

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870692

研究課題名(和文) Crb3aの腫瘍組織における発現と機能の解析

研究課題名(英文) Expression and functional analyses of Crb3a in tumor tissues

研究代表者

飯岡 英和 (Iioka, Hidekazu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20425416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞極性制御因子Crubs3(Crb3)の腫瘍形成における役割は十分に判明していない。ウェスタンブロット、免疫組織化学的解析から、正常組織に加え、一部の腺癌系の細胞・組織においてもCrb3が強く発現することが明らかとなった。またCRISPR/Cas9システムを用い、大腸癌由来培養細胞を使用してCrb3ノックアウト(Crb3KO)細胞を調製した。in vitroとin vivoの実験により親株とCrb3KO細胞比較したところ、Crb3KO細胞では形質膜状のガングリオシドが増加し、移動性が顕著に低下していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The function of Crubs3 (Crb3) in human tumorigenesis is not fully understood. Western blots and immunohistochemistry revealed that Crb3 is strongly expressed in a part of human adenocarcinoma cell lines, and is localized in the luminal plasma membrane not only in normal tissue but also in tubular cancers. Crb3 knockout (KO) colon cancer cell lines are established by CRISPR/CAS9 system, and Crb3 KO cells showed remarkable reduction in cell migration in vitro and in vivo. Ganglioside has been shown previously to suppress tumorigenesis by inhibiting plasma membrane receptors, and we found that ganglioside was increased on plasma membrane in Crb3 KO cells. Restoration of Crb3 in KO cell blocked plasma membrane localization of ganglioside. These data indicate that Crb3 suppresses ganglioside localization to plasma membrane, to inhibit tumor cell behaviors.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：細胞極性 腫瘍 浸潤 転移 ガングリオシド シアリダーゼ ノイラミニダーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞極性は個々の細胞の形態や機能に方向性を持たせる性質であり、生体の正常な発生や恒常性の維持に寄与するのみならず、極性の破綻は病変に繋がる。例えば癌の病理診断における分化度の低下や異型性は、上皮細胞極性の異常・消失を端的に示すものと考えられる。既知の上皮細胞極性制御因子のうち唯一の細胞貫通タンパク質である Crumbs (Crb) は、上皮細胞の頂部膜のみに局在し、タンパク質複合体を形成することで、正常な上皮組織の構築に必須の役割を果たす。哺乳類における Crb 相同遺伝子の一つである Crb3 は全身の上皮組織に発現し、上皮-間充細胞転移 (EMT) の制御因子として知られる Zeb1 や Snail によって発現が抑制される事が示されており、癌細胞の浸潤・転移と密接に関わる事が予想される。しかし、これまでにヒトの組織・細胞を用いた解析は乏しく、ヒトの癌の亢進・抑制との関連性は明らかではなかった。研究が進んでいない理由の一つとしては、ヒト Crb3 タンパク質を認識する良質の抗体が存在しなかった事が挙げられる。また、Crb3 遺伝子座からは2つのアイソフォーム (Crb3a, Crb3b) が発現する事が知られており、両者の機能を個別に解析する必要がある。そこで、申請者は抗体作成に取り組み、極性形成に機能する Crb3a を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成に成功した。これまでに本抗体を用いてヒト癌組織病理切片の染色を行い、正常組織においては Crb3a が管腔上皮頂部にのみ存在することを初めて明らかにした。また、腫瘍組織においては管腔を維持した高分化な組織では管腔上皮頂部に局在するが、分化度が低く、異型性が強くなるにつれ局在の不均一化、頂部以外への局在、発現量の低下等の傾向が認められた。一方、大腸癌由来培養細胞を用いて Crb3 の過剰発現またはノックダウンを行ったところ、細胞の増殖および移動性への影響が観察された。さらに興味深いことに、ノックダウンを行った際に、細胞サイズが増大する現象を発見した。

2. 研究の目的

上皮細胞極性制御因子の一つ Crb3 は正常細胞による機能的上皮組織構築に必須の分子であるが、悪性腫瘍における発現様式や特徴、分子機能は未だ不明である。申請者はこれまでに新規のヒト Crb3 アイソフォーム a 特異的モノクローナル抗体の作成に成功した。この抗体を用いてヒトの腫瘍形成における Crb3 遺伝子の分子病理学的特徴や機能を明らかにし、新たな癌の診断・治療戦略を考える上での基礎的知見を得ることを目的としている。本研究で明らかにすることは以下の3点である。

1. 多くの臓器由来の病理組織を用いて Crb3a の染色パターンを解析する。

2. Crb3a が腫瘍形成において果たす役割をゼノグラフトモデルにより実験的に検証する。

3. Crb3a が細胞サイズを制御するメカニズムの基本骨格を明らかにする。

本研究では独自に作成したモノクローナル抗体を使用し、内生性 Crb3a の発現を検出し、確固たる情報を組織や細胞から得られる点に特徴がある。結果として Crb3a の腫瘍形成における役割が明らかとなるのみならず、抗体自体が分化度の判定をサポートする診断マーカーとして有用である可能性が考えられる。

3. 研究の方法

本研究で着目する3点と、方法は以下の通りである。

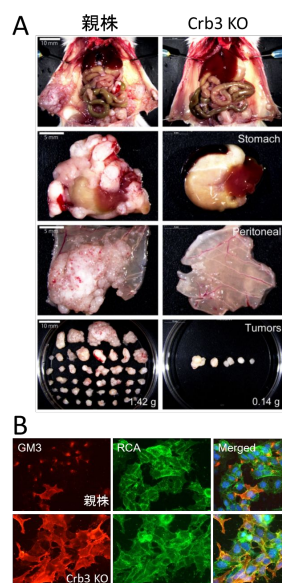
(1) 「多種の病理切片を用いた Crb3a の発現パターンの解析」切片アレイなどを用いて、全身の臓器を効率的に網羅する。本研究では、すでに乳癌を含む数種の病理切片を用いて Crb3a の染色を完了しているが、全身の組織をカバーするまでには至っておらず、癌の種類についても十分とは言えない。最終的に全身の臓器とあらゆる癌種について広く深く網羅したいと考えており、切片アレイなどを用い、できるだけ効果的に症例を増やす努力をする。また、病理系研究室との共同研究も検討する。

(2) 「ゼノグラフトモデルによる Crb3a の腫瘍形成における役割の解析」予め細胞極性を維持した癌細胞種を選定し、安定的な過剰発現またはノックダウンの処置を行い、ゼノグラフトに用いる。正常組織において Crb3a は管腔形成に機能すると考えられるが、癌細胞種では発現していても機能していない、または発現自体が無い細胞種も存在すると考えられる。Crb3a の機能を評価する際には、ある程度極性形成能を維持した細胞種を用いて行うことが重要と考えられる。そこで、数十種類の培養癌細胞の細胞抽出液を用いてウェスタンブロットを行い、Crb3a タンパク質を発現する細胞種を特定した。さらに、Crb3a タンパク質を発現する細胞種を用いて3次元培養法の検討を行い、現在までにスフェロイド内部に管腔を形成する大腸癌由来培養細胞株を同定している。このことは、この細胞種が癌組織由来でありながら、管腔形成能、つまり、細胞極性を維持していることを示しており、本研究を遂行する上で理想的な細胞株と考えられる。この細胞株に対して、レンチウイルス等を用いて Crb3 の安定的な過剰発現またはノックダウンを施し、ゼノグラフト実験を行うことで腫瘍形成における Crb3 の機能を *in vivo* で明らかにする。

(3) 「Crb3a による細胞サイズ制御機構の解析」ノックダウンにより肥大化した細胞を FACS により分取し、生化学的・分子生物学的な方法でコントロールの大細胞画分と比較することで、mTOR シグナルとの関連性を検討する。申請者は Crb3 ノックダウン細胞において、細胞サイズが肥大化することを見出している。同様の現象は mTOR シグナルの活性化によって起きることが知られており、Crb3 が mTOR シグナルと何らかの作用機序を共有して細胞サイズを制御している可能性を予想している。これまでに、siRNA 処理した細胞を血清飢餓状態で維持し、フローサイトメーターで細胞サイズを比較したところ、コントロール細胞に二つのピークが検出された。そこで、効果的なサブトラクションを行うため、コントロールとノックダウンの両細胞サンプルから大サイズ細胞集団をフローサイトメーターにより分取し、これらを生化学および分子生物学的に詳細に比較する。生化学的な指標としては細胞サイズの制御に関する mTOR シグナルの基質である p70S6 kinase や、その下流の S6 ribosomal protein のリン酸化状態等を比較する。また Crb3 と mTOR の関連分子の相互作用に着目し、免疫沈降やウェスタンブロットを行い、関連性を評価する。また、分子生物学的な方法として、DNA マイクロアレイ、パスウェイ解析等により遺伝子発現の変動から関連経路・分子を予測する方法の実施を検討している。以上の解析により、Crb3 の細胞サイズ制御メカニズム、さらに腫瘍形成における役割を明らかにする。

4. 研究成果

本研究の開始以前に、*in vitro* の実験系による研究の報告から Crb3 は腫瘍形成に対し抑制的に機能すると予想されていた。しかし本研究により、特に腺癌系の細胞・組織において Crb3 が強く発現するものが相当数存在する事が明らかとなり、Crb3 が腫瘍抑制因子であるとする前提に矛盾が生じた。そこで当初の計画を大幅に変更し、内在性の Crb3 の機能解析を行うために、CRISPR/Cas9 システムにより Crb3 ノックアウト (KO) 大腸癌細胞を樹立した。Crb3 KO 細胞と親株の比較実験を行い、Crb3 KO 細胞では浸潤・転移能が著しく阻害されていることが判明した(図 A)。さらに Crb3 が癌細胞の浸潤・転移を制御するメカニズムの解析に焦点を当て、形質膜コンポーネントの変化を集中的に解析したところ、レクチンスクリーニングにより親株と Crb3 KO 細胞では PNA (ピーナッツアグルチニン) による染色パターンに違いが見られることが判明した。PNA の結合ターゲットの一つは、糖脂質であるガングリオシドであると考えられていることから、Crb3 による腫瘍形成促進メカニズムにガングリオシドが関与している可能性があると考えた。ガングリオシドはラクトシルセラミドに糖鎖付加す



A) 免疫不全マウスに親株又は Crb3 KO 癌細胞を腹腔内移植した。Crb3 KO 細胞では転移浸潤が抑制され腫瘍形成が著しく阻害されている。
B) 親株又は Crb3 KO 癌細胞を抗ガングリオシド GM3 抗体 (赤)、汎糖鎖に結合する RCA120 レクチン (緑)、Hoechst (青) を使用して染色した。KO 細胞では GM3 が形質膜状に強く局在する

ることで生合成される一連の分子種であり、理論的には 2000 種上の分子種からなる糖脂質ファミリーである。腫瘍形成との関連性が報告されているガングリオシド GM3 は受容体型チロシンキナーゼの活性化を抑制することが報告されており、GM3 と Crb3 の関連を検証することとした。

その結果、GM3 が親株細胞では細胞内に扣留されるのに対し、Crb3 KO 細胞では形質膜状に強く局在することが判明した(図 B)。また KO 細胞に見られる GM3 の膜局在はウイルスベクターを用いて Crb3 を強制発現させることで抑制され、親株と同様な染色パターンを示すことが判明した。Crb3 による GM3 の局在制御と浸潤転移との関連を示すため、トランスウェルチャンバーアッセイにより、移動性を評価したところ、Crb3 の KO により抑制された移動性は強制発現により回復することが判明した。また、同じ細胞を使用し、受容体型チロシンキナーゼの下流分子である ERK1/2 のリン酸化を確認したところ、血清刺激依存的な ERK1/2 のリン酸化は Crb3 の KO によって阻害されるが、強制発現により回復し、細胞移動のアッセイと一致した結果が得られた。以上の結果から、Crb3 は GM3 による受容体型チロシンキナーゼの不活性化を抑制することで腫瘍形成を促進するものと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 発表者名: Hidekazu Iioka, Ken Saito, Eiichi Morii, Eisaku Kondo
発表タイトル: The cell polarity regulator Crumbs3 promotes colon adenocarcinoma tumorigenesis
学会名: 第 105 回日本病理学会総会

発表年月日：2016年5月13日
発表場所：仙台国際センター（宮城県・仙台市）

（2）発表者名：Hidekazu Iioka, Ken Saito, Masakiyo Sakaguchi, Eiichi Morii, Eisaku Kondo

発表標題：The cell polarity regulator Crumbs3 promotes adenocarcinoma tumorigenesis

学会名：第74回日本癌学会学術総会

発表年月日：2015年10月8日

発表場所：名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

（3）発表者名：Hidekazu Iioka, Ken Saito, Eiichi Morii, Eisaku Kondo

発表標題：The cell polarity regulator Crb3 positively regulates colon cancer cell migration,

学会名：第104回日本病理学会総会

発表年月日：2015年4月30日

発表場所：名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

〔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

飯岡 英和 (IIOKA, Hidekazu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20425416

(2)研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者

無し ()

研究者番号：