

研 究 報 告 書

「癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：山口 英樹

1. 研究のねらい

がんは日本人の死亡原因の1位であり約3人に1人はがんで亡くなる。がん患者の命を奪う最も大きな要因は悪性癌の転移であるが、その有効な治療法は未だほとんど無い。癌細胞が転移するためには、癌組織を取り囲む基底層の破壊や間質への浸潤が不可欠である。しかし基底層や間質に存在する細胞外基質は物理的障害となるため、癌細胞はこれを分解しながら遊走する必要がある。従って、癌細胞による細胞外基質分解機構の解析は、癌浸潤・転移の分子レベルでの本態解明と、それに基づく新たな治療法の開発に極めて重要である。

浸潤性の癌細胞を生理的な細胞外基質上で培養すると、細胞外基質分解活性を持つ浸潤突起(Invadopodia)と呼ばれる構造が細胞底部に観察される(図1)。癌細胞の浸潤突起形成能と浸潤・転移能には強い相関がみられることから、浸潤突起は癌細胞が周辺組織を浸潤する際に機能し、癌転移において重要な役割を果たすと考えられている。しかし未だ浸潤突起形成の分子機構には不明な部分が多く、特にどのような形質膜上のシグナルが浸潤突起形成を制御しているのか全く明らかになっていない。そこで本研究では、浸潤突起形成のトリガーとして働くと考えられる形質膜構成脂質に着目し、局所的なシグナル伝達に関わる細胞膜ドメイン構造である脂質ラフトと、シグナル伝達脂質であるイノシトールリン脂質について機能解析を行った。このようなアプローチから、癌浸潤・転移治療法の開発につながる分子基盤を得ることを目的とした。

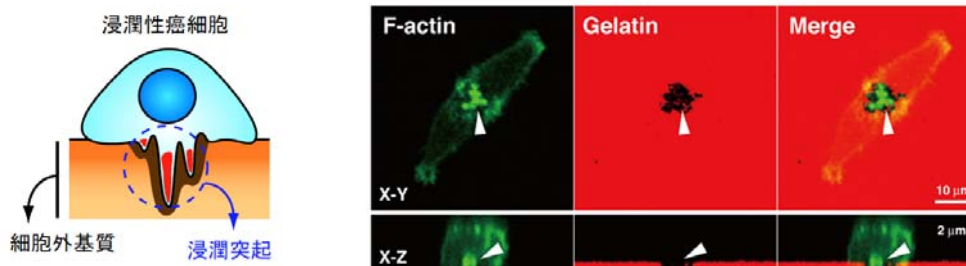


図1. ヒト転移性乳癌細胞 MDA-MB-231 による浸潤突起形成

左：浸潤突起の模式図。右：蛍光ゼラチンコートしたカバーガラス上で MDA-MB-231 細胞を培養するとアクチン繊維(F-actin)に富む浸潤突起が細胞底部に形成され、黒く抜けたゼラチンの分解部位が観察される(矢頭)。

2. 研究成果

2-1 脂質ラフトとCaveolin-1 の機能解析

脂質ラフトはコレステロールとスフィンゴ脂質に富む微小膜ドメインである。脂質ラフトは癌関連遺伝子産物を含む様々なシグナル伝達分子が集積する場を与え、局所的かつ効率的な細胞機能の制御に関与する。またいくつかの浸潤突起構成分子が脂質ラフトに集積することが知られている。そこで本研究では、浸潤突起を介した癌細胞の浸潤活性における脂質ラフトとその関連分子の機能解析を行った。

動物実験での転移モデルに広く使用され、進行性乳癌の遺伝子発現パターンを持つことが知られるヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を主に用いて解析を行った。蛍光ラベルしたゼラチン上で MDA-MB-231 細胞を培養すると、アクチン繊維に富む浸潤突起が点状に観察され、その部分で黒く抜けたゼラチン分解部位が観察される(図1)。この実験系を用いて浸潤突起

