

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640074

研究課題名(和文)がん細胞の集団的移動と多様性を確立する分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms of Collective Migration of Cancer Cells

研究代表者

高橋 雅英 (Takahashi, Masahide)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんの浸潤部位において細胞が集団を形成して移動する集団的移動が高頻度に観察され、がんの浸潤に重要な役割を担うことが指摘されている。集団的移動をしている細胞は、集団の先端のleading cell (LC)とそれに引き続くfollowing cell (FC)に分けられる。我々はLC細胞において転写因子TRIM27とMRTF-Bが活性化し、インテグリン β 1の発現を上昇することが、がん細胞の集団的移動のメカニズムの1つであることを明らかにした。また神経芽細胞の集団的移動ではアクチン結合蛋白Girdinが細胞接着因子N-カドヘリンの膜局在を制御し、その集団的移動に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For collective invasion, cancer cells form cohesive groups comprised of leading cells (LCs) at the forefront and following cells (FCs) at the rear. However, the molecular mechanisms that define LCs and FCs remain elusive. We demonstrated that LCs, but not FCs, upregulated the expression of integrin β 1. The LC-specific expression of integrin β 1 was regulated by the TRIM27/MRTF-B complex in response to the loss of intercellular adhesion. Depletion of TRIM27 and MRTF-B abrogated the upregulation of integrin β 1 in LCs and blocked the invasion of cancer cell groups in vitro and in vivo.

Girdin is an actin-binding protein that has multiple functions in postnatal neural development and cancer progression. Girdin is a regulator of collective (or chain) migration for neuroblasts born from neural stem cells in the subventricular zone. Girdin mutant mice showed an aberrant expression pattern of N-cadherin in migrating SVZ neuroblasts, leading to abrogation of neuroblast collective migration.

研究分野：実験病理学

キーワード：がん細胞 集団的移動 細胞接着因子 TRIM27 MRTF-B Girdin インテグリン N-カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

一般にがん細胞が浸潤性を獲得する際には上皮性の細胞が接着性を失った間葉性の細胞へ転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) し、単一細胞での運動性を獲得することが必要であるとされていた。しかしながら、多くの浸潤性のがん組織において、細胞間接着を保ったがん細胞が集団を形成して移動・浸潤する (collective cell migration/invasion) という現象が観察されており、EMT に依らないがん細胞浸潤の機構が示唆されている (Friedl P. et al., Nat. Rev. MCB, 2009) (図 1)。がん細胞の集団的な移動に関しては、現在に至るまで海外の一部のグループから報告されているのみで、分子機構については未知のままであるといえる。

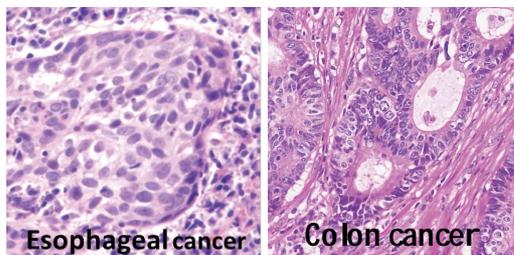


図 1. 食道がん、大腸がんの集団的浸潤像

移動する細胞集団は、先端で先導役となる leading cell (LC) とそれに引き続いて動く following cell (FC) に区別され、これらの細胞が異なる遺伝子発現プロファイルを有することが効率的な集団的移動に必要であると報告されている (McLennan R. et al., Development, 2012)。しかし、LC-FC 間で異なる遺伝子発現プロファイルが如何にして確立されるか、その詳細な分子機構は現在では不明である。細胞内在性の機序と外部からの刺激に依存した機序が協調的に作用することが示唆されているが、解明が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

