

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 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：26670188

研究課題名(和文)がん細胞の集団的浸潤を特異的に制御する新規分子機構の探索

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms that regulate collective invasion of cancer cells

研究代表者

榎本 篤 (Enomoto, Atsushi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20432255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞の集団的移動を特異的に制御する分子機構を探索することを目的とした。最初にモノレイヤーカルチャーモデルとスクラッチアッセイにおいて遺伝子発現変化を検証し、leading cellで発現が上昇する候補分子を複数同定したが、肺がん組織を用いた免疫染色ではいずれもleading cellへの特異的な局在を認めなかった。次に神経芽細胞の集団移動の制御分子として知られているアクチン結合分子Girdinの結合分子として細胞間接着関連分子を同定した。細胞間接着の動態制御は細胞の集団移動の重要な特性の一つであり、本分子複合体が集団移動で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)：The aim of the study was to comprehensively reveal gene expression profile found in the “leading cells” that locate in the invasive forefront of cancer cell groups, based on the “monolayer culture model”, which we previously developed and “scratch assay” of cancer cells in culture. We identified several candidate genes that are specifically upregulated in the leading cells in culture. However, our immunohistochemistry on lung cancer tissues did not show specific expression of the products of those genes in the leading cells. We next identified a component of the intercellular adhesion as a candidate interacting protein for Girdin that is known as a critical regulator of collective migration of neuroblasts. The dynamics of cell-cell adhesion is an important property of cells that undergo collective migration. The identified protein complex, therefore, may have a role in the collective migration of cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：集団移動 集団浸潤 癌 Girdin

1. 研究開始当初の背景

細胞移動は組織形成の根幹を成す現象である一方で多くの病態に関与している。例えば神経芽細胞の移動は神経系の形成に必要な不可欠であり、がん細胞の浸潤や転移は組織機能の破綻を引き起こしている。がん細胞をはじめ細胞移動に関する多くの研究はこれまで培養皿上の単一細胞を対象に行われてきた傾向が強い。しかしながら実際の個体、特に発生過程において細胞は集団を形成して移動することが頻繁に観察され、細胞の「集団的移動」と呼ばれている。特筆すべきは、多くのがん細胞が個々ばらばらではなく、集団的に浸潤・転移することである。私達も病理診断業務に関わっている経験から、がん細胞は一部の低分化型をのぞいてほとんどが集団的に浸潤・転移するという事実を経験している。このがん細胞の「集団的浸潤」(=collective invasion)は過去から病理学者に繰り返し指摘されている課題でありながら分子機序については不明の点が多く残されている。内外の研究を見渡しても、単一細胞の移動でなく集団的移動に特異的な分子機序を明らかにした研究はほとんどみられないのが現状である。

2. 研究の目的

近年の海外の研究成果によれば、発生期の神経堤細胞の集団的移動は、先頭の leading cell とそれに続く following cell から構成され、集団的移動の維持のためにはそれぞれの細胞における特徴的な遺伝子発現や細胞内シグナル制御が必要と説明された。がん細胞集団における leading cell と following cell の相違は長らく不明のままであったが、最近私達は、肺の扁平上皮癌において leading cell 特異的に接着因子インテグリン ($\beta 1/\beta 3$)や抗アポトーシス分子 Bcl-2 が高発現する症例があることを報告した (An et al., J Cancer Res Clin Oncol 139:379, 2013)。さらにその機序として、転写調節因子 TRIM27 が leading cell における”前方の空間”あるいは”前方の細胞間接着の欠失”を感知して、その情報をインテグリン mRNA の翻訳調節に伝達することを明らかにした (Kato et al., Cell Reports, 7:1156-1167, 2014)。また申請者は独自に研究を進めてきたアクチン結合分子 Girdin が脳の脳室周囲で産生された神経芽細胞の集団的移動を制御する分子であることを明らかにし、がん細胞の集団的浸潤にも関与する可能性を明らかにした (Enomoto et al., Dev Cell 9:389, 2005; Enomoto et al., Neuron 63:774, 2009; Wang et al., J Neurosci 31:8109, 2011 他)。また Girdin が神経芽細胞の他にも、乳がん、神経膠芽腫に高発現して浸潤を制御することも報告しており (Jiang et al., Cancer Res 65:1310, 2008; Natsume et al., Oncogene

31:2715, 2012)、Girdin による神経芽細胞の集団的移動の制御メカニズムはがん細胞の集団的浸潤にも重要である可能性があることと推測している。

以上の背景から、本研究では申請者らのこれまでの研究で確立してきた集団的移動の実験モデルを基軸として、がん細胞の集団的浸潤を特異的に制御する新規分子機構を広く探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)がん細胞集団の leading cell に特異的 (=following cell で観察されない) な遺伝子発現パターンの解明

