

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300324

研究課題名（和文） 癌の播種と集団移動を規定する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms regulating dissemination and collective migration of cancer cells

研究代表者

田中 正光（TANAKA MASAMITSU）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

研究成果の概要（和文）：

グリオーマのマウス頭蓋内播種モデルを作製し、チロシンリン酸化蛋白質を精製した結果SKAP2を得た。当初の予想に反し、SKAP2は神経膠腫ではアクチン重合を抑制し、細胞膜を安定化させる事で細胞の浸潤をむしろ抑制する機能を明らかにした。一方、マクロファージ等ではSKAP2は細胞浸潤の促進作用がみられ、間質細胞を活性化する事で炎症性癌の浸潤促進に寄与している事が示唆された。また、細胞集団移動を規定する基本原理である“細胞移動の接触阻止”に関して、転移抑制遺伝子であるNm23H1によるその制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We identified SKAP2 as a tyrosine-phosphorylated protein in glioma. Unexpectedly, SKAP2 suppressed invasion of glioma cell through down-regulating actin assembly and stabilizing the cell membrane. On the other hand, SKAP2 accelerates invasion of macrophages via association with the specific adaptor, which suggests SKAP2 promotes inflammatory cancers by activation of cancer associated macrophages. In addition, we identified that N-cadherin and Nm23H1 plays pivotal roles for establishment of “contact inhibition of locomotion”, which is a fundamental mechanism of collective migration of the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：播種、集団移動、チロシンリン酸化、細胞接触阻止、神経膠腫

1. 研究開始当初の背景

癌の特性の中で最も深刻な問題である転移は、多くの研究者の興味を惹いているが、“高度浸潤癌による播種の形成”と、“高分化型癌における、細胞集団としての血行性転移”という転移に関する二つの病理組織学の命題に対する分子理解はあまりなされていない。

それまでの研究経歴で、腹膜播種をおこす代表的な癌であるスキルス胃癌を対象にして、癌組織におけるチロシンリン酸化蛋白質の網羅的解析を行ってきた。それを広く他の播種型の癌に応用し、浸潤性を規定する治療標的分子を同定する事を考えた。

一方、高分化型癌は血行性転移に際して細胞集団として移動、浸潤する傾向があり、例えば末梢血管内でも単一細胞より、組織構造を持った癌細胞のクラスターとして観察される事が多い。細胞集団が移動する機序や、血管に侵入する際の細胞集団としての変形、再配列の仕組みを解明する。そのアプローチとして、発生学の分野で集団移動の形成に必須な基本原理として注目されている“細胞移動の接触阻止”に注目し、腫瘍におけるそのメカニズムを解析しようと計画した。

2. 研究の目的

固形癌の進展には、癌細胞が分散して浸潤・播種するタイプと、細胞がまとまった集団として広がり、転移するタイプが存在する。本申請は、癌の播種と細胞集団移動による高分化型癌の転移という二つの進展様式に重要な分子・シグナル経路を同定し、治療応用を目指す。

(1) 播種型腫瘍の対象に脳腫瘍のグリオーマを選び、チロシンリン酸化をモチーフにした網羅的解析から新たな治療標的候補分子を同定、解析する。

(2) 腫瘍の間質組織への浸潤性は腫瘍の進行度を大きく左右する。腫瘍細胞が間質に侵入する機構には、メタロプロテアーゼの活性化などに依存するもの以外に、「細胞移動の接触阻止」という現象が深く関与している。

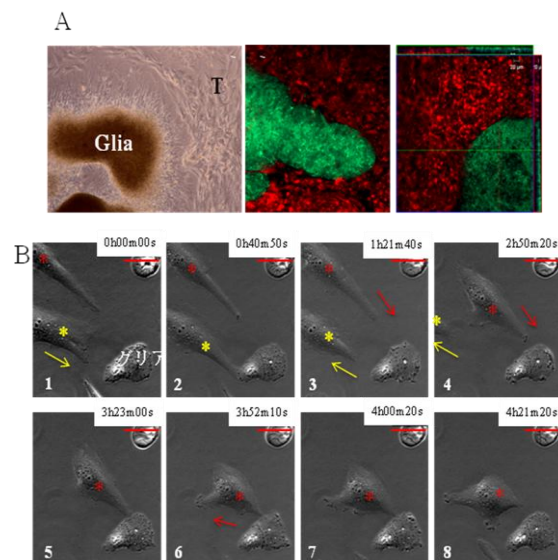
移動中の正常細胞同士は互いの接触により運動方向を変える、あるいは停止する「細胞移動の接触阻止：contact inhibition of locomotion, CIL」という現象がみられるが、

