

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700962

研究課題名(和文)細胞接着の安定化を用いたヒトがん細胞の直接浸潤抑制の研究

研究課題名(英文)Inhibition of direct metastasis by artificial stabilization of cell-cell adhesion

研究代表者

栗山 正(Kuriyama, Sei)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30398226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：がんにおいて上皮間充織遷移(EMT)は悪性を上昇させるプロセスである。間充織様に変化したがん細胞はしばしばNカドヘリンという接着分子を発現するようになるが、Nカドヘリンの量的変化を単純に悪性の増加に置き換えることはできない。本研究によってLPP, Ets5, MMP15がNカドヘリン分子の翻訳後制御に関わっていることを新たに見出した。LPPがEMT後さらに減少することによって遠隔転移が促進されることから、転移のし易さを示す新たなバイオマーカーとしての重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：In cancer, Epithelial-To-Mesenchymal Transition (EMT) is a critical process of metastasis. Mesenchymal cancer cell often expresses cell adhesion molecule, N-cadherin. So far the amounts of N-cadherin can't be translated into the increase of malignancy because the malignancy depends on what form of N-cadherin expresses and how it works. In this study, we revealed novel N-cadherin modifiers, Lipoma preferred Partner (LPP), Ets-variant 5, and Metalloproteinase 15, which modify the stabilities of N-cadherin in cancer. We found that loss of LPP in EMT undergone cancer cells further increase the distant metastasis. Therefore, our findings suggest that LPP is one of potential candidate of distant metastasis biomarker, which provide us a better prognosis of N-cadherin positive cancer.

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 転写制御 転移・浸潤

1. 研究開始当初の背景

発生生物学の研究からいかにして接着を維持した細胞シートが集団として進展できるかを説明する新しい概念 Stable-to-Motile Transition (SMT)を提唱した。多くのがんの浸潤機構に SMT が関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

がん細胞において「移動しない細胞シート」と「集団移動する細胞シート」の2つの接着モードがあることを示し、その変化が及ぼすがんの形態と細胞移動への影響を明らかにすること。SMT トリガーの候補分子 Lipoma preferred partner 遺伝子のノックダウンを通じて細胞接着を安定な細胞接着状態にとどめることができればがん細胞を立体狭窄部に留めることが可能ではないかと考えた。

3. 研究の方法

これまでに肺がんおよびメラノーマ細胞を用いて SMT トリガーの候補分子である Lipoma preferred partner (LPP)のノックダウン株を作成した。その結果、低分化型肺腺がん細胞由来高転移株の PC14PE6 において細胞接着が安定化する表現形を見出した。

3-1. 立体狭窄を通るがん細胞の形態変化と接着の安定性の評価

まず、PC14PE6 株を誘引する因子を探すために wound healing assay と Trans well assay を行った。しかしながら特異的に誘引する物質を発見することが出来なかった。さらに 3D コラーゲンゲル中ではイメージングが難しかったのでコラーゲンゲルディスクを用いたイメージングを試みたが、血清勾配では移動を起こさなかった。そこでがん付随繊維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast: CAF) を含むコラーゲンゲルディスク上に PC14PE6 株を上層する方法で in vitro における浸潤能の変化を調べた。

3-2. 微小流路を用いた擬似立体狭窄を通る細胞集団のイメージング

ポリジメチルシロキサン (PDMS) でマイクロ流路を作成し、ガラスと張り合わせてチャンバーを作成する計画だったが、国内の特注を受ける会社数社に尋ねても海外で行われているようなデバイスの作成技能を持ち合わせている業者が無かった。そこでロンドン大学のナノテクノロジー研究所の研究者と共同研究を行い、神経提細胞の集団的細胞移動における細胞接着変化と立体狭窄部における挙動のイメージングに成功したが、がん細胞においては行うことができなかった。

3-3. カテニンの経時的ラベリングと液性因子添加による安定性変化の検討

カドヘリン複合体の安定性の変化を見る方法としてカテニン分子の経時的ラベルを提案していたが、細胞株毎にオルタナティブスプライシングによるバリエーションが多く、イメージングするために微量の蛍光タンパク融合タンパク質の cDNA を過剰に発現す

る実験には細胞とは異なるタイプのカテニンを過剰発現してしまうリスクが伴うことが分かった。発生生物学研究においてアフリカツメガエル神経提細胞の集団的細胞遊走において N-カドヘリン分子は1種類であり、微量の過剰発現の影響を受けない。このため HaloTag という共有結合でタンパク質と複合体をつくる蛍光リガンド分子を用いたパルスラベリング法を開発し、集団的細胞移動における膜のカドヘリン分子の安定性について定量的に観察する方法を見出した。

