

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860561

研究課題名(和文)細胞極性喪失と癌細胞除去機構エントosisにおけるオートファジーの役割の解明

研究課題名(英文)Loss of cell polarity and the role of autophagy in entosis

研究代表者

稲見 義宏 (INAMI, YOSHIHIRO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70445500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞極性を喪失した腫瘍細胞とその周囲の正常細胞による腫瘍原生細胞の認識並び排除機構であるエントosisをin vivoとin vitroで評価した。

肝癌細胞とp62欠損肝癌細胞を作成し、両細胞を用いエントosisを観察した。結果、培養2日目からp62欠損肝癌細胞が肝癌細胞を貪食し、またp62欠損細胞が取り囲むように遊走し肝癌細胞の分裂・増殖を抑制する事が観察された。

研究成果の概要(英文)：The recognition of the tumor abiogenesis cells due to the neighboring normal cells equalled the tumor cells which lost cellular polarity and evaluated entosis which was an exclusion mechanism with in vivo and in vitro.

We made hepatocellular carcinoma which made p62 suffer a loss and observed it whether you occurred entosis using hepatocellular carcinoma. p62 deficiency hepatocellular carcinoma phagocytosed hepatocellular carcinoma, culture day 2, and it was observed that we migrated it so that p62 deficiency cells surrounded it and inhibited division, growth of hepatocellular carcinoma.

研究分野：肝臓

キーワード：エントosis 肝癌 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジー機能異常は p62 の過剰蓄積を介して肝細胞増殖を促進させ腫瘍化を誘導する。しかし増殖能を獲得した細胞が癌腫形成に至るまでの各段階にオートファジーがどのように関与するのかは不明な点が多い。そこで本研究では腫瘍化細胞の次のステップである細胞極性喪失とそれに引き続いて生じる周囲正常細胞による腫瘍原生細胞認識並びに排除機構であるエントosisにリソソームやオートファジーがどのように関与するのかを明らかにし、腫瘍化細胞の生体内環境適応を標的とした新規治療的アプローチについて模索する。

2. 研究の目的

<細胞極性喪失とオートファジー>

細胞極性は、正常細胞の秩序だった分化、増殖に重要な役割を果たしており、癌化細胞では極性喪失による無秩序な増殖が特徴となっている。細胞極性決定には partitioning defective (PAR) 蛋白やプロテインキナーゼ C (PKC) 関連蛋白が中心的役割を担い、PAR- α PKC 複合体が細胞表面に局在することで細胞極性が確立することがわかっている。 α PKC は多彩な機能を持ち肝細胞においてはインスリン感受性や脂質量調整に関与し、極性喪失によって生じる細胞内代謝変化に関与することが示唆されている。一方、我々はこれまで肝脂肪化がカテプシン B, L 発現を抑制しオートファジーによる蛋白分解の障害や p62 蓄積をきたすこと、さらにオートファジー機能異常による p62 蛋白蓄積が肝細胞腫瘍化を惹起することを報告してきた (Biochem Biophys Res Commun. 2011, J Cell Biol. 2011)。またプロトタイプの実験であるが腫瘍化細胞と癌化細胞でカテプシン発現を評価したところ、腫瘍化細胞 (hepatoma) が癌化細胞に転化するとカテプシン B, L 発現が増加することがわかった。カテプシン L もインスリン感受性や細胞内脂肪蓄積に関与することから、細胞極性喪失による細胞内代謝変化において PKC とカテプシン L は何らかの相互作用を有している可能性が示唆された。オートファジーもカテプシンの動きと相関し、癌化抑制作用を有する一方で、逆に癌化すると誘導され低栄養や抗癌剤に対し癌細胞保護的に作用することが明らかとなっている。カテプシンやオートファジー発現誘導が癌化に伴って生じる極性喪失や細胞内代謝変化において重要な役割を果たしているものと想定される。また細胞極性喪失は、同時に細胞骨格解体を誘導し、損傷治癒や細胞遊走性を亢進するが、この細胞骨格解体にはリソソームやオートファジーを介した大規模な蛋白分解経路が関与している可能性が示唆される。以上の背景を基に、カテプシン・オートファジーが極性崩壊や細胞癌化にどのように関与するのかを明らかにし、癌に対する新規治