浸潤性の高い腫瘍細胞ではその破綻が生じる。CILは同種類の細胞でも、癌細胞と間質細胞の間でも生じる事が知られており、癌・間質細胞間のCILの破綻は癌細胞の間質組織への浸潤に繋がる。本研究では、脳腫瘍であるグリオーマ（神経膠腫）の細胞株の中から、*in vitro*で正常グリアへの浸潤が軽微なものと高度なものを用いて腫瘍細胞と間質細胞（グリア）間のCILの形成と破綻について解析を行う。一方で発生分野では、同種細胞間のCILは細胞の集団移動にとって重要であり、細胞集団がシート構造を維持するための基本原理と考えられている。腫瘍の集団移動におけるCILの分子について考察を加える。

3. 研究の方法

(1) 播種型腫瘍におけるチロシンリン酸化蛋白質の同定：グリオーマを対象とする。免疫抑制マウスの脳内移植と細胞培養を反復する事で播種型グリオーマ細胞株を作製し、同細胞の腫瘍組織からリン酸化チロシン抗体とチロシンリン酸化蛋白質結合ドメインの組み合わせによる二段階精製で目的蛋白質を抽出する。それらを質量分析により同定し、解析に供する。

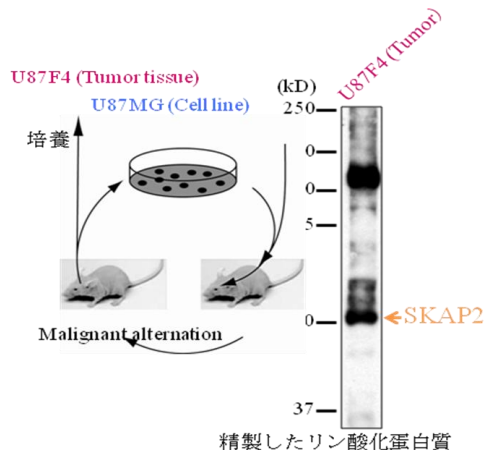
(2) CILの分子メカニズムの解析：グリオーマの細胞株と正常ラット脳から初代培養したグリアを用いて、両者間でのCILを(A) スフェロイド衝突アッセイと(B) タイムラプスイメージングにより判定した。



(A)はそれぞれの細胞の浮遊培養により作製したスフェロイド（細胞凝集塊）を dish 内で近傍に置き、その互いの侵入度を判定するものである。検索した腫瘍細胞株のうち、U87MG(T)はグリアへの浸潤が軽微で、スフェロイド衝突アッセイでは両者の明瞭な境界面が保持されていた。(B)タイムラプスイメージングでは、U87MG 細胞(*)はグリアとの接触後移動を停止し、新たな細胞膜突起を主に反対側に形成してグリアから離れてゆき、CIL に適合した細胞移動の変化が観察された。これらの結果から U87MG とグリアを腫瘍細胞・間質細胞間の CIL モデルとして検索に用いた。

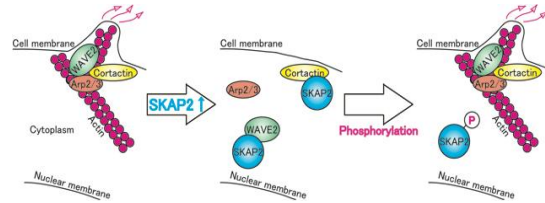
4. 研究成果

(1) 細胞分散型（播種型）の腫瘍浸潤の解析材料として、マウス頭蓋内に広汎に播種する神経膠腫株を作製した。同腫瘍組織のチロシンリン酸化蛋白質を質量分析により同定し、Srcの基質蛋白質であるSKAP2を得た（下図）。