3-4. 肺がん細胞の正所移植による原発巣からの直接浸潤と胸膜播腫の検討

肺がん細胞 PC14PE6 は悪性胸水からがん細胞を回収し、繰り返し注射を行って高転移能を獲得した細胞株である。この細胞をマトリゲルと混合し、背中の皮膚を切開し、肋骨を露出させ、肋間から胸腔内の肺へ注射する方法が開発されていた。しかし、細胞が胸腔内に漏れると2週間以内に腫瘍を大きく発達させ、死んでしまう。そこで確実に肺内に注射できる方法を模索した。結局、注入するマトリゲルの濃度を改変し、背中の皮膚をつまみヌードマウスの肺を皮膚越しに確認した状態で皮膚の外側から注射する方法を確立した。

3-5. ヒト肺がん細胞における LPP ノックアウト及び肺がん以外の臓器由来細胞株での LPP ノックダウン

ヒト悪性黒色腫から作成された細胞株 WM2, Axc1 において LPP に対するマイクロRNA (miRNA:miR) を発現するベクターを用いて作成した。

3-6. 他の変化による表現形の可能性も検討する。

集団的細胞遊走に表現形があったが、LPP の直接的な N-cadherin 安定化への影響が見出されなかったため、他のタンパク質との相互作用による経路を試した。すると Etv5 転写因子の核移行が制御されていることが分かった。さらに両者が転写制御因子複合体として働くことが予想されたため、LPP, Etv5 のノックダウンの表現形を比較した。これら表現形に共通性が見られたため、共通のターゲットとしてメタロプロテアーゼである MMP-15 の発現を制御していることを見出した。

以下の実験系を用いて解析を行った

3-6-1. ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた転写活性の解析

MMP-15 遺伝子の転写制御領域ゲノムを単離し、転写開始点から -2kb の DNA とルシフェラーゼ遺伝子を接続し、ウミシイタケルシフェラーゼをコントロールにして LPP 遺伝子の有無と MMP-15 遺伝子の発現の増減を定量的に調べた。

3-6-2. リアルタイム PCR 装置を用いた Chromosome immunoprecipitation (ChIP) 解析

LPP 遺伝子欠損株にタグ付き LPP を発現させ

機能回復させた株を作成した。そのタグを用いてタンパク質が結合したゲノム断片を回収し、定量的 PCR をリアルタイム PCR 装置を用いて行った。

4. 研究成果

低分化型肺腺がん細胞株 PC14PE6 および悪性黒色腫株 Axcel は LPP 遺伝子の機能阻害によって N-cadherin の安定化したタンパク発現を引き起こし、転移浸潤能を上昇させる。

PC14PE6 株および Axcel 株は共に定常状態において N-cadherin の発現を失っている。これはタンパク質の切断によるものであり、本来観察されるよりも小さいタンパク質が存在することを見だし、さらに mRNA レベルでは全長のタンパクをコードする発現があることを見出した。これら細胞株における LPP 遺伝子の機能阻害は全長 N-cadherin の発現を促し、培養条件下において細胞接着が異常に昂進することを発見した。我々はこの細胞接着の安定化が直接浸潤を抑制する方向に働くかどうかを明らかにすることでがんの治療に役立つ知見が得られるものと考えた。

LPP の抑制によってメタロプロテアーゼの全体的な分泌量が減少した。さらに移動能を上昇させることが報告されている転写因子 Etv5 の核移行も阻害されることを見出した。しかしながら方法 3-1 に示したコラーゲンゲルを用いた三次元培養条件下において細胞接着の上昇は集団的細胞の浸潤を上昇させた。この表現形が生体内においても見られるかどうかを方法 3-4 に示したヌードマウスへの細胞移植実験を用いて検討した結果、注射した肺とは反対の肺に遠隔転移する頻度が著しく上昇することを見出した。

LPP は Etv5 と共に MMP-15 の発現を制御し、MMP-15 は直接 N-cadherin 細胞外ドメインを切断する。

LPP の阻害による浸潤能の上昇は N-cadherin の安定化による集団的細胞遊走能の上昇によるものであることが明らかになった。そこでそのメカニズムを明らかにするため LPP の転写制御因子としての役割に注目し、標的分子を候補の中から見いだすこととした。まず、LPP は転写補因子として転写因子を必要とする。その候補として Etv ファミリー転写因子が考えられたため、肺がんおよびメラノーマにおいて発現する転写因子を単離した。そのうち Etv1 と Etv5 のタンパクの核への移行が LPP によって制御されていることを見出した。さらに Etv5 のタンパク機能阻害の表現形は LPP の機能阻害と非常によく似ていた。そこで LPP, Etv5 の両者の表現形を比較し、同様に発現が変化する因子を様々な候補の中から絞り込み、MMP-15 が両者で発現が減少していることを見出した。通常 MMP(メタロプロテアーゼ)の発現減少は浸潤能の低下につながるが、反対の表現形であるため、N-cadherin の切断に参与している

