

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430126

研究課題名(和文) 癌細胞の浸潤突起形成におけるアクチン細胞骨格制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanisms of the actin cytoskeleton in invadopodia formation by cancer cells

研究代表者

山口 英樹 (Yamaguchi, Hideki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10345035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤突起は癌細胞により形成される細胞膜構造であり、束化されたアクチン繊維を基本骨格に持ち、細胞外基質を分解することにより癌浸潤を促進する。本研究では、癌悪性化に関わるアクチン束化タンパク質アクチニン-4の機能を解析した。アクチニン-4は浸潤突起に局在し、アクチン構造の形成と細胞外基質分解に必要であることが分かった。またアクチニン-4の過剰発現により浸潤突起形成が促進されたが、この作用にはアクチン束化活性を担うアクチン結合ドメインが必要であった。従って、アクチニン-4は浸潤突起においてアクチン繊維を束化するタンパク質であり、癌浸潤・転移において重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Invadopodia are membrane protrusions formed by invasive cancer cells that contain bundled actin filaments and mediate degradation of the extracellular matrix. Invadopodia are thought to promote cancer invasion. In this study, the function of actinin-4, an actin bundling protein implicated in cancer progression, in invadopodia formation was investigated. Actinin-4 localized at invadopodia and was required for the formation of actin structures and the extracellular matrix degradation activity of invadopodia. Overexpression of actinin-4 enhanced invadopodia formation and this activity required the actin bundling activity. These results indicate that actinin-4 bundles actin filaments at invadopodia and plays an important role in cancer invasion and metastasis.

研究分野：腫瘍生物学、細胞生物学

キーワード：浸潤突起 アクチニン

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が浸潤し転移するためには、周囲の基底膜や間質に存在し物理的障害となる細胞外基質を分解する必要がある。浸潤突起 (Invadopodia) は癌細胞により形成される細胞膜構造であり、束化されたアクチン繊維を基本骨格に持ち、細胞外基質分解酵素を集積して周囲の細胞外基質を局所的に分解することにより、癌細胞が浸潤遊走する経路を作る。申請者はアクチン細胞骨格を中心に浸潤突起形成の分子機構や癌転移における役割を明らかにしてきた。しかし、浸潤突起形成におけるアクチン細胞骨格の制御機構には未解明の部分が多い。特に癌細胞特異的に働き、浸潤突起においてアクチン繊維を束化する分子は不明である。

アクチニン-4 は癌特異的抗原として同定されたアクチン束化タンパク質である。癌浸潤先端部に発現して癌の転移性や予後悪化と関連し、細胞運動に関わるが、その詳細な機能は不明である。また正常細胞に普遍的に発現しているアイソフォームであるアクチニン-1 との機能の違いについてもよく分かっていない。さらにアクチニン-4 は家族性巣状系球体硬化症の原因遺伝子産物であり、腎系球体のポドサイトに強く発現し濾過機能を担う足突起の形成に関わる。

2. 研究の目的

本研究では浸潤突起におけるアクチニン-4 の機能とアクチン束化メカニズムを明らかにすることを目的とした。またアクチニン-1 や腎疾患変異体との機能の違いを検討することにより、癌細胞でアクチニン-4 が発現してくる意義と腎疾患との共通性を明らかにすることを目指した。

1. アクチニン-4 の浸潤突起への局在機構を明らかにする。浸潤突起で機能する他のアクチン結合タンパク質との局在の比較、機能ドメインを欠失した各種変異体の局在の検討を行う。
2. 浸潤突起形成過程のアクチン細胞骨格再編におけるアクチニン-4 の機能を明らかにする。アクチニン-4 の発現抑制を行い、浸潤突起におけるアクチン細胞骨格の変化を検討する。
3. アクチニン-4 とアクチニン-1 のアイソフォーム間での機能の違いを検討する。両者の局在の違い、発現抑制や過剰発現を行った際の浸潤突起形成に対する影響の違いなどを検討する。
4. 家族性腎疾患変異体の局在や機能解析を行い、浸潤突起のアクチン細胞骨格に対する変異の影響やポドサイトでみられる足突起のアクチン細胞骨格異常との共通点を調べる。

3. 研究の方法

浸潤突起を形成する MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞株を主に用いて実験を行った。得られた

結果の普遍性を確認するため、RPMI7951 ヒトメラノーマ細胞株、SCC61 ヒト頭頸部癌細胞株も適宜併用して実験を進めた。浸潤突起形成のアッセイ系は申請者が既に確立した方法を用いた。具体的には蛍光ゼラチン上で細胞を培養し、間接蛍光抗体法と共焦点顕微鏡観察により浸潤突起の形成とゼラチンの分解活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 浸潤突起におけるアクチニンの局在

間接蛍光抗体法や GFP-コンストラクトの発現によりアクチニン-4、-1 共に浸潤突起に局在することが分かった。他の浸潤突起構成タンパク質との局在比較より、両アクチニンは共に、アクチンが密に存在する浸潤突起の中心部に局在することが明らかになった。また、タイムラプスイメージングにより、アクチニンは浸潤突起においてアクチン構造の形成と共に集積する様子が確認された。

