

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590456

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナル伝達因子から見た細胞運動性と膵臓癌進展の分子基盤

研究課題名(英文) Hedgehog signaling molecule SIL regulates the migration and progression of pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究代表者

笠井 謙次 (Kasai, Kenji)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70242857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞運動は一般にsmall GTPase Rac1の活性化とArhGEF7・p21-activated kinase (Pak)複合体の先端部への集積及びその後の細胞骨格系の変化により起こると考えられているが、もとよりArhGEF7-Pak複合体の細胞先端部への集積を規定する分子基盤は十分明らかではない。本研究により我々が以前Hedgehogシグナル伝達因子として報告したSILがArhGEF7-Pakと結合し、これら複合体の膵臓癌細胞先端部への集積と細胞運動性亢進、細胞骨格の変化に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell migration depends on a sequential modification of cytoskeletal complex, which is triggered by the accumulation and activation of ArhGEF7-Pak complex to lamellipodia/filopodia of the cells. In this study, we revealed that SIL/STIL, a cytoplasmic molecule involved in the Hedgehog signaling and over-expressed in human pancreatic cancers, associated with ArhGEF7-Pak1 complex. SIL localized in lamellipodia of human pancreatic cancer cell lines along with RAC1, ArhGEF7 and Pak1. SIL-Knockdown cells harbored enlarged cytoplasm lacking RAC1 and ArhGEF7-Pak1 accumulation in the cell front, which mimicked ArhGEF7-knockdown, and reduced the motility. Furthermore, SIL knockdown-induced reduction of the motility was not rescued by Tet-regulated induction of Pak1 T423E mutant in human pancreatic cancer cell line PANC-1. These evidences indicated an indispensable role of SIL in regulating the subcellular localization of ArhGEF7-Pak1 complex and the cellular movement of pancreatic cancer cells.

研究分野：人体病理

キーワード：ヘッジホッグ 膵臓癌 SIL 細胞運動 ArhGEF7 Pak1

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌では、周囲神経叢を含めた周囲組織への強い浸潤のため患者の苦痛は強く、また生命予後も極めて不良である。これら難治性癌の克服にはその早期発見法の開発と共に、浸潤・転移など癌細胞の運動性の制御を目指した新たな治療戦略の開発が急務である。

細胞外マトリックスへの接着に始まる細胞運動は、先進部の Integrin-paxillin 群に GIT-ArhGEF7-Pak 複合体が順次集積・活性化し、引き続きアクチンなど細胞骨格系が変化することにより行われる。膵臓癌や乳癌など多くの腫瘍では、遺伝子増幅・過剰発現している Pak1 や Pak4 など Pak 蛋白のために細胞運動性が亢進していると考えられているが、Rac1・ArhGEF7・Pak などが細胞質内を移動し先進部に順次集積し活性する分子機構自体が未だ十分解明されていない。

2. 研究の目的

研究申請者が以前報告したヘッジホッグシグナル伝達因子 SIL は膵臓癌を始め多くのヒト癌組織にて過剰発現している。

本研究の目的は SIL を介した膵臓癌細胞運動能の制御機構を明らかにするものである。

3. 研究の方法

以下の方法を用いて SIL 及び SIL 結合因子による細胞運動性制御について解析する。

- (1) ヒト膵臓癌培養細胞を用いて、SIL 及び細胞運動関連因子・細胞骨格系制御因子の細胞内局在を蛍光抗体法にて観察する。
- (2) SIL と細胞内局在を同じくする因子について免疫沈降法による結合能の検定及び in situ proximity ligation assay (Duolink) 法による結合物細胞内局在の解析を行う。
- (3) SIL 特異的 siRNA 導入により上記因子の細胞内局在と細胞運動能の変化を解析する。
- (4) ヒト膵臓検体を用いて SIL の発現状況を免疫組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト膵臓癌培養細胞株及び対照として使用した不死化ヒト膵管上皮細胞やヒト乳癌細胞株において SIL は Rac1、ArhGEF7、Pak1 と共に細胞質と共に lamellipodia にも集積していた。wound-healing assay では、wound 形成早期の wound に面する先進細胞に lamellipodia が形成される時期に一致して SIL 及び上記因子の発現が観察された。