申請者らが培養皿上で leading cell を作出するモデルとして最近確立した「モノレイヤーカルチャーモデル」(Kato et al., Cell Reports, 7:1156-1167, 2014) と「スクラッチアッセイ」において、マイクロアレイを行い、leading cell に特異的な遺伝子発現パターンを広くスクリーニングした。上記二者で共通して高発現する分子群の抽出を試みた。

(2)Girdin 結合分子群の同定によるがん細胞の集団的浸潤を制御するメカニズムの解明

Girdin の結合分子群、特に Girdin の C 末端の塩基性アミノ酸領域に特異的に結合する分子群をアフィニティークロマトグラフィーで探索した。同定された分子複合体の意義を細胞生物学および生化学の各種手法で解析した。

4. 研究成果

(1)がん細胞集団の leading cell に特異的な遺伝子発現パターンの解明

集団的浸潤をするがん細胞集団の leading cell には特異的な遺伝子発現パターンが存在することが予想されるが、その全容は明らかになっていない。申請者らは培養皿上で leading cell を作出する実験系として「モノレイヤーカルチャーモデル」と「スクラッチアッセイ」の2種類を考案し (Kato et al., Cell Reports, 7:1156-1167, 2014)、実際にこれらのモデルで作出される leading cell にインテグリン $\beta 1$ が特異的に発現することを確認している。

「モノレイヤーカルチャーモデル」ではがん細胞を軽度トリプシン消化し、島状・巣状に播種することで、100%コンフルエントの細胞に比べて多くの leading cell を作出する系である。実際にこの両者で Western blot を行なうと、島状にまいた状態ではインテグリン $\beta 1$ の発現が顕著に高くなることが確認されている。他方「スクラッチアッセイ」は 100%コンフルエントの細胞をスクラッチ

するのみの単純な方法であるが、これでもインテグリン β 1がleading cellで発現することを確認している。本研究ではこの両者の実験モデル系において、leading cellの作出に伴う遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法でスクリーニングした。

その結果、「モノレイヤーカルチャーモデル」と「スクラッチアッセイ」の両者で経時的に発現が上昇する数個の遺伝子群が同定された。その一つにHeparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)が含まれていた。過去の文献を調べるとHB-EGFが皮膚創傷治癒過程において表皮細胞の遊走に重要であり、特に創傷のエッジ部分にその発現が集積すると報告されている(Shirakata et al., *J Cell Sci*, 118:2363, 2005)。このことは本実験モデルの有用性を実証するものと考えられた。他には両者で発現が上昇したのものとして受容体型チロシンキナーゼの下流でアダプター分子として働くDok7 (docking protein 7)、ケモカインであるCXCL2 (chemokine C-X-C motif ligand 2)、あるいは5'-nucleotidase, ecto (CD73)等が同定された。

次に実際にかん組織のleading cell特異的に上記分子が発現しているかどうか確認するため、各分子に対する抗体を購入し、肺がん(扁平上皮がん)組織を用いた免疫染色を行った。その結果、上記いずれもleading cell特異的な発現が確認されなかった。抗体の感度あるいは特異性による可能性も考えられ、今後さらなる検証が必要と考えられた。

(2)Girdin結合分子群の同定によるがん細胞の集団的浸潤を制御するメカニズムの解明

前述のようにGirdinが脳室周囲の神経幹細胞で産生された神経芽細胞の集団的移動に重要であることを明らかにしており(Wang et al., *J Neurosci* 31:8109, 2011; Asai et al., *BBRC* 426:533, 2012)、またGirdinが様々ながんで高発現する分子であることから、Girdinによる集団的移動の機序の探索はがん細胞の集団的浸潤の解明にも繋がる可能性が高い。本研究では脳の抽出液を用いたアフィニティークロマトグラフィーと質量分析法によってGirdinの結合分子を探索した。その結果Girdinの新規結合分子として細胞間接着の動態制御に重要な分子として知られる β -cateninを同定した。

Girdinの結合責任領域をマッピングしたところGirdinのアクチン細胞骨格が結合する領域であるC末端ドメインに β -cateninが結合することが明らかとなった。 β -cateninはE-cadherinやN-cadherinなどの細胞間接着分子の細胞内取り込みを制御する分子であり、細胞の集団的移動を制御している可能性も非常に高いものと考えられる。一方で β -cateninはWntシグナル伝達系の下流で活性化される転写にも重要な役割を果たすこと

が知られている。RNA干渉法でGirdinをノックダウンしたところ、HEK293細胞におけるWntシグナルが有意に抑制された。Wntシグナルは細胞の増殖や分化の他、細胞の集団移動でも重要な機能を有することが過去の研究で明らかにされている。