(2) 浸潤突起におけるアクチニンの機能

先ずアクチニン-4、あるいはアクチニン-1 の siRNA を導入して発現抑制を行った。その結果、どちらのアイソフォームの発現を抑制しても浸潤突起形成及び細胞外基質分解活性が顕著に低下した。また浸潤突起のアクチン細胞骨格構造の形成が抑制されていることが分かった。

次に機能ドメインを欠失した各種変異体を作成し、浸潤突起への局在や機能に対する影響を検討した。その結果、過剰発現においては、アクチニン-4 のみが浸潤突起形成及びゼラチン分解活性を促進することが明らかになった。この浸潤突起形成の促進作用には、アクチニン-4 のアクチン束化活性を担うアクチン結合ドメインが必要であった。

さらに、アクチニン-4 の家族性腎疾患変異体を過剰発現させたところ、細胞内で異常なアクチン繊維の凝集が見られ、浸潤突起形成が顕著に抑制された。

以上の結果から、アクチニン-4 は浸潤突起においてアクチン繊維を束化するタンパク質であり、この機能が癌浸潤・転移において重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 6 件)

1. Ueno H, Tomiyama A, Yamaguchi H, Uekita T, Shirakihara T, Nakashima K, Otani N, Wada K, Sakai R, Arai H, and Mori K: Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 468: 240-247 (2015) 査読有

2. Yamaguchi H, and Sakai R: Direct interaction between carcinoma cells and cancer associated fibroblasts for the regulation of cancer invasion. *Cancers* 7: 2054-2062 (2015) 査読有
3. Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, and Sakai R: Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma through receptor endocytosis of anaplastic lymphoma kinase. *Cancer Res.* 74: 3790-3801 (2014) 査読有
4. Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, and Sakai R: Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and FGFR inhibitors. *Cancer Sci.* 105: 528-536 (2014) 査読有
5. Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, and Sakai R: Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLOS ONE* 9: e85485 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0085485. 査読有 eCollection 2014.
6. Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, and Sakai R: CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 11: 628-637 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 山口英樹、白木原琢也、堺隆一：スキルス胃癌における Met 下流シグナル伝達分子の機能解析．第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015 年 12 月 2 日 神戸)
2. 山口英樹、白木原琢也、堺隆一：スキルス胃癌細胞における Met 及び下流シグナル伝達分子の機能解析．第 74 回癌学会学術総会 (2015 年 10 月 9 日 名古屋)
3. 山口英樹、白木原琢也、堺隆一：スキルス胃癌細胞における Met 下流シグナル伝達分子の解析．第 24 回 日本がん転移学会学術集会・総会 (2015 年 7 月 23 日 大阪)
4. 山口英樹、堺隆一：癌細胞による浸潤突起形成の分子機構と転移における役割．第 73 回癌学会学術総会 (2014 年 9 月 27 日 横浜)
5. 山口英樹、堺隆一：間質線維芽細胞との相互作用を標的としたスキルス胃癌治療薬の探索．第 23 回 日本がん転移学会学術集会・総会 (2014 年 7 月 10 日 金沢)
6. Yamaguchi H, Yanagihara K, Yashiro M,

and Sakai R: Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. 105th Annual meeting of the American Association for Cancer Research (2014 年 4 月 8 日), San Diego, USA.

7. Yamaguchi H, Yanagihara K, Yashiro M, and Sakai R: Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference "The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Sciences to Therapeutics" (2013 年 12 月 17 日), Chiba, Japan.
8. Yamaguchi H and Sakai R: Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. Cell Migration and Invasion in Physiology and Pathology (2013 年 10 月 14 日), Nijmegen, The Netherland.
9. 山口英樹、柳原五吉、八代正和、堺隆一：間質線維芽細胞との相互作用を指標としたスキルス胃癌腹膜播種に対する分子標的薬の探索．第 72 回 日本癌学会学術総会 (2013 年 9 月 5 日 横浜)
10. 山口英樹：Molecular mechanisms of invadopodium formation and its role in cancer invasion and metastasis．第 22 回 日本がん転移学会学術集会・総会 (2013 年 7 月 12 日 松本)
11. 山口英樹、堺隆一：The role of stromal fibroblasts in invasion and metastasis of scirrhous gastric carcinoma cells．第 65 回日本細胞生物学会合同大会 (2013 年 6 月 20 日 名古屋)
12. Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, and Sakai R: Differential sensitivities to molecular target drugs in scirrhous gastric carcinoma cell lines. The 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research (2013 年 2 月 23 日), Maui, USA.
13. Yamaguchi H, Yoshida N, and Sakai R: The role of PI3-kinase signaling pathway in invadopodia formation. AACR Special Conference of Tumor Invasion and Metastasis (2013 年 1 月 21 日), San Diego, USA.

〔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.nccri.ncc.go.jp/jimu/030/080/20151209012629.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 英樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・ユニット長

研究者番号：10345035

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：