形成と細胞外基質分解活性の解析を行った。

まず、脂質ラフトのマーカーであるコレラ毒 B サブユニット (CTxB) を用いて細胞染色を行った結果、浸潤突起において強いシグナルが観察された (図2)。また、生細胞イメージングにより脂質ラフトの動態を経時的に観察したところ、脂質ラフトは浸潤突起周辺で細胞内に取り込まれ、輸送されることが明らかになった。次に、浸潤突起形成における脂質ラフトの機能解析を行った。脂質ラフト形成を阻害するメチル- β -シクロデキストリンやナスタチンで細胞を処理したところ、浸潤突起形成と細胞外基質分解活性が顕著に低下した。RNAi により脂質ラフト構成タンパク質である Caveolin-1、Caveolin-2、Flotilin-1 の発現抑制を行った結果、Caveolin-1 の発現抑制により浸潤突起形成が抑制された。Caveolin-1 は脂質ラフトに存在するアダプタータンパク質であり様々な機能分子と結合することにより、膜輸送、細胞運動、シグナル伝達などに関与する。Caveolin-1 は浸潤突起に集積し、脂質ラフト膜と共局在する様子が観察された。浸潤能の異なるヒト乳癌細胞株において Caveolin-1 の発現を検討したところ、浸潤能の高い細胞においてのみその発現が確認された。またこれらの細胞は浸潤突起を形成し、その形成は Caveolin-1 の発現抑制により阻害された。さらに浸潤突起の細胞外基質分解活性を担うマトリックスメタロプロテアーゼである MT1-MMP が脂質ラフトに存在し、Caveolin-1 がその機能に必須であることを明らかにした。以上の結果から、浸潤突起は脂質ラフトに富む膜ドメインであり、脂質ラフトの形成が浸潤突起を介した癌細胞の浸潤活性に必要であることが示唆された (図3)。また高浸潤性の乳癌細胞は、Caveolin-1 の発現依存的に浸潤突起を形成することが明らかになった (*Cancer Res.* 2009)。

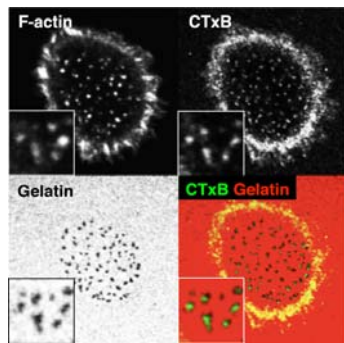


図2 浸潤突起における脂質ラフトの局在
脂質ラフトのマーカーであるコレラ毒 B サブユニット (CTxB) で細胞を染色すると、浸潤突起とゼラチン分解部位に強いシグナルが観察される。

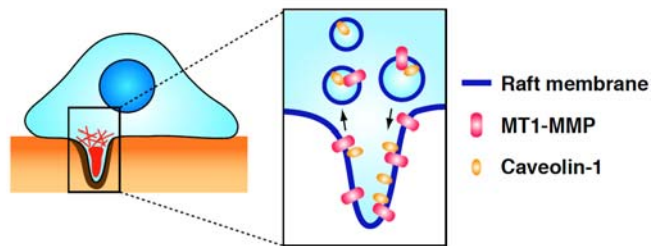


図3 浸潤突起形成における脂質ラフト及び Caveolin-1 の役割
脂質ラフトは浸潤突起形成に必要であり、浸潤突起にて細胞内に取り込まれ輸送される。脂質ラフト構成タンパク質である Caveolin-1 は、細胞外基質分解酵素 MT1-MMP の輸送や局在を制御し、浸潤突起を介した乳癌細胞の浸潤活性に関与すると考えられる。

2-2 イノシトールリン脂質代謝の機能解析

細胞膜構成脂質であるイノシトールリン脂質、ホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 [PI(4,5)P₂] 及びホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 [PI(3,4,5)P₃] は、標的タンパク質を介して多様な細胞機能を制御する。PI(4,5)P₂ と PI(3,4,5)P₃ の産生や代謝は、細胞外刺激に応じて活性化される数十種もの代謝酵素群により時空間的に厳密に制御されている。イノシトールリン脂質代謝酵素の活性異常は癌など様々な病変を引き起こすが、悪性癌の浸潤・転移における役割については未だ不明な部分が多い。そこで本研究ではこれらイノシトールリン脂質とその産生代謝酵素の浸潤突起形成における機能解析を行った。

まず PI(4,5)P₂ 及び PI(3,4,5)P₃ にそれぞれ特異的に結合するタンパク質ドメインの過剰発現により機能阻害を行ったところ、浸潤突起形成及び細胞外基質分解活性が顕著に抑制された。次にイノシトールリン脂質代謝酵素の浸潤突起形成における機能を解析した。PI(4,5)P₂ 産生は主に、タイプ I ホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ (PIP3K I) α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームにより触媒される。一方、PI(3,4,5)P₃ は主にクラスIホスファチジルイ