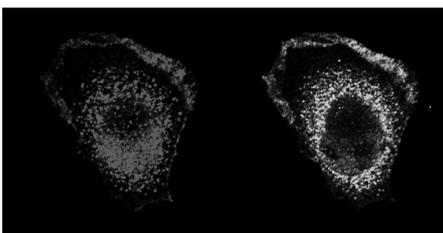


図 ヒト膵臓癌培養細胞 PANC-1 における SIL

(左)と ArhGEF7(右)の局在

(2) HEK293T 細胞を用いた強制発現系における免疫沈降法にて、SIL は ArhGEF7、Pak1 と結合することが明らかとなった。SIL-Pak1 結合は ArhGEF7 存在下でより明瞭となる一方、SIL-ArhGEF7 結合に Pak1 の関与は必ずしも必要でないことから、SIL と Pak1 の結合は ArhGEF7 を介する可能性が示唆された。また SIL-Pak1 結合は GIT1 の過剰発現にて抑制された。現在 ArhGEF7 及び Pak1 の各種ドメイン欠損遺伝子を合成して、SIL との結合責任領域の同定を免疫沈降法にて検討している。

Duolink 法にて、SIL は主に細胞質にてこれら因子と結合しているが、細胞膜上あるいは lamellipodia では結合していないことが推測された。

ArhGEF7-Pak1 複合体は細胞膜に移動し、同部の GIT1 (ArfGTPase-activating protein) と ArhGEF7 が結合することで Pak1 と離れ、Pak1 の活性化を起こすと報告されている。今回の Duolink 法での解析結果から、細胞質で形成された SIL-ArhGEF7-Pak1 複合体は細胞膜上の GIT1 に達し GIT1-ArhGEF7 複合体が形成されることで、SIL 及び Pak1 が複合体から遊離し、同所での Pak1 の活性化を起こすことが考えられた。

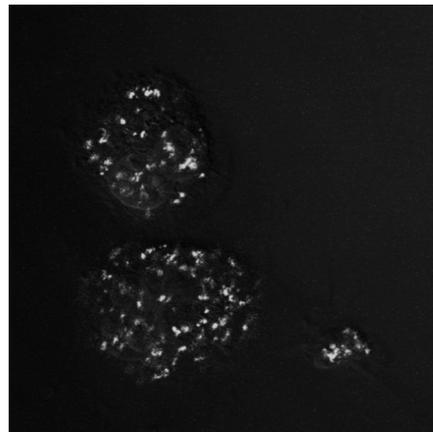


図 PANC-1 細胞における SIL-ArhGEF7 複合体の細胞内局在 (Duolink 法による)。上下の 2 細胞共に細胞質での陽性シグナルを見るが、細胞膜上での陽性シグナルは明瞭ではない。下の細胞の細胞突起内細胞質でも陽性シグナルを見るものの、やはり細胞膜あるいは lamellipodia に陽性シグナルが明らかではない。

(3) SIL 特異的 siRNA を導入した膵臓癌細胞は大型化した。これら細胞では細胞質が薄く広がり、Rac1 を指標にした lamellipodia 形成が消失していた。こうした SIL siRNA 導入細胞の形質は文献上の ArhGEF7 siRNA 導入細胞形質と同様であった。また SIL siRNA 導入細胞では ArhGEF7・Pak1 の細胞膜集積は消失した。