SKAP2は細胞膜の先端部に局在し、WAVE2やcortactinなど細胞骨格の制御因子と結合するものであった。しかし当初の予想に反し、神経膠腫ではWAVE2/cortactinの協調的なアクチン重合を抑制し、細胞膜を安定化させる事で細胞の浸潤をむしろ抑制する結果が得られ、マウス脳への移植実験でもSKAP2の発現抑制により同グリオーマ細胞の腫瘍は脳内転移（播種）が増強した。そこでSKAP2のチロシンリン酸化の影響を調べたところ、SKAP2はSrcによるリン酸化の結果、アクチン重合に対する抑制作用がマスクされていた（モデル図）。一方、マクロファージ等ではSKAP2はADAP等のアダプターと相互作用する事でアクチン骨格

の形成と細胞浸潤の促進作用がみられ、細胞種により二面性を有する事が考慮された。その後の検索で炎症性癌においては癌間質のマクロファージにSKAP2の発現が高く、その活性化による癌の浸潤促進機能が確認された。



(2) CILの分子メカニズム：

1. U87MG/グリアによるCILの分子機構

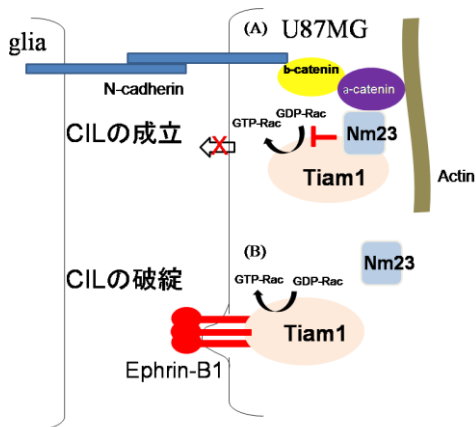
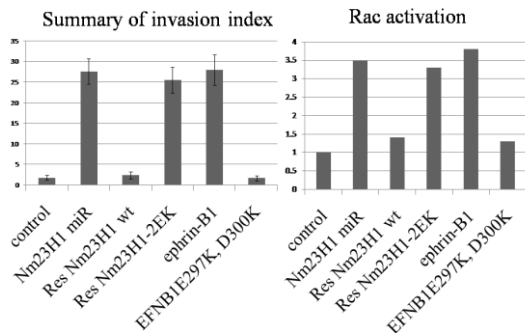
両者の接触によるCILの分子メカニズムとして、(i) CILを誘導する細胞接触を感知するのに必要なセンサー分子の検索、(ii) 接触に伴う細胞移動の変換に必要なRacの制御機構に着目した。(i) U87MG/グリアにおいて発現している細胞接着分子を検索した中で、N-カドヘリンを両者においてRNA干渉により発現抑制した結果、スフェロイド衝突アッセイではグリアへのU87MGの侵入が顕著に増加し、イメージングにおいてもCILの解除が観察された。(ii) 細胞移動において、進行方向に葉状突起を形成することに重要であるRacの活性制御について検索を行った。Racの活性化因子であるTiam1はU87MGで発現がみられ、我々はTiam1を転移抑制遺伝子Nm23-H1が抑制する事を以前報告した。Nm23-H1はU87MG細胞においてグリアとの接触部位に集積しており、それはN-カドヘリンに依存していた。そこでU87MGでNm23-H1をRNA干渉により発現抑制し、CILにおける影響を検索した。スフェロイド衝突アッセイにおいて、U87MGのグリア内への侵入はNm23-H1発現低下により顕著に促進され、それは野生型Nm23-H1により解除されるがN-カドヘリンとの結合不能型Nm23-H1変異体では解除されなかった。また、Nm23-H1のTiam1との結合能に重要なアミノ酸領域を決定し、その置換によりTiam1結合不能型Nm23-H1(Nm23-H1 E124, 127K; 2EK)を作製した。その結果、Nm23-H1 E124, 127K変異体はNm23-H1除去U87MGのグリアへの浸潤を抑制しなかった。以上の事から、Nm23-H1はN-カドヘリン依存性にU87MG/グリア細胞接触部位にリクルートされ、局所でTiam1と相互作用する事がCILを含めた機序による腫瘍のグリアへの浸潤阻止に寄与

している事が示された。

2 Ephrin-B1によるNm23-H1/Tiam1/Rac 経路の抑制作用：

これまでにEph受容体型チロシンキナーゼのリガンドである ephrin-B1がTiam1に結合し、神経細胞の突起伸長などに影響する事を観察してきた。近年他グループの結晶構造解析により ephrin-B1のTiam1との結合モチーフが報告されたため、Tiam1結合不能型 ephrin-B1 (EFNB1 E297K, D300K)を作製し、ephrin-B1が上記U87MG/グリアのCILにどう影響するかを検索した。その結果 ephrin-B1を安定発現したU87MG細胞はグリアへの浸潤が著明でCILも阻害されたが、Tiam1結合不能型 ephrin-B1はU87MGの浸潤性やCILに対して特に大きい影響がみられなかった。