シトール-3-キナーゼ(PI3-キナーゼ)p110 α 、 β 、 γ 、 δ の4つのアイソフォームにより産生される。これら各アイソフォームに対するsiRNAをMDA-MB-231細胞に導入して発現抑制を行った結果、PIPK I α を発現抑制した細胞において浸潤突起によるゼラチン分解活性が抑制された(*Cancer Sci.* 2010)。PI3-キナーゼについては、p110 α の発現抑制により浸潤突起形成が阻害され、p110 α の選択的阻害剤を用いた場合にも同様の結果が得られた。またPIPK I α 及びp110 α の細胞内局在を検討した結果、これらの分子が浸潤突起に集積している様子が観察された。p110 α をコードするPIK3CA遺伝子については、乳癌の約27%で恒常的活性化変異が見つかっており、浸潤・転移性や予後悪化との相関が報告されている。そこでこれらの変異体を発現する細胞株を作製した結果、顕著に浸潤突起形成能が促進された。またPI(3,4,5)P₃の下流シグナル伝達系の解析から、PDK1とAktがエフェクターとして機能することを明らかにした(論文投稿中)。以上の結果から、イノシトールリン脂質代謝ネットワークが癌細胞の浸潤活性を担う浸潤突起形成を制御することが明らかになった(図4)。

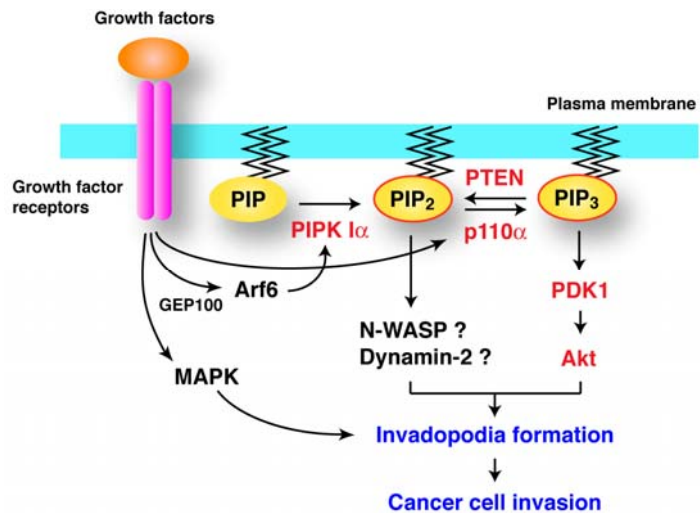


図4 浸潤突起形成におけるイノシトールリン脂質代謝の役割

2-3 アクチン細胞骨格制御タンパク質の機能解析

浸潤突起は、アクチン繊維を含む前駆体の形成、さらなるアクチン重合による安定化、マトリックスメタロプロテアーゼの集積による細胞外基質分解と突起伸長、というステップを経て形成される。本研究では米国グループとの共同研究により、この浸潤突起形成過程に関わる分子メカニズムを一部明らかにした(図5)。MenaはEna/VASPファミリータンパク質の1つで、細胞外からのシグナルに応じてアクチン細胞骨格を制御する。我々はMenaが浸潤突起の構成分子であり、転移癌に特異的に発現するMenaアイソフォームが浸潤突起の安定性と癌細胞の浸潤能を亢進し、動物モデルにおいて乳癌の転移を促進することを明らかにした(*Dev. Cell* 2008)。

乳癌の15%で遺伝子増幅と発現の亢進が見られるEMS1遺伝子は、癌遺伝子産物Srcチロシンキナーゼの基質であるCortactinをコードする。Cortactinはアクチン結合タンパク質であり、浸潤突起の構成分子であることが多数報告されているが、その詳細な機能は明らかになっていなかった。我々は、Cortactinのリン酸化が他のアクチン結合タンパク質との相互作用や活性調節のトリガーとなり、浸潤突起の成熟過程を制御することを明らかにした(*J. Cell Biol.* 2009)。

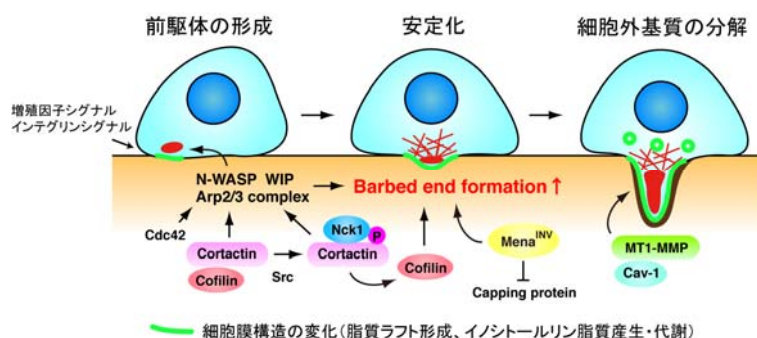


図5 浸潤突起形成のモデル

細胞増殖因子やインテグリンシグナルに応じた脂質ラフト形成やイノシトールリン脂質代謝により浸潤突起形成が誘導されると考えられる。形成された前駆体はさらなるアクチン細胞骨格構造の形成や細胞外基質分解酵素の集積を経て機能的に成熟していくと考えられる。

3. 今後の展開

本研究により、細胞膜ドメイン構造である脂質ラフトやイノシトールリン脂質代謝が転移性癌細胞の浸潤突起形成に関わることが明らかになった。これまで癌浸潤の分子機構については、細胞外基質分解酵素や細胞運動に関わるタンパク質の機能解析が主に行われてきた。本研究では細胞膜構成脂質のドメイン構造や代謝が癌細胞の浸潤活性に深く関与することを明らかにし、細胞膜脂質や関連分子が癌浸潤・転移治療の分子標的となる可能性を示した。また細胞膜脂質に関連する新規浸潤突起制御分子として Caveolin-1 や p110 α などを同定した。Caveolin-1 の発現亢進や p110 α の活性化変異は様々な癌の転移性及び予後悪性化と相関することが報告されているが、その詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。今後はこれらの分子について発現抑制を行った癌細胞株を樹立し、マウスモデルを用いた癌転移実験を行うことにより、転移治療の標的としての有用性を評価していく予定である。将来的には、浸潤突起形成の分子機構の解析で得られた知見を、癌浸潤・転移の分子機構の理解や新しい治療法の開発につなげていきたい。

4. 自己評価

本研究課題の目標は、浸潤突起形成における細胞膜脂質のドメイン構造や代謝の役割と関連分子の機能を明らかにすることであった。本研究では脂質ラフトやイノシトールリン脂質代謝が転移性癌細胞の浸潤突起形成に関わることを明らかにし、関連する新規浸潤突起制御分子もいくつか同定した。特に脂質ラフトが浸潤突起に局在しその機能を制御するという知見は、細胞膜脂質の構成が癌浸潤において重要な役割を果たしていることを示した点で興味深い。一方、生化学的手法を用いた浸潤突起構成分子の網羅的な解析や動物モデルを用いた個体レベルでの機能評価などは研究期間内に終えることができなかったため、今後も引き続き解析を行う予定である。

5. 研究総括の見解

がん浸潤に関与する浸潤突起形成のメカニズムに関し、脂質ラフト形成に必須のカベオリン1が関与すること、細胞外基質分解を行う MT1-MMP の機能発現(おそらく輸送)にカベオリンが必要であることを明らかにした。また、p110 α の PI3K 活性化による PIP3 生成が浸潤突起の形成に関わっていることを示し、突起形成に関わる分子を明らかにしたことは評価できる。今後、カベオリンや MT1-MMP と相互作用する脂質の同定や PIP3 の動態について研究を進展させ、がん転移治療法に繋がる成果が出ることを期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Philippar U, Roussos ET, Oser M, <u>Yamaguchi H</u> , Kim HD, Giampieri S, Wang Y, Goswami S, Wyckoff JB, Lauffenburger DA, Sahai E, Condeelis JS, and Gertler FB: A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. <i>Dev. Cell</i> 15: 813-828 (2008)
2. Oser M, <u>Yamaguchi H</u> , Mader CC, Arias M, DesMarais V, van Rhee J, Koleske AJ, and Condeelis J: Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. <i>J. Cell Biol.</i> 186: 571-587 (2009)
3. <u>Yamaguchi H*</u> , Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, and Fukami K: Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. <i>Cancer Res.</i> 69: 8594-8602 (2009) *Corresponding author
4. <u>Yamaguchi H*</u> , Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase I α are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. <i>Cancer Sci.</i> 101: 1632-1638 (2010) *Corresponding author
5. <u>Yamaguchi H*</u> and Oikawa T: Membrane lipids in invadopodia and podosomes: Key

	structures for cancer invasion and metastasis. <i>Oncotarget</i> 1: 320-328 (2010) *Corresponding author

(2)特許出願

なし

(3)その他

学会発表

1. 山口英樹、深見希代子: 浸潤突起形成におけるイノシトールリン脂質の役割 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム(神戸)(2008年12月12日)
2. 山口英樹、竹尾由希子、吉田周平、河内全、中村由和、深見希代子: 浸潤突起形成における脂質ラフトとカベオリンの役割 第61回日本細胞生物学会ワークショップ(名古屋)(2009年6月2日)
3. 山口英樹、吉田周平、室井絵美、川村将洋、中村由和、河内全、堺隆一、深見希代子: PI3 キナーゼシグナルはヒト乳癌細胞による浸潤突起形成を制御する 第62回日本細胞生物学会大会ワークショップ(大阪)(2010年5月20日)
4. 山口英樹: 癌細胞による浸潤突起形成の分子機構 大阪大学大学院基礎工学研究科数理医学研究会招待講演(大阪)(2010年9月17日)
5. 山口英樹、堺隆一、深見希代子: 乳癌細胞の浸潤突起形成における PI3-kinase シグナル伝達経路の役割 第69回日本癌学会学術集会(大阪)(2010年9月22日)