞を特定できる事が必要不可欠である。そこで蛍光蛋白質と目的の外来遺伝子とを同時に発現することができる IRES 配列と呼ばれる配列を有する発現ベクターの構築を行い、HeLa 細胞において同ベクターが外来遺伝子と蛍光蛋白質を同時に強制発現しうる事を確認した。これらの背景を踏まえ HeLa 細胞における浸潤突起の形成や退縮がシェディングによって制御されているか検討した。メタロプロテアーゼ阻害剤を添加した細胞としない細胞において浸潤突起の数や大きさに違いが見られるか、アクチン繊維を蛍光染色する事で検討した所、メタロプロテアーゼ阻害剤の有無で浸潤突起の数や大きさに全く違いが見られず、HeLa 細胞における浸潤突起の形成や退縮にはシェディングは関与していない事が示唆された。

以上の浸潤突起に関する解析結果は非常に残念な物であったが、他の PTA であればその形成や退縮にシェディングが関与している可能性があるのではないかと考え更に以下の実験を行った。Raw 264.7 細胞はマクロフ

アージ系の培養細胞であり RANKL という細胞外刺激を加える事で分化・融合し破骨細胞様の大きな細胞を形成する事が知られている。この分化の過程で Raw 264.7 細胞は発達した個別の podosome を多数形成し、更にそれらの podosome がリング状に融合する事が知られている。そしてリング上に融合した podosome が破骨細胞内で波状に移動し、隣接する破骨細胞の podosome と融合する事が破骨細胞同士の融合に重要なのではないかと考えられている。そこで Raw 264.7 細胞を RANKL で分化させる際にメタロプロテアーゼ阻害剤を同時に添加してシェディングを阻害し、個別の podosome やリング状の podosome 融合体の形成、更には細胞同士の融合にどのような変化が見られるか検討した。Raw 264.7 細胞を RANKL 存在下で 72 時間培養すると巨大な破骨細胞を形成し破骨細胞内に発達した podosome (個別・リング状の双方) が観察できる事が知られている。そこで RANKL 添加後 48 時間及び 66 時間の各時点でメタロプロテアーゼ阻害剤を添加し、72 時間後の podosome の状態を観察した。その結果メタロプロテアーゼ阻害剤を添加する事で個別の podosome が減少しとても大きなリング状の podosome 融合体が観察される事がわかった。この結果はシェディングが podosome の融合を自由に制御している事を示唆している。またメタロプロテアーゼ阻害剤によるリング状 podosome 融合体の形成の促進は処理時間の長さに依存しており、シェディングがある特定のタイミングで podosome の融合に関わるのではなく、コンスタントに関わっている可能性が示唆された。次に Raw 264.7 細胞同士の細胞融合にシェディングが関わるか、破骨細胞に分化した細胞の大きさを比較した。その結果メタロプロテアーゼ阻害剤を添加する事で非常に大きな破骨細胞が観察されるようになる事がわかり、細胞融合が促進されている事が示唆された。この結果はシェディングに破骨細胞同士の融合を阻害する傾向がある事を示唆している。これらのリング状の podosome の形成促進や破骨細胞体の肥大といったメタロプロテアーゼ阻害剤による影響は RANKL 非存在下では全く観察されず、Raw264.7 細胞の破骨細胞への分化に依存した現象である事も示された。以上の結果を総合的に解釈すると、シェディングが podosome のリング状融合体の形成や細胞体同士の融合に重要な役割を果たしているという事を示唆しており極めて興味深い。がん細胞の浸潤突起の形成と退縮に注目してスタートした本研究ではあったが、PTA の融合とシェディングとの関係や細胞体自身の融合とシェディングとの関係というこれまで全く明らかにされていなかった関係について新しい知見が得られる意義のある研究となったと

考えている。

一方で、シェディングがリング状 podosome 融合体の形成や細胞同士の融合に関わる事が示された Raw 264.7 細胞を用いて、プロテオミクス技術を用いたシェディング標的蛋白質のスクリーニングを行った。その結果これまでシェディングが報告されていなかったある膜蛋白質がこの細胞内でシェディングされる事を初めて見出した。この膜蛋白質は主に細胞内の ER や Golgi に局在しそこで機能すると考えられている蛋白質であったが、Raw 264.7 細胞においてこの膜蛋白質がシェディングを受けるのは細胞表面であるという事を、この膜蛋白質の糖鎖修飾を詳細に解析したり、この膜蛋白質の細胞表面特異的な染色を行ったり、人為的に細胞内局在を制御したこの膜蛋白質の変異体を用いたりして総合的に明らかにした。更にこの膜蛋白質とそのホモログとのキメラ蛋白質を作製してそのシェディングを解析する事から、シェディングに必要なアミノ酸を 4 アミノ酸にしぼる事に成功し、その 4 アミノ酸を置換する事でシェディング不能型変異体を作製する事に成功した。そして、細胞表面におけるこの膜蛋白質の機能を詳細に検討し、Raw 264.7 細胞におけるファゴサイトーシス (病原体等の大きな粒子に対するエンドサイトーシス) をこの膜蛋白質が制御している事を明らかにした。具体的にはこの膜蛋白質の発現を siRNA で特異的に阻害する事でファゴサイトーシスが低下する事、野生型のこの膜蛋白質を強制発現する事でファゴサイトーシスが增強する事、先述のシェディング不能型変異体を強制発現してもファゴサイトーシスは增強しない事、を明らかにする事ができた。これらの結果は細胞表面でのこの膜蛋白質のシェディングがファゴサイトーシスを正に制御している事を示唆している。以上の研究結果は現在論文として投稿すべく準備中である。現在同じ Raw 264.7 細胞を用いて RANKL 存在下で特異的にシェディングを受ける膜蛋白質をスクリーニングする事で、podosome や細胞体の融合に重要な役割を果たす膜蛋白質のシェディングを解明する事を目指している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 62 回日本細胞生物学会大会
細胞内メンブレントラフィックにおける
シェディングの役割

白壁 恭子、服部 成介、清木 元晴、
岡田 保典

2010年5月19日

大阪国際会議場

第82回日本生化学会大会
プロテオミクス技術を用いたシェディング
の生理機能の網羅的解析

白壁 恭子、服部 成介、清木 元晴、
岡田 保典

2009年10月23日

神戸ポートアイランド

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/shirakabe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白壁 恭子 (SHIRAKABE KYOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00345315

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし