

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701071

研究課題名（和文）がん発症と進行におけるアフアディンの役割

研究課題名（英文）The role of Afadin in tumorigenesis and tumor progression

研究代表者

岡本 三紀（OKAMOTO MIKI）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・研究所・研究員

研究者番号：20332455

研究成果の概要（和文）：アクチン結合蛋白質アフアディンは、イムノグロブリン様細胞接着分子 nectin の細胞質ドメインに作用し、細胞骨格リモデリングを調節すると考えられている。本研究ではアフアディンの発がんおよび転移機構への関与を生体内で検証した。アフアディンを欠損した腸上皮では傍細胞透過性が亢進し、化学発がん実験モデルでは有意に発がん率が上昇していた。アフアディンは腸上皮細胞のホメオスタシスを調節し、炎症による大腸発がん促進作用に抑制的に機能することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Afadin interacts with the cytoplasmic region of nectins, immunoglobulin-like cell adhesion molecules at adherens junctions, links them to the actin cytoskeleton, and regulates cytoskeletal remodeling. However, it remains unknown whether afadin plays roles in tumorigenesis and tumor progression. Previously we reported that in afadin intestine-specific deficient mice, the paracellular permeability in the intestinal mucosa increased and susceptibility to the tissue destruction induced by dextran sulfate sodium enhanced. Here we treated the mice with azoxymethan and dextran sulfate sodium, and analyzed the incidence of colitis-associated colon cancer. Mice conditionally lacking afadin in the intestines showed significantly increased the incidence of colon cancer. These results indicate the suppressive role of afadin in developing colitis-associated colon cancer in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,600,000	480,000	2,080,000

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：細胞接着・運動、発がん、腸上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織において、がん細胞間接着の減弱が観察され、がん転移との関連が報告されてきた。しかしがん細胞間だけでなく、がん細胞と微小環境間との接着シグナルもがん細胞の運命決定に重要な役割を果たしている。この異種細胞間接着に携わるのが nectin/Necl ファミリー蛋白質である。

Nectin はイムノグロブリン様膜貫通型蛋

白質であり、E-cadherin と共に細胞間ジャンクション形成の中心的な役割を果たす接着分子である。Nectin は極性構造を保つ上皮細胞では細胞間接着部位アドヘレンスジャンクションに位置するが、隣り合う上皮細胞が接着し極性構造を作り上げる過程では、最もアピカル面に位置するタイトジャンクション構成蛋白質を細胞接着部位に集める役割を果たしている。Nectin の細胞内ドメインに

はアクチン結合蛋白質である afadin が結合し、nectin からの細胞接着シグナルとアクチン細胞骨格系を連結する。Afadin は上皮細胞の極性形成を促進するだけでなく、細胞移動時には先導端に局在し、低分子量 G 蛋白質 Rap1 の活性を調節することで細胞運動を促進する。また embryonic stem (ES) 細胞を分化誘導して得られた embryoid body 解析からは PI3K の活性を介した抗アポトーシスシグナルを正に制御する。これまでに nectin/Necl ファミリーのがん組織における発現解析は多く報告されてきた。Nectin-2、-4 および Necl-5 はがん組織で高発現しがん悪性化に促進的に、nectin-1、Necl-1、-2 および -4 はがん抑制的に作用する可能性が示唆されている。しかし、afadin のがん形質と進行における役割は明らかではない。

Afadin は他の重要ながん関連蛋白質と同様にマウス個体発生に必須であり、その欠損マウスは胎生初期に胚性外胚葉の上皮構造異常、中胚葉の上皮構造の再構築障害を示し、全て死亡する。そこで Cre-loxP システムを用いた afadin 組織特異的欠損マウスを作製し、afadin の生体内における機能解析を行ってきた。これまでに海馬神経細胞ではシナプスのリモデリングに、血管内皮細胞では vascular endothelial growth factor (VEGF) および sphingosine 1-phosphate (S1P) 誘導性の血管新生に果たす afadin の役割が明らかとなっている。本研究課題では villin 遺伝子のプロモーター下に Cre を発現するトランスジェニックマウスとの交配で得られた腸上皮細胞特異的 afadin 欠損マウスを用いて個体レベルの研究を進めた。腸上皮細胞特異的 afadin 欠損マウスは正常に発生、成長し、一見コントロールマウスと何ら変わらない。しかし腸上皮細胞の傍細胞透過性の上昇を示し、腸上皮細胞に傷害を与える dextran sulfate sodium (DSS) 処理に対する感受性の亢進が観察された。また、腸上皮細胞で優位に発現する nectin-2 の局在がアドヘレンスジャンクションから細胞膜側面へ分散し、nectin-3 もアドヘレンスジャンクションから消失していた。従って、nectin の唯一のアダプター分子である afadin が細胞膜上での nectin の局在を決定していると考えられた。本研究では nectin/afadin シグナルに着目し、その遺伝子改変マウスを用いて、個体レベルで発がん、浸潤転移過程における afadin の役割を明らかにすることを試みた。