病理学的な観察から、がんの浸潤部位において細胞が集団を形成して移動する集団的移動が高頻度に観察され、がんの浸潤に重要な役割を担うことが指摘されてきている。集団的移動をしている細胞は、集団の先端の leading cell (LC) とそれに引き続く following cell (FC) に分けられる。これらの細胞間の異なる遺伝子発現プロファイルが集団的移動に重要との報告があるが、その分子機構は不明である。最近我々は LC で integrin 1 の発現が高いこと、さらにその発現制御に転写制御因子 TRIM27 と MRTF-B の複合体形成が重要であることを見出した。本研究では LC-FC 間で異なる integrin 1 の発現制御機構のさらなる解明を通じて、「集団的移動を制御する LC-FC 細胞間での異なる遺伝子発現制御機構とそれががん浸潤における意義を明らかにすること」を目的とする。

また、最近の研究にてわれわれが独自に同定したアクチン結合蛋白 Girdin が細胞の集団的移動に参与することが示唆されたので、Girdin の遺伝子改変マウスを用いて、そのメカニズムの解明も目指した。

3. 研究の方法

(1) TRIM27/MRTF-B の複合体形成を誘導する細胞外シグナル経路と細胞内在性機構との相互作用の検討

LC-FC 間で異なる遺伝子発現を規定する TRIM27/MRTF-B 複合体の機能に影響を与える細胞外シグナル経路を同定する。細胞外因子による刺激によって LC における integrin 1 の発現が上昇するか否かを判定するために以下の方法を用いる。細胞が島状の集団を形成するようにディッシュ上に播き、候補となる因子で刺激する。刺激後一定時間ごとに細胞を固定し、固定した細胞集団からレーザーマイクロダイセクションによって LC と FC を分取してタンパクおよび mRNA のサンプルを作製する。integrin 1 の発現量の検討にはウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法を用いる。

TRIM27/MRTF-B の機能および integrin 1 の発現に影響を与える細胞外因子のシグナル伝達経路が如何にして内在性機構と相互作用するかを明らかにする。具体的には、シグナル伝達経路を担う分子と TRIM27/MRTF-B 複合体が相互作用するか否かを、免疫沈降法あるいは精製タンパク質を用いた共沈降実験にて検討する。さらに、その相互作用が integrin 1 の発現制御に必須であることを確かめる。同定した制御分子が、がん細胞の集団的な浸潤能にどのような影響が出るかを調べる。具体的な手法として、organotypic culture 法を用いて集団的な浸潤能を検討する。

(2) アクチン結合蛋白 Girdin による細胞の集団的移動のメカニズムの解析

Girdin 結合分子を免疫沈降法により同定し、その機能を生化学的、細胞生物学的手法により解析する。Girdin 変異マウスを用いて、同定した結合分子の生体内における細胞の集団的移動の意義を検討する。

Girdin は C 末端の塩基性アミノ酸の豊富な領域を介して細胞膜と結合することが示されている。この塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異マウスでは、脳室下帯から嗅球へ遊走する神経芽細胞の集団的移動に障害が起き、嗅球の低形成が生じる。野生型マウスと本変異マウスの神経芽細胞に発現する細胞接着因子をウェスタンブロット法、免疫染色法を用いて比較し、神経芽細胞の集団的移動のメカニズムの解析を行う。

神経系の培養細胞を用いて、Girdin および Girdin 結合蛋白をノックダウンし、細胞接着

因子の発現あるいは細胞内局在に異常が生じるかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) TRIM27/MRTF-B の複合体形成を誘導する細胞外シグナル経路と細胞内在性機構との相互作用の検討

がん細胞の集団的移動(浸潤)では、集団の先頭を進む先導細胞(leading cells: LC)と後続細胞(following cells: FC)の2種類の細胞が生じ、効率的な浸潤に寄与していると考えられている。しかし、がん細胞の集団がどのようなメカニズムでこれらの細胞を生み出すのかは明らかになっていない。われわれはLCにおいて細胞運動関連分子であるintegrin 1の発現が高いことに着目し、その発現を制御する機構の解析を行った。その結果、転写因子TRIM27とMRTF-Bが、LC内で先導端における細胞間接着の喪失、E-カドヘリン分子の発現の減少に反応して、活性化し、核内においてTRIM27/MRTF-B複合体を形成することを明らかにした。さらにこの複合体形成がマイクロRNA-124(miR-124)の発現を抑制することを見出した。miR-124はintegrin 1 mRNAを標的として、そのタンパク質合成を阻害することが知られており、miR-124の発現が抑制されることで、LCにおいてintegrin 1の発現が増加することが判明した。一方、FCでは周囲を他の細胞に囲まれているため細胞接着は失われず(E-カドヘリンの発現が低下せず)LCで見られたようなintegrin 1の発現上昇が起きなかった(図2)。この結果から、がん細胞集団内では細胞間接着の有無、ひいては細胞の位置に依存して、異なる遺伝子発現を示すことが明らかになった。さらに、培養細胞株を用いたorganotypic cultureやマウスの腫瘍移植モデルの実験から、LCで観察されるintegrin 1の高発現ががん細胞の集団的移動(浸潤)および遠隔臓器への転移に重要な役割を果たしていることが判明した。

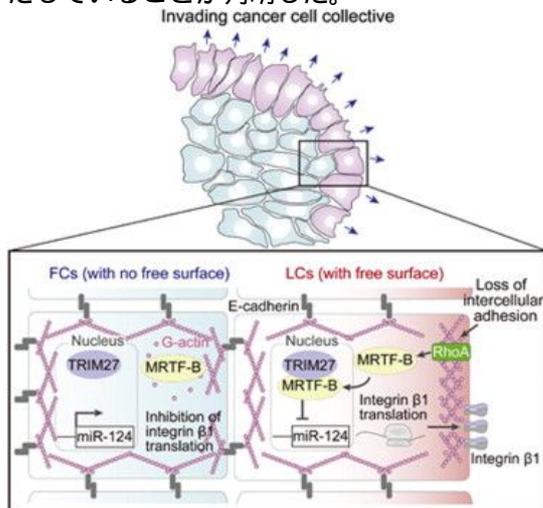


図2. Leading Cells (LCs)における integrin 1 の発現制御機構

(2) アクチン結合蛋白 Girdin による細胞の集団的移動のメカニズムの解析

Girdin はがん細胞の浸潤、転移に重要な役割を果たすとともに、変異のマウスの解析から神経芽細胞の集団的移動(chain migration)にも重要であることが判明している。脳室下帯で新生する神経芽細胞は吻側移動経路(rostral migratory stream: RMS)と呼ばれる長い距離を移動し、嗅球への到達過程で「chain migration」という集団的移動を行うことが知られている。Girdinの変異マウスではchain migrationに異常が生じ、神経芽細胞が嗅球に到達できず、嗅球の低形成が生じる。免疫染色により、細胞接着に関わる分子の発現解析を行った結果、Girdin変異マウスでは野生型マウスと比較して、N-カドヘリンの発現低下が観察された(図3)。一方、神経芽細胞の集団的移動に必須とされている別の細胞接着因子PSA-NCAMの発現や細胞内局在には変化を認めなかった。さらにN-カドヘリンの細胞内輸送に関わっているキネシン-1とGirdinとの相互作用を免疫沈降法で解析したところ、両者が共沈することから相互作用があることが明らかになった。よって、Girdin変異マウスにおけるN-カドヘリンの発現低下はGirdinとキネシン-1の相互作用の変化に基づく可能性が示唆された。すなわち、Girdinは細胞接着部位におけるN-カドヘリンの膜輸送および細胞間接着のダイナミックなリモデリングの制御により神経芽細胞の集団的移動に関わっている可能性が考えられた。Girdinはがん細胞の浸潤、転移能にも重要な役割を果たしており、がん細胞の集団的移動においても同様な機序が関わっていることが示唆される。