また wound-healing assay 及び細胞トラッキング法による解析では SIL siRNA 導入細胞は細胞運動能が低下していた。

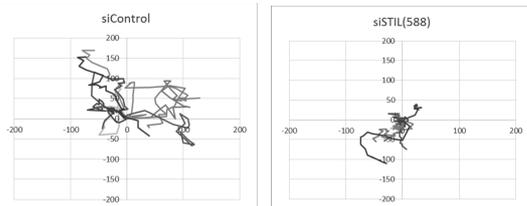


図 siRNA 導入細胞の細胞トラッキング解析
SIL 特異的 siRNA 導入細胞は対照(左)に比べ細胞運動の低下を示す。

以上のことから、SIL は ArhGEF7-Pak1 の細胞先進部への移動・集積に必修であり、SIL siRNA 導入細胞では本来 lamellipodia が形成されるべき細胞先進部での細胞骨格系の再構成に影響を与え、結果として効果的な細胞運動を阻害していることが考えられた。現在 SIL siRNA 導入細胞における LIMK など Pak1 リン酸化基質蛋白のリン酸化異常を検討中である。

さらに tetracycline 誘導 HA-tagged Pak1T423E 発現 Panc1 細胞の細胞運動能は SIL siRNA 導入により著減した。wound-healing assay においてこれら SIL siRNA 導入細胞では wound の面する細胞の細胞先進部への HA-tag 陽性 Pak1T423E 蛋白の集積が不明瞭であることから、たとえ細胞内で人為的に Pak1 を活性化しても、これら活性化 Pak1 が細胞先進部に集積しなければ効果的な細胞運動につながらないことものと解釈した。

(4) 担癌膵臓組織では、膵臓癌細胞は正常膵管上皮細胞に比べ有意に SIL を過剰発現していた。

これらのことから膵臓癌における SIL は細胞先進部への ArhGEF7-Pak1 複合体の輸送と同所での Pak1 標的細胞骨格系の再構成を促進し細胞運動能の上昇に必修である事が示唆された。

現在上記成果を纏めると共に、残された課題、そもそも何が SIL を細胞先進部に移動させるのかについて追加検討している。則ち元々細胞膜に分布していた僅かな Rac1 が活性化した事により初期の弱い細胞内極性が形成され、SIL-ArhGEF7-Pak1 が同所に集積することで、更なる Rac1 の活性化と細胞内極性の完成を起こすものと想定し、dominant-negative Rac1 導入細胞あるいは Rac1 siRNA 導入細胞における lamellipodia 形成と SIL の細胞内局在について検討している。さらにある種の細胞では ArhGEF7-Pak1 の lamellipodia への移動に coronin1A が重要であるとの報告があるため、SIL と coronin1A それぞれの siRNA 導入細胞を用いて上記因子の細胞内局在の検討と、担癌膵臓組織での免疫組織学的検討を行っている。

5. 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 1 件)

稲熊真悟、陸 美穂、橋本光義、村上秀樹、佐賀信介、池田 洋、笠井謙次
"GLI1 interferes with the DNA mismatch repair

system through BHLHE41-mediated suppression of MLH1 in pancreatic cancer" *Cancer Research* 査読有
2013 Dec 15;73(24):7313-7323.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2008

{ 学会発表 } (計 3 件)

稲熊真悟、笠井謙次、陸 美穂、池田 洋
「ヘッジホッグシグナル系転写因子 ZIC2 は FGFR3、ANXA8 発現誘導を介して膵癌細胞株の増殖を促進する」
第 73 回日本癌学会学術総会
平成 26 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜

稲熊真悟、笠井謙次、橋本光義、陸 美穂、池田 洋
「ヘッジホッグシグナル系転写因子 ZIC2 は FGFR3、ANXA8L2 発現誘導を介して膵癌がんを促進する」
第 103 回日本病理学会総会
平成 26 年 4 月 25 日、広島国際会議場

稲熊真悟、笠井謙次、橋本光義、陸 美穂、池田 洋
「Hedgehog シグナル系転写活性化因子 GLI1 から見た膵臓前がん病変の細胞生物学的特性」
第 102 回日本病理学会総会
平成 25 年 6 月 6 日、ロイトン札幌

{ 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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

{ その他 }
ホームページ等
www.aichi-med-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者
笠井 謙次 (KASAI, Kenji)

愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号:7024857

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

稲熊 真悟 (INAGUMA, Shingo)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号:80410786

池田 洋 (IKEDA, Hiroshi)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号:00131219

(4)研究協力者

伊藤 秀明 (ITO, Hideaki)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号:90711276