## 2. 研究の目的

がん組織におけるがん細胞と間質細胞間の接着は浸潤転移過程における重要な機構であり、異種細胞間接着による情報交換はが

ん形質の悪性化を理解する上で欠くことはできない。Cadherin が同種細胞間のホモフィリックな結合を促進するのに対し、nectin/Necl は異なる nectin/Necl 分子間のヘテロフィリックな結合に基づく異種細胞間の結合を促進する。そのシグナル解析はがん転移予防の開発に不可欠であると考えられる。また、浸潤転移過程において細胞骨格リモデリングを繰り返すがん細胞の分子機構を理解することは、効果的ながん予防および治療の開発につながると考えられる。培養細胞レベルでは afadin が細胞骨格リモデリングの鍵を握る分子としての役割が明らかとなっていることより、リモデリングを繰り返すがん細胞の浸潤転移過程においても afadin が重要な役割を担う可能性が十分に考えられる。本研究では、組織特異的 afadin 欠損マウスを用いて個体レベルで発がん、浸潤転移過程における役割を直接的に明らかにし、nectin/afadin シグナルのがん治療標的分子あるいは予後因子としての有用性を示すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸がん形成および悪性化における afadin の役割を解析するため、腸上皮細胞特異的 afadin 欠損マウスを用いて、azoxymethane (AOM) /DSS による化学発がん実験および APC 遺伝子変異マウスとの交配により、発がん率およびがん形質の検討を行う。

(2) Afadin は nectin 以外に ZO-1、 $\alpha$ -catenin、JAM-A、Eph などの重要な接着関連分子との結合が報告されている。Afadin ノックダウン培養細胞を用い、nectin だけでなく nectin との結合に依存しない afadin の役割を解析する。

(3) 乳がん転移モデルマウスと乳腺特異的 afadin 欠損マウスを交配し、afadin 欠損乳がんの形成率および肺転移効率の変化を確認する。

## 4. 研究成果

(1) 腸上皮特異的 afadin 欠損マウスは、腸上皮傍細胞透過性の上昇を示し、腸上皮細胞に傷害を与える DSS 処理に対する感受性の亢進が観察され、さらに低分子量 G 蛋白質 Rap の活性低下も確認された。このマウスに initiator として AOM、promotor として DSS を用いた大腸化学発がんモデル実験を行い、発がん率およびその形態変化を観察した。Afadin 欠損マウスは DSS に対する感受性が高いことから、2.5%DSS を 1 週間飲用させると全て死亡した。そこで AOM 処理後 0.5%DSS を

5日間飲用させ20週間後解剖、大腸がん形成を確認した。Afadin欠損マウスは18匹中11匹(61%)に大腸がん形成が確認された。一方コントロール群では17匹中1匹のみ(5.9%)に大腸がんを観察した。がん形態および解剖時の炎症、増殖レベルには両者間に差は認められないが、afadinが炎症性大腸がんの発がん過程において抑制的に機能することが示唆された。

(2) APC 遺伝子変異マウスは、小腸に無数のポリープができ、生後およそ180日までに全て死亡する。APC 変異存在下でできたポリープ形態が、afadinの有無によりどのような影響を受けるか組織観察と個体当たりの発がん数の検討を行った。Afadin欠損/APC minマウスの小腸ポリープ数はコントロールと比較して雄マウスで38%、雌マウスで25%の減少を示したものの、その形態には特に変化は認められなかった。

(3) Afadin欠損マウスの特徴として小腸パネート細胞の局在変化を確認している。パネート細胞は受容体型チロシンキナーゼEphB3とそのリガンドephrinBによって、その局在が決定されていると考えられている。さらにEph受容体とephrinの相互作用は大腸がんの進行に関与していると考えられている。そこで現在EphB3の発現を含め、腸上皮でのafadinの新たな機能解析を進めている。

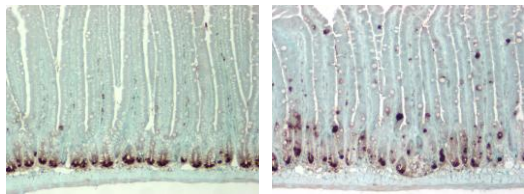


図1 コントロールマウス(左)とafadin欠損マウス(右)の小腸パネート細胞の局在

(4) ヒト大腸がん細胞DLD-1を用いてafadinのノックダウンを行い、大腸におけるafadin機能解析を試みた。AfadinノックダウンDLD-1細胞では、EphBシグナルの有無にかかわらず、細胞骨格再構成を伴うシグナルに対して細胞形態変化および細胞間接着面へのアクチン集積低下が観察された。同時に低分子量G蛋白質RapおよびRacの活性低下と不活性型integrin $\beta$ 1の蓄積がみられ、wound healing assayによる細胞運動能の低下も示した。よってafadinは腸上皮細胞の細胞骨格リモデリング過程においてアクチンを細胞間接着部位に集積させ、低分子量G蛋白質の活性調節を通してintegrinによる細胞外

基質接着を担っていることが明らかとなった。がん転移過程においてがん細胞はリモデリングの繰り返しとなる。よってafadinの欠損が転移過程において影響を及ぼす可能性を示している。

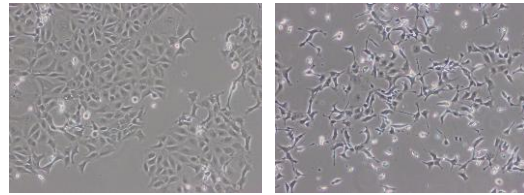


図2 コントロールDLD-1細胞(上)とafadinノックダウンDLD-1細胞の形態

(5) 転移性乳がん発症モデルMMTV-PyVTマウスは、MMTVプロモーター下でpolyomavirus middle T antigenを発現するトランスジェニックマウスで、乳がんを自然発症し、さらに高確率で肺への転移を起こす。発がんから遠隔転移の全ての過程をマウス個体内で検討できることから、転移の標的分子としての検索に優れていると考える。Afadinが発がんおよびがん転移過程に及ぼす影響を検討する目的で、このマウスモデルにafadin欠損を導入し、afadin欠損乳がんの形成時期とその増殖、肺転移への有無を比較検討している。本研究期間中にFVBへの戻し交配を行い、さらにafadin欠損MMTV-PyVTマウスを作成、現在解析を進めている。これまでafadinのノックダウン乳がん細胞株を用いたマウス転移モデルの結果では、afadinの発現低下が転移能亢進につながると報告がある一方、afadinとJAM-A、活性型Rapの複合体シグナルによりintegrin $\beta$ 1が高発現することで転移能を促進的に調節するという正反対の報告もある。これらは全て培養細胞を用いた研究であり、本研究課題で作成したマウスを用いることで、個体レベルでの直接的な検証を行うことが可能である。細胞骨格リモデリングの鍵を握るafadinが、がん細胞の浸潤転移過程においても重要となる可能性が十分に考えられる。その点からもafadinシグナルの個体レベルでの検証は非常に重要であり、nectin/afadinシグナルががん治療の標的分子あるいは予後因子として有用であるかどうか直接的に示すことができると考えられる。

## 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2件)

(1) Tanaka-Okamoto M, Hori K, Ishizaki H, Itoh Y, Onishi S, Yonemura S, Takai Y, Miyoshi J.

Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia. *J. Cell Sci.* 査読あり 124:2231-2240. (2011)

(2) Nakamura H, Hori K, Tanaka-Okamoto M, Higashiyama M, Itoh Y, Inoue M, Morinaka S, Miyoshi J.

Decreased expression of LM07 and its clinicopathological significance in human lung adenocarcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 査読あり 2:1053-1058. (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/molecule.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 三紀 (OKAMOTO MIKI)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター (研究所)・研究員

研究者番号: 20332455

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし