

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：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870004

研究課題名(和文) Filaminを介した正常上皮細胞の抗腫瘍作用機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms for the filamin-induced defensive force of normal epithelial cells against cancer

研究代表者

梶田 美穂子 (Kajita, Mihoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：00607442

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)：申請者は、正常上皮細胞が隣接する癌原性変異細胞の存在を認識して積極的に排除することを発見し、EDAC (Epithelial Defense Against Cancer)と名付けた(Kajita et al., 2014 Nat. Commun.)。本申請ではEDAC現象を分子レベルで解明するため、EDACに中心的な役割を果たすfilaminに着目して、その制御因子を網羅的に探索した。その結果、正常細胞と変異細胞の混合培養時にfilaminへの結合量が増加するタンパク質を複数同定することに成功した。さらに、新たに報告されたEDAC関連因子とfilaminとの相互作用も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Normal epithelial cells recognize and extrude neighboring transformed cells from an epithelial monolayer. We named this process as EDAC (Epithelial Defense Against Cancer). In this project, I focused on filamin, which plays a central role for EDAC, to understand molecular mechanisms for EDAC. Several molecules were successfully identified as increased binding to filamin under the mix culture of normal and transformed cells. Furthermore, the interaction between newly identified EDAC-inducing molecules and filamin was also elucidated.

研究分野：分子腫瘍学、免疫学

キーワード：filamin EDAC SILAC Caveolin EPLIN S1P

1. 研究開始当初の背景

申請者は、がん発生の超初期段階には「正常上皮細胞による抗腫瘍作用 (EDAC: Epithelial Defense Against Cancer)」という新しいタイプの生体防御機構が働いていることを世界で初めて報告した (Kajita et al., 2014 Nat. Commun.)。filamin は正常細胞内で機能し、EDAC 現象に中心的な役割を果たすが、その制御機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

EDAC に中心的な役割を果たす filamin を制御する分子の探索により、EDAC 現象を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SILAC 法による filamin 結合タンパク質の同定

正常上皮細胞による抗腫瘍作用を制御する因子を同定するため、まずは変異細胞に隣接する正常上皮細胞内で特異的に filamin と結合するタンパク質を網羅的に同定することを試みた。スクリーニングについては SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acid in Cell culture) 法を用いた網羅的かつ定量的な解析を行った。正常上皮細胞としては非形質転換型上皮細胞である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞、変異細胞株として温度感受性に v-Src 活性を誘導できる ts-Src-MDCK 細胞を用いた (Kajita et al., 2010, J. Cell Sci.)。実際の実験は、下記の Step 1-Step 4 のように進めた。

Step 1: まず、MDCK 細胞と ts-Src 細胞を異なる安定同位体アミノ酸を含んだ培地で 10~14 日間培養してタンパク質をラベルした。

Step 2: 軽いアミノ酸でラベルした MDCK 細胞とラベル無し ts-Src 細胞を 1:1 の割合で混合した。同時に、重いアミノ酸でラベル

した MDCK 細胞を単独培養した。

Step 3: それぞれのタンパク質を抗 filamin 抗体にて免疫沈降した。

Step 4: 免疫沈降されたペプチド全量を質量分析 (LC-MS/MS) によって解析することにより、混合培養条件下の正常細胞内でのみ特異的に filamin と結合するタンパク質を探索した (図 1 参照)。

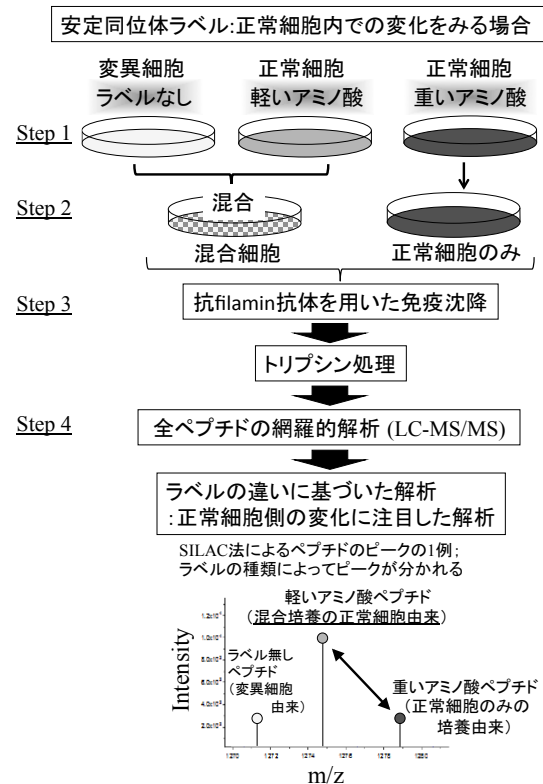


図 1 SILAC 法の概念図

(2) EDAC に関与する因子と filamin の相互作用の解析

申請者が所属する研究室で新たに EDAC 現象に関わっていることが明らかとなった因子 EPLIN-Cavelin や S1P (sphingosine-1-phosphate)-S1PR2 について、filamin との相互作用を細胞染色などにより確認した。

4. 研究成果

(1) SILAC 法による filamin 結合タンパク質の探索

① SILAC 法の条件検討

まず、「3. 研究の方法」で述べた通りに変異細胞、正常上皮細胞を安定同位体でラベ

ルし、変異細胞と正常細胞を混合してラベルなしの培地で培養した。その結果、混合培養している間に、軽いアミノ酸でラベルした正常細胞のタンパク質が、ラベルなしのアミノ酸に著しく置換されてしまうことがわかった。EDAC 現象を効果的に誘導するため、混合してからの培養時間を短縮することは避けるべきであったため、新たな実験系を検討した。新たな実験系では、混合培養するための細胞を全て重いアミノ酸でラベルし、比較用に正常細胞と変異細胞のそれぞれを軽いアミノ酸でラベルした（図 2 参照）。こうすることで、得られたペプチドのピークが混合培養由来か単培養由来かが識別できる。この方法では、混合培養、単培養共に 90% 以上のアミノ酸が再現性良くラベルされており、ラベルの違いに基づいた解析が可能となった。

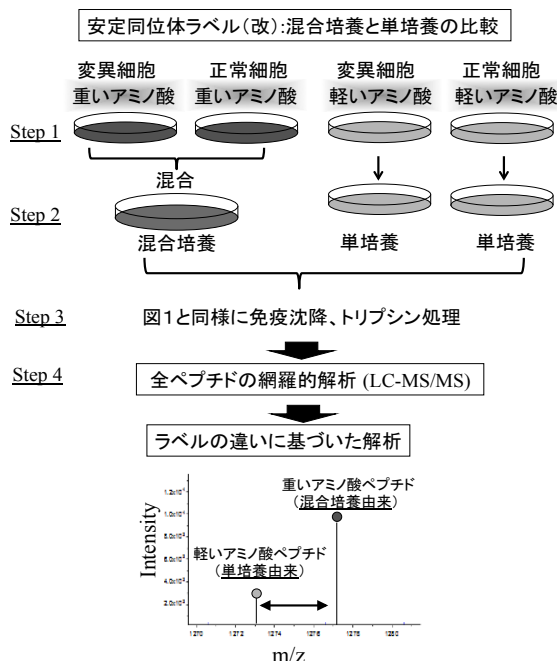


図 2 改変した SILAC 法の実験の流れ

② SILAC 法による混合培養時特異的 Filamin に結合するタンパク質の同定

改変した SILAC 法に従って実験を進めた結果、正常細胞と変異細胞の混合培養時に、単培養と比べて 2 倍以上 filamin への結合量が増加していたタンパク質を複数同定した。その中でも、細胞極性タンパク質 DLG や GPI

アンカータンパク質である Semaphorin 7A などは、それぞれ単培養時と比べて、混合培養時に 5.11 倍または 2.99 倍と大幅な filamin との結合性の増強が見られた。この結果により、正常細胞と変異細胞の混合条件下では、filamin は単培養とは異なる結合性を示すことが明らかとなった。

今後はこれらのタンパク質について正常細胞と変異細胞の境界における局在や、モデルマウスを用いた *in vivo* の解析を行っていきたい。

(2) EDAC に関与する因子と filamin の相互作用の解析

申請者が所属する研究室では、filamin 以外にも EDAC に関与する分子を同定している。例えば脂質ラフトの Caveolae を構成する Caveolin は、正常細胞に囲まれた変異細胞内において著しく集積しており、さらにその上流ではアクチン結合タンパク質 EPLIN が Caveolin の集積を促進して、EDAC 現象を正に制御している (Ohoka et al., J. Cell Sci., 2015)。周りの正常細胞から filamin をノックダウンすると、この EPLIN-Caveolin の集積が抑制されていた。また、変異細胞から EPLIN もしくは Caveolin をノックダウンすると、周りの正常細胞における Filamin の集積が抑えられた。これらの結果から、正常細胞における filamin と、変異細胞内 EPLIN や Caveolin が相互の集積を制御し合っていることが示された (図 3 参照)。

また、申請者は Rho-Rho kinase 経路が filamin の上流で作用して EDAC を制御していることを報告したが、どのように Rho-Rho kinase 経路が制御されているのかは不明であった。今回、脂質メディエーターである S1P (sphingosine-1-phosphate) が、正常細胞側の S1P 受容体である S1PR₂ に作用し、その下流で Rho-Rho kinase を活性化することによって filamin を制御していることが明ら

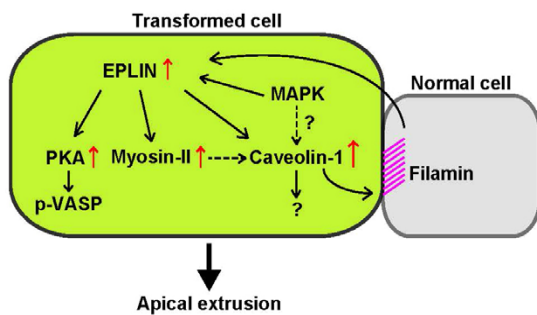


図3 変異細胞内の EPLIN-Caveolin と正常細胞内 filamin との相互作用 (Ohoka et al., 2015 J. Cell Sci. より転載)

かとなった (図4; Yamamoto et al., 2016 Mol. Biol. Cell)。正常上皮細胞内または変異細胞内における S1P の産生を阻害しても EDAC 現象は抑えられないことから、exogenous な S1P が作用していることもわかった。この結果により、生体内では、S1P の局所的な濃度の違いによって EDAC の誘導頻度が影響を受けることが示唆された。

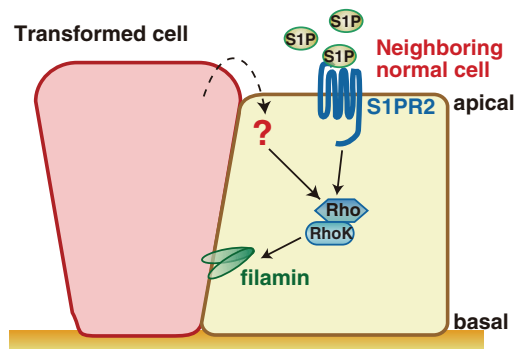


図4 S1P-S1PR2 経路による Filamin 集積の制御 (Yamamoto et al., 2016 Mol. Biol. Cell より転載)

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) Yamamoto, S., Yako, Y., Fujioka, Y., Kajita, M., Kameyama, T., Kon, S., Ishikawa, S., Ohba, Y., Ohno, Y., Kihara, A., and Fujita, Y. (2016) A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in epithelial defense against cancer (EDAC). *Mol Biol Cell*, **27**, 491-99. (査読あり)

(2) Kajita, M. and Fujita, Y. (2015). [EDAC (Epithelial defence against cancer)-cell competition between normal and transformed epithelial cells in mammals.] *実験医学(増刊)* **33** (10), 128-34. (査読なし)

(3) Kajita, M. and Fujita Y. (2015). EDAC: Epithelial defence against cancer-cell competition between normal and transformed epithelial cells in mammals. *J Biochem*, **158**, 15-23. (査読あり)

(4) Ohoka, A., Kajita, M., Ikenouchi, J., Yako, Y., Kitamoto, S., Kon, S., Ikegawa, M., Shimada, T., Ishikawa, S. and Fujita, Y. (2015). EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells. *J Cell Sci*, **128**, 781-89. (査読あり)

(5) Kajita, M., Sugimura, K., Ohoka, A., Burden, J., Suganuma, H., Ikegawa, M., Shimada, T., Kitamura, T., Shindoh, M., Ishikawa, S., Yamamoto, S., Saitoh, S., Yako, Y., Takahashi, R., Okajima, T., Kikuta, J., Maijima, Y., Ishii, M., Tada, M. and Fujita, Y. (2014). Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat Commun*, **5**, 4428. (査読あり)

(6) Katarzyna, A. A., Sinclair, J., Ohoka, A., Kajita, M., Ishikawa, S., Benz, P. M., Renne, T., Balda, M., Jorgensen, C., Matter, K. and Fujita, Y. (2014). PKA-regulated VASP phosphorylation promotes extrusion of transformed cells from the epithelium. *J Cell Sci*, **127**, 3425-33. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

Mihoko Kajita 口頭発表

「Filamin acts as a key regulator in epithelial defense against transformed cells」第 37 回分子生物学会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田美穂子 (Kajita Mihoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号: 00607442