療開発の可能性を探求することとした。

<エントosisとオートファジー機能障害>

腫瘍原生を持つ極性喪失細胞が、それを取りまく正常細胞に貪食され細胞死を引き起こし組織から排除される機構をエントosisといい、新しい細胞死の概念として提唱されている。エントosisについては不明な点が多いが、最近、正常な上皮細胞が JNK シグナル活性化を介して極性喪失細胞 (癌化細胞) を認識・排除することが報告された (Ohsawa et al. Developmental Cell 2011)。また正常細胞によって貪食された極性崩壊細胞はオートファジー関連蛋白 LC3 に囲まれ、リソソーム内酵素カテプシンで分解されることからエントosisによる細胞死にはオートファジーが関与すると考えられる (Florey et al. Nat Cell Biol 2012)。オートファジーを介した蛋白分解では p62 による除去蛋白の修飾が重要であり、とくに腫瘍化肝細胞においては p62 蛋白が蓄積していることから、生体内ではエントosisが肝癌抑制において重要な役割を担っているものと推定される。肝脂肪化による非癌細胞のオートファジー機能障害やカテプシン発現抑制はエントosisを抑制し、肝癌成立に作用している可能性が示唆される。肝癌成立とエントosisの関係の解明は新たな予防医療の開発において重要と思われる本研究の着想に至った。

カテプシン過剰発現による細胞極性関連蛋白の発現・活性化ならびに細胞極性蛋白の発現抑制による極性喪失がカテプシン・オートファジー発現に与える変化を解析し、蛋白分解経路と細胞極性間の interaction を解明する。また同時に細胞内蛋白・糖代謝動態を調べ、代謝変化において鍵となる分子を同定する。

リソソーム・オートファジー関連蛋白を欠失した細胞株 (正常上皮細胞株もしくは hepatoma cell) を作成し癌細胞エントosisにおいてオートファジー関連蛋白がどのように関与しているのかを明らかにする。

p62 欠失癌細胞においてエントosisによる除去が回避されるのかを検討し、癌細胞にエントosisからの回避機構があるのかについても検証する。

3. 研究の方法

1. 人肝癌細胞株である HLE, HLF, Huh1, Huh7, JHH4, JHH5, JHH7 細胞と Lonza 社より購入した人正常肝細胞である THLE2 細胞を用い、オートファジー関連タンパクである p62 蛋白の発現をウエスタンブロット法で評価した
2. JHH5 細胞と Huh1 細胞を用い細胞増殖能の評価として WT-1 アッセイを行った。

3. Cell Tracker Red/Green を用い蛍光顕微鏡を用いエントーシスを観察した。
4. pMXs の Vector に GFP, DsRed, m-cherry などの蛍光色素を形質導入したものを作製した後、PLAT-E を用い THLE2 細胞に GFP と DsRed を、JHH5 細胞と Huh1 細胞に GFP, DsRed, m-cherry を恒常的に形質導入したモデルを作製した。
5. Zinc finger nuclease system を用い JHH5 細胞から p62 欠損細胞を作製した
6. JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞におけるエントーシスが生じるかを観察するため IncCyte™ ZOOM を用い連続的に撮影した。
7. 3D culture System を用い JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 1×10^6 cell ずつカウントした後共焦点顕微鏡にて観察し評価した。
8. JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 1×10^5 cell ずつ MIX し 35mm 培養皿に撒き、当日・1日目・3日目と培養した後フローサイトメトリーにて細胞の数を評価した
9. ノードマウスの肝臓に JHH5 細胞と JHH5p62 細胞・Huh1 細胞と Huh1p62 細胞の両細胞を 5000cell ずつ MIX させ、genograft を行った。
10. 細胞極性蛋白である partitioning defective (PAR) family や癌細胞の増殖・浸潤の調節を行うプロテインキナーゼの PKC の評価をウエスタンブロットにて評価した。
11. 細胞内での細胞極性の蛋白の分布を調べるために免疫二重染色を行い評価した。

4. 研究成果

人肝癌細胞株である HLE、HLF、Huh1、Huh7、JHH4、JHH5、JHH7 細胞を用い、オートファジー関連タンパクである p62 蛋白の発現をウエスタンブロット法で評価したところ、Huh1 と JHH5 細胞においてその他の肝癌細胞より p62 の発現が増強していた。

このため、Huh1 と JHH5 細胞を用い WT-1 アッセイを行い、Huh1 よりも JHH5 細胞で細胞の分裂・増殖が活発であったため、本研究ではまず JHH5 細胞を用い実験を行うこととした。

エントーシスを観察するため正常肝細胞として Lonza 社から人肝細胞株である THLE2 細胞を購入し使用。培養皿上でシート化し観察を試みた。THLE2 細胞に対して Cell Tracker Green を用い染色。また、肝癌細胞株として JHH5 細胞を使用し、JHH5 細胞に対しては Cell Tracker Red を用い染色した。染色 24 時間後、両細胞とも細胞数を 5×10^4 個ずつ計算した後 35mm のガラスボトム培養皿に撒き、24 時間培養後共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。しかし、Cell Tracker Green と Cell Tracker Red の蛍光色素で染色した THLE2 細胞と JHH5 細胞

が 24 時間後十分に染色・接着せず観察は困難であった。その後、蛍光色素の濃度を繰り返し変更し観察を試みたものの、両細胞とも十分に染色・接着せずエントーシスの評価検討が困難であった。

このため、安定的に細胞を観察できるように THLE2 細胞には GFP を JHH5 細胞には DsRed を恒常的に形質導入するモデルの作製を行った。GFP と DsRed を組み込んだ Vector を作製した後、THLE2 細胞には GFP を JHH5 細胞には DsRed を形質導入した。THLE2-GFP 細胞は細胞の形態変化はなく完成したものの、JHH5 細胞に DsRed を形質導入したモデルでは DsRed の細胞毒性のためか細胞の形態が崩壊し、細胞を継代していくとその細胞形態はより悪化した。このことから、実験に使用することは困難であった。その後、Red の蛍光色素を変更し恒常的発現モデルの作製を試みたものの細胞の形態自体が崩壊してしまっており、実験に使用できるものでないため、蛍光色素を m-cherry に変更し作製を行った。

また、THLE2-GFP 細胞を作製した後 p62 蛋白の発現レベルを評価するためにウエスタンブロットを行ったところ、p62 蛋白は JHH5 細胞と同程度発現をしていた。このため THLE2 細胞を本研究の正常肝細胞モデルとして使用することは不適合であるため、オートファジー関連タンパクである p62 の発現の有無にてエントーシスが生じるかを検討する目的にて JHH5 細胞から p62 を欠損させる細胞の作製に着手した。

Zinc finger nuclease system を用い JHH5 細胞から p62 欠損細胞 (JHH5p62K0 細胞) を作製した後、JHH5p62K0 細胞に m-cherry を形質導入したモデルと JHH5 細胞に GFP を形質導入したモデルの作製を行った。

また、JHH5 細胞と JHH5p62K0 細胞を用い WT-1 アッセイを行ったところ、JHH5 細胞の方が JHH5p62K0 細胞より細胞の増殖能が活発であることがわかった。

恒常的蛍光色素形質導入モデルを作製後、JHH5 GFP 細胞を 1×10^6 cell をカウントした後培養皿に撒き、培養皿中心部に JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 5000cell 撒き、24 時間後蛍光顕微鏡を用いエントーシスを観察するも、エントーシスの観察は出来なかった。24 時間後という一時的な観察ではエントーシスが生じていることが確認出来なかったため、JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 5×10^4 cell ずつカウントし MIX させた後、培養室内に設置されている IncCyte™ ZOOM を用い 3 時間おきに細胞を連続的に撮影し観察した。結果、培養開始 2 日目から 4 日目にかけ細胞分裂を起こしていた JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞が接着すると、JHH5p62K0 m-cherry 細胞が JHH5 GFP 細胞を

数時間かけ貪食する像が観察された。またその他の部分では JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞が分裂・増殖し細胞同士が近接してくると JHH5p62K0 m-cherry 細胞の遊走能が増大し JHH5 GFP 細胞を取り囲み、JHH5 GFP 細胞が分裂・増殖が抑制される事が観察された。

生体と近い環境でも観察するために 3D culture System を用い JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 1×10^6 cell ずつカウントした後 MIX させ培養を行った。共焦点顕微鏡にて 1 日 1 回の観察であり、また観察部位は毎日異なるものの 30 日間観察を行ったところ、6 日目頃から JHH5p62K0 m-cherry 細胞が JHH5 GFP 細胞を取り囲みコロニー化されていくことが多数で観察された。20 日目頃には JHH5p62K0 細胞に取り囲まれた JHH5 GFP 細胞は増殖せず、徐々に蛍光の発現も低下していくことが分かった。

JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 2×10^5 cell ずつ MIX し培養皿に撒き、1 日目・3 日目・5 日目と培養した後 GFP と m-cherry 抗体を用いウエスタンブロットにて評価したところ、GFP は 1 日目・3 日目・5 日目と発現の低下を認め、m-cherry は 1 日目・3 日目・5 日目と発現の増強を認めた。また、p62 蛋白でも評価したが 1 日目・3 日目・5 日目において GFP 抗体と同様に発現が低下していることが分かった。