以上の結果より、Girdinと β -cateninの相互作用はWntシグナルと細胞間接着の両方で重要な働きを有する可能性が示唆された。またWntシグナルと細胞間接着のクロストークが細胞の集団的移動において重要な働きを有する可能性も示唆された。

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12件)

(1) Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. Identification of Meflin as a potential marker for mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*. 6:22288, 2016. (査読有)

(2) Wang X, Enomoto A, Asai N, Kato T, Takahashi M. Collective invasion of cancer: Perspectives from pathology and development. *Pathol Int*. 66:183-92, 2016. (査読有)

(3) 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 463:999-1005, 2015. (査読有)

(4) 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 Research* 75:813-823, 2015. (査読有)

(5) Hayano S, Takefuji M, Maeda K, Noda T, Ichimiya H, Kobayashi K, Enomoto A, Asai N, Takahashi M, Murohara T. Akt-dependent Girdin phosphorylation regulates repair processes after acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 88:55-63, 2015. (査読有)

(6) Iwama S, Sugimura Y, Kiyota A, Kato T, Enomoto A, Suzuki H, Iwata N, Takeuchi S, Nakashima K, Takagi H, Izumida H, Ochiai H, Fujisawa H, Suga H, Arima H, Shimoyama Y, Takahashi M, Nishioka H, Ishikawa SE, Shimatsu A, Caturegli P, Oiso Y. Rabphilin-3A as a Targeted Autoantigen in Lymphocytic

Infundibulo-neurohypophysitis. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 100: E946-54, 2015. (査読有)

(7) Ichimiya H, Maeda K, Enomoto A, Weng L, Takahashi M, Murohara T. Girdin/GIV regulates transendothelial permeability by controlling VE-cadherin trafficking through the small GTPase, R-Ras. Biochemical and Biophysical Research Communications 461:260-267, 2015. (査読有)

(8) Tanaka H, Goto H, Inoko A, Makihara H, Enomoto A, Horimoto K, Matsuyama M, Kurita K, Izawa I, Inagaki M. Cytokinetic Failure-induced Tetraploidy Develops into Aneuploidy, Triggering Skin Aging in Phosphovimentin-deficient Mice. The Journal of Biological Chemistry 290: 12984-12998, 2015. (査読有)

(9) Noda T, Maeda K, Hayano S, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Murohara T. New endoplasmic reticulum stress regulator, Gipie, regulates the survival of vascular smooth muscle cells and the neointima formation after vascular injury. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 35:1246-1253, 2015. (査読有)

(10) Omori K, Asai M, Kuga D, Ushida K, Izuchi T, Mii S, Enomoto A, Asai N, Nagino M, Takahashi M. Girdin is phosphorylated on tyrosine 1798 when associated with structures required for migration. Biochemical and Biophysical Research Communications 458: 934-940, 2015. (査読有)

(11) Han YP, Ma CK, Wang SQ, Enomoto A, Zhao Y, Takahashi M, Ma J. Evaluation of osteopontin as a potential biomarker for central nervous system embryonal tumors. Journal of Neuro-oncology 119:343-351, 2014. (査読有)

(12) 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. The EMBO Journal 33: 2098-2112, 2014. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 前田啓子、榎本篤、後藤秀実、高橋雅英：間葉系幹細胞およびペリサイトの新規マーカー候補分子 Meflin の同定. 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市), 2016 年 3 月 18 日 (口演)

(2) 山村由美子, 浅井直也, 榎本篤, 三井伸二, 高橋雅英: 腫瘍微小環境における Akt 結合蛋白 Girdin の関与の検討. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 4 月 30 日. (ポスター)

(3) 田中宏樹、後藤英仁、猪子誠人、牧原弘幸、榎本篤、伊澤一郎、稲垣昌樹: ビメンチンリン酸化不全マウスの皮膚線維芽細胞は染色体異数性を呈し、皮膚の早期老化を示す. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 10 月 8 日. (ポスター)

(4) Weng, L., Enomoto, A., Asai, N., Kato, T., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Takahashi, M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. The 6th EMBO meeting, Birmingham (英国), Sep 6, 2015. (Poster presentation)

(5) 山村由美子, 浅井直也, 榎本篤, 三井伸二, 高橋雅英: 腫瘍微小環境における Akt 結合蛋白 Girdin の関与の検討. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 4 月 30 日. (ポスター)

[図書] (計 1 件)

Enomoto A, Weng L, Takahashi M. Critical roles of the Akt substrate Girdin in disease initiation and progression. in Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling (eds. Jun-ichiro Inoue, Mutsuhiro Takekawa) Ch. 15, 348 pages (233-250) (Springer, 2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 篤 (ENOMOTO, Atsushi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 20432255

(2) 研究分担者

なし