Ephrin-B1はTiam1との相互作用によりCILの制御を含めた腫瘍浸潤に関与することが示唆されたが、その機序として ephrin-B1はNm23-H1/Tiam1の結合を阻害する事が免疫沈降実験から明らかになった。以上の結果から、ephrin-B1はNm23-H1/Tiam1の結合を競合阻害する事でRac1を活性化し、それを含めた機序によりCILの解除や腫瘍細胞の間質浸潤に貢献していると考えられた(下モデル図)。



これらの成果は癌の難治性を高める播種についての新規治療標的候補を提示すると共に、細胞集団移動(浸潤)と間質浸潤の双方を規定するCILのメカニズムの一端を解明した。今後、様々な癌と間質細胞の組み合わせにおけるCILとその破綻の機構を調べる事で、転移の抑制に繋がる治療標的分子を明らかにしてゆく。

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 4件)

1 Shimamura S., Sasaki K. and Tanaka M.
The Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and cortactin. 査読有 J Biol Chem 288, 1171-1183, 2013 10.1074/jbc.M112.386722

2 Tanaka M., Kuriyama S., Aiba N.
Nm23-H1 regulates contact inhibition of locomotion which is affected by ephrin-B1. 査読有 J Cell Science 125, 4343-4353, 2012 10.1242/jcs.104083

3 Yagi R., Tanaka M., et al. (7人中2番目) 10.1038/onc.2010.522

ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. 査読有, Oncogene 30 1413-1421, 2011

4 Tanaka M., et al. (4人中1番目)
Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1 derived peptide. 査読有
Cancer Science 101, 87-93, 2010 10.1111/j.1349-7006.2009.01352

[学会発表] (計 13件)

1 田中正光
Coordinated invasion of scirrhous gastric carcinoma with stromal cells
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日
ロイトン札幌

2 島村真太郎、田中正光
A Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and Cortactin
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日
ロイトン札幌

3 栗山 正、田中正光
Lipoma Preferred Partner (LPP) knockdown
stabilizes N-cadherin in
non-small cell lung carcinoma cell, PC14PE6
第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日
ロイトン札幌

4 田中正光
Coordinated invasion of scirrhous gastric
carcinoma with stromal cells
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12
日福岡国際会議場

5 島村真太郎、田中正光
A Src substrate SKAP2 regulates actin
assembly by interacting with
WAVE2 and Cortactin
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12
日福岡国際会議場

6 田中正光
細胞移動の接触阻止機構と腫瘍における破綻
第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 30 日
パシフィコ横浜

7 田中正光
Ephrin-B1 affects contact inhibition of
locomotion through negative
regulation of Nm23-H1
第 70 回日本癌学会学術総会 2012 年 10 月 3 日
名古屋国際会議場

8 島村真太郎、田中正光
A Src substrate Skap2 regulates actin
cytoskeleton by interacting with WAVE2 and
cortactin
第 70 回日本癌学会学術総会 2012 年 10 月 3 日
名古屋国際会議場

9 栗山 正、田中正光
A novel Wnt signal modifier, Cancrin works as a
neural crest specifier
第 44 回日本発生物学会年会 2011 年 5 月 18
日 沖縄コンベンションセンター

10 田中正光
Ephrin 合成ペプチドによる胃癌の播種抑制
第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 京
王プラザホテル

11 田中正光
Ephrin-B1/Dishevelled を介した癌細胞の播種の
制御機構
第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日
大阪国際会議センター

12 島村真太郎、田中正光
A Src substrate Skap2 is associated with

adhesion and migration of cancer cells
第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 10
日 神戸ポートアイランド

13 栗山 正、田中正光
A common molecular switch of EMT in neural
crest and tumor: role of LPA and Lipoma
preferred partner on cell adhesion
第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8
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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.akita-u.ac.jp/seika2/Akita_Univ_Dept_Molecular_Biochemistry/Welcome.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
田中正光 (TANAKA MASAMITSU)
秋田大学・医学部・教授
研究者番号 20291396

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：