JHH5 GFP 細胞と JHH5p62K0 m-cherry 細胞を 1×10^5 cell ずつ MIX し 35mm 培養皿に撒き、当日・1 日目・3 日目と培養した後フローサイトメトリーにて細胞の数を計算したところ、当日・1 日目・3 日目の JHH5p62K0 m-cherry 細胞数の増加と JHH5 GFP 細胞・JHH5p62 m-cherry 細胞の MIX した細胞数の増加を認め、JHH5 GFP 細胞では低下した。

次に、人肝癌細胞株である HLE、HLF、Huh1、Huh7、JHH4、JHH5、JHH7 細胞を用い、カテプシン L とカテプシン D の発現をウエスタンブロット法で評価したところ、Huh1 と JHH5 細胞で発現が増強していた。また JHH5 細胞と JHH5p62K0 細胞を用い、カテプシン L をウエスタンブロットにて評価したところ、JHH5p62K0 細胞で発現の増強を示した。

JHH5 細胞を用い、p62 の発現の有無により細胞の貪食や増殖能や遊走能に変化を認めることが分かったため、p62 強発現細胞である Huh1 細胞でも同様のことが起こるかを確認した。Zinc finger nuclease system を用い Huh1 細胞から p62 欠損細胞を作製した後、再度 Huh1p62K0 細胞に m-cherry を形質導入したモデルと Huh1 細胞に GFP を形質導入したモデルの作製を行った。

JHH5 細胞と同様に Huh1 細胞と Huh1p62 細胞 5×10^4 cell ずつカウントし MIX させた後、IncCyte™ ZOOM を用い細胞を連続的に観察した。結果、培養開始 2 日目から 4 日目にかけ細胞分裂を起こしていた Huh1 GFP 細胞と Huh1p62K0 m-cherry 細胞が近接してくると Huh1p62K0 m-cherry 細胞が Huh1 GFP 細胞を取り囲み、その後 Huh1 GFP 細胞の増殖を抑制している事が観察された。3D culture System でも JHH5 細胞と同様に Huh1p62K0 m-cherry 細胞が Huh1 GFP 細胞を取り囲みコロニーを形成していくことが観察され、その後 JHH5 細胞と同様に増殖できなくなった Huh1 GFP 細胞の蛍光発現が徐々に低下していくことが分かった。

これらのことより、通常個別に培養すると増殖能に富んでいる p62 強発現肝癌細胞が p62 欠損細胞と共培養することにより p62 強発現肝癌細胞が p62 欠損細胞に貪食されたり、p62 強発現細胞が p62 欠損細胞に覆われることにより増殖能が抑制されるということがわかった。

生体内環境適応を標的とした新規治療的アプローチについて模索するため Tet-On 発現誘導システムを用い genograft を試みるも Tet-On 発現誘導システムの作製ができなかった。このため、JHH5 細胞と JHH5p62 細胞・Huh1 細胞と Huh1p62 細胞の両細胞を 5000cell ずつ MIX させ、ヌードマウスの右臍に移植し、2 か月後に sacrifice したが肝臓内に腫瘍化せずエントーシスの確認も出来なかった。

次に、細胞極性蛋白である partitioning defective (PAR) family の PAR6・PAR3 や癌細胞の増殖・浸潤の調節を行うプロテインキナーゼの PKC の評価を JHH5 細胞と JHH5p62K0 細胞と Huh1 細胞と Huh1p62K0 細胞を用いウエスタンブロットにて評価した。すると JHH5p62 細胞と Huh1p62 細胞の両方細胞で PAR6 と PKC では発現の変化は見られなかったが、PKC とキナーゼドメインで結合する細胞極性蛋白である PAR3 の発現は著名に低下していた。また Real time PCR においても PAR6 と PKC では発現の変化は見られなかったが、Par3 が低下しておりウエスタンブロット法と同様の結果だった。

細胞内での細胞極性の蛋白の分布に変化がみられるのかどうかを調べるために免疫染色を行った。Huh1・JHH5 細胞にて p62-PAR6 p62-PKC の二重染色を行ったところ細胞質全体に共局在を呈しており、PAR3 は細胞質全体に分布していることが分かった。

本研究において、p62 と PAR3 がエントーシスに關与する蛋白であることが分かった。

しかし、今回のモデルではある程度の期間観察を行うことにより現象の確認が出来るため、他の細胞でみられるような数時間でのエントーシスは観察できなかった。
今後肝癌細胞株で Par3 の欠損モデルを作製し、共培養にてエントーシスが生じるのかを評価していく必要がある。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

稲見 義宏 (INAMI, Yoshihiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70445500

(2)研究協力者

山科 俊平 (YAMASHINA, Shunhei)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30338412

(3)連携研究者

なし