野生型マウス Girdin変異マウス

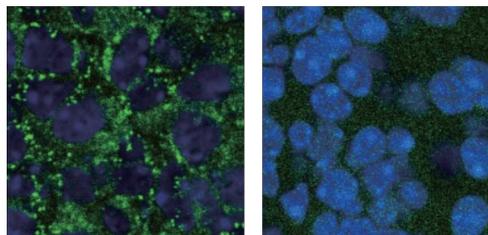


図3. RMSの神経芽細胞における N-cadherin 染色

マウスの神経芽細胞腫細胞を用いて、Girdinの発現をノックダウンした際のN-カドヘリン発現、細胞内局在を検討した。培養神経芽細胞腫細胞ではGirdinの発現の変化により、N-カドヘリン発現、細胞内局在に大きな変化は見られず、Girdin変異マウスの生体内でのN-カドヘリン発現の変化のメカニズムの解析をさらに進める必要がある。

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 6 件)

1. Wang X, Enomoto A, Asai N, Kato T, Takahashi M. Collective invasion of cancer: Perspectives from pathology and development. *Pathol. Int.* 査読有 66: 183-192 (2016). DOI: 10.1111/pin.12391
2. Muramatsu A, Enomoto A, Kato T, Weng L, Kuroda K, Asai N, Asai M, Mii S, Takahashi M. Potential involvement of kinesin-1 in the regulation of subcellular localization of Girdin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 463: 999-1005 (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.049
3. Yamamura Y, Asai N, Enomoto A, Kato T, Mii S, Kondo Y, Ushida K, Niimi K, Tsunoda N, Nagino M, Ichihara S, Furukawa K, Maeda K, Murohara T, Takahashi M. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Res.* 査読有 75: 813-823 (2015). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1317
4. Nishimae K, Tsunoda N, Yokoyama Y, Kokuryo T, Iwakoshi A, Takahashi M, Nagino, M. The impact of Girdin expression on recurrence-free survival in patients with luminal-type breast cancer. *Breast Cancer* 査読有 22:445-451 (2015). DOI: 10.1007/s12282-013-0501-3
5. Weng L, Enomoto A, Miyoshi H, Takahashi K, Asai N, Morone N, Jiang P, An J, Kato T, Kuroda K, Watanabe T, Asai M, Ishida-Takagishi M, Murakumo Y, Nakashima H, Kaibuchi K, Takahashi M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. *EMBO J.* 査読有 33: 2098-2112 (2014). DOI: 10.15252/embj.201488289
6. Kato T, Enomoto A, Watanabe T, Haga H, Ishida S, Kondo Y, Furukawa K, Urano T, Mii S, Weng L, Ishida-Takagishi M, Asai M, Asai N, Kaibuchi K, Murakumo Y, Takahashi M. TRIM27/MRTF-B-dependent integrin 1 expression defines leading cells in cancer cell collectives. *Cell Rep.* 査読有 7: 1156-1167 (2014).

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.068

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 榎本篤、加藤琢哉、高橋雅英: 細胞接着因子の空間的ダイナミクスが関わるがん細胞の集団的移動のメカニズム 第 74 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)
2. 榎本篤、加藤琢哉、高橋雅英: がん細胞の不均一形成における間質の重要性 第 104 回日本病理学会総会(招待講演) 2015 年 4 月 30 日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)
3. 榎本篤、加藤琢哉、高橋雅英: A mechanism of integrin beta1 expression that defines leading cells in collective invasion of cancer. 第 73 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
4. 加藤琢哉、榎本篤、三井伸二、浅井真人、浅井直也、高橋雅英: TRIM27-USP7 による p53 制御機構の解明、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日、広島国際会議場(広島県、広島市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Enomoto A, Weng L, Takahashi M. (Springer 社)、Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling; Critical roles of the Akt substrate Girdin in disease initiation and progression. 総ページ数 347 (P233-250) (2015).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/pr ofile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40183446

(2) 研究分担者

加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号: 00551970
(平成 26 年 9 月 30 日まで分担者)