可能性を検討した。N-cadherin 膜外ドメインとイムノグロブリンの Fc 領域を結合させた N-cad-Fc を *in vitro* のカラム上で MMP-15 の活性化型タンパクと共にインキュベートすると切断が起こることを見出した。これにより MMP-15 の新しい基質として N-cadherin 膜外ドメインを切断できることを発見した。

さらに LPP, Etv5 複合体が直接 MMP-15 の発現を制御していることを示すために方法 3-6 のレポーターアッセイを行った。すると Etv5 上流-1kb 付近にある Etv 結合配列を中心に LPP の関与が考えられる領域が絞り込まれた。それを ChIP アッセイにより Etv5, LPP の両者が結合する領域を <200 bp の範囲で同定した。

生体内集団的細胞遊走には LPAR2 依存的な組織の流動性の増加が必要である。

神経堤細胞はがん細胞と多くの遺伝子発現を共有し、生体内をくまなく移動することからがん転移のモデルとして注目されている。アフリカツメガエル神経堤細胞は生体内において特に集団的細胞遊走するモデルシステムである。神経堤細胞に発現するリゾリン脂質 LPA の受容体である LPAR2 が発現しており、その機能阻害によって神経堤細胞の移動が阻害されることが分かった。培養条件下において LPAR2 阻害の表現形を調べたところ N-cadherin のターンオーバーが阻害されており、細胞接着が解除できずに細胞がバラバラにならないという表現形を示した。しかしながら生体内においては集団で移動するため細胞接着を解除する必要が無い。そこでこの細胞の乖離が何を示しているのかについてさらに研究を進めた。他方、神経堤細胞はケモカインの 1 つ SDF-1 によく反応し移動する。この際に N-cadherin の接着が必要である事はすでに示した (Thevenous et al., 2010)。本研究ではケモカインによる細胞誘引と微少流路のチャンパーを組み合わせて高さが細胞核 1 つ分×細胞短軸分 (50 μm) ~ 長軸分 (150 μm) 幅のトンネルを通るように細胞を引き寄せた。すると正常な神経堤細胞が 50 μm でも集団を変形させて通ることができるのに対し、LPAR2 を阻害した神経堤細胞は 150 μm のトンネルでさえも入り口で止まってしまった。これは細胞膜の流動性を上昇させる Rab5 の機能昂進型を共発現させることや N-cadherin の機能阻害を行う事でレスキューされる。この事から LPAR2 が N-cadherin のターンオーバーを介して細胞接着の適度な乖離を行う事が集団が立体狭窄を通る際に必要である事が示唆された。さらに *in vitro* における細胞移動を解析すると集団内の各パーティクルの動きは液体様であり、LPAR2 を阻害すると固体様に変化する事が明らかとなった。故に固体から液体への相転移に似た流動性の変化 (SLT: Solid-to-Liquid like transition) が集団的細胞移動に必要な事が示された。

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 3 件)

1. In vivo collective cell migration requires an LPAR2-dependent increase in tissue fluidity (accepted) *J Cell Biol.*

Kuriyama S*, Theveneau E*, Benedetto A., Parsons M., Tanaka M., Charras G., Kabla A., Mayor R

*equally contributed

2. Aspirin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. (2014) *Oncogene* (e-pub ahead print) doi:10.1038/onc.2013.584 Satoyoshi R., Kuriyama S., Aiba N., Yashiro M., Tanaka M.

3. Nm23-H1 regulates contact inhibition of locomotion, which is affected by ephrin-B1 (2012) *J Cell Sci* **125**, 4343-4353, doi: 10.1242/jcs.104083. Tanaka M., Kuriyama S., Aiba N.

[学会発表](計 2 件)

1. Lipoma Preferred Partner regulates N-cadherin shedding by MMP15 during lung adenocarcinoma metastasis. Kuriyama S., Yano S., Goto A., Tanaka M., English Oral Session, The 72nd Annual meeting of the Japanese Cancer Association 5th October 2013

2. In vivo collective migration requires N-cadherin endocytosis controlled by LPA/Edg4 signalling. Kuriyama S., Theveneau E., Benedetto A., Kabla A., Charras G., Tanaka M., Parsons M., Mayor R. Oral Session, 46th Annual meeting for the Japanese Society of developmental biologists, 29th May 2013.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗山 正 (KURIYAMA, Sei)

秋田大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30398226

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：