

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840030

研究課題名(和文)メカノシグナル依存的な細胞の形質転換におけるFarp1の機能解明

研究課題名(英文)The role of Farp1 in mechannosignal-dependent cell transformation

研究代表者

梶 紀子(Kaji, Noriko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：20444002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリクス(ECM)は細胞・組織の支持体として働くだけでなく、その硬さ依存的な力学的シグナルは細胞の増殖・分化の制御や癌の悪性化にも関与する。本研究において、ECMの硬さ依存的な細胞の形質転換に関与するRho-GEFとしてFarp1を同定し、Farp1がインテグリンシグナルの下流でアクチン骨格の再構築を調節することにより、細胞接着と細胞移動に役割を果たすことを明らかにした。

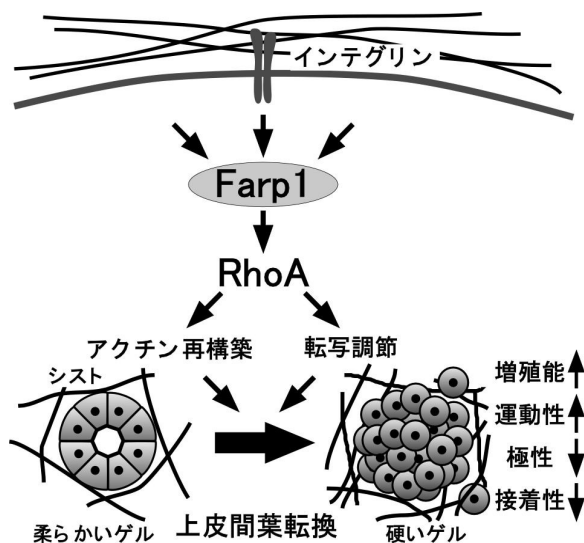
研究成果の概要(英文)：Extracellular matrix (ECM) not only functions as a support of tissue and cells, but also transfers extracellular signals such as ECM stiffness, and is involved in the regulation of proliferation, differentiation, and cancer progression. In this study, we identified Farp1, as a Rho-GEF involved in ECM stiffness-induced cell transformation, and revealed that Farp1 plays roles in cell adhesion and migration through the regulation of actin cytoskeleton in integrin signaling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞外マトリクス Rho-GEF インテグリン

1. 研究開始当初の背景

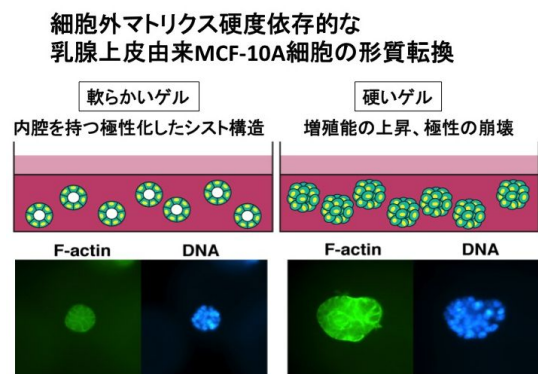
細胞は細胞外からの機械的・力学的刺激に
 応答して、形態、極性、増殖・分化能を変化
 させる。細胞外マトリクス(ECM)は細胞・組
 織の支持体として機能するだけでなく、イン
 テグリンなどを介して細胞内に力学的シグ
 ナルを送達し、細胞の増殖・分化、運動能、
 細胞死などを制御している。近年、ECM の
 硬度変化が細胞に対する力学的シグナルと
 して機能することが示され、注目を集めてい
 る。例えば、ヒト乳腺上皮由来 MCF10A 細
 胞は、通常の硬さの ECM 内で3次元培養す
 ると、頂底極性と内腔をもつシストを形成す
 るが、正常組織より硬い ECM 内では上皮-
 間葉転換(EMT)と類似した形質転換を引き
 起こして、増殖能・運動能が亢進し、頂底極
 性をもたない脱秩序化した細胞塊が形成さ
 れる。また、乳癌組織が正常組織に比べて硬
 いことや、乳房組織の硬化が腫瘍形成や転移
 能の上昇に相関することも知られており、
 ECM の硬さ依存性な形質転換は、癌の悪性
 化という観点からも重要である。このよう
 に力学的刺激による細胞応答は組織の形成・維
 持に重要な役割を担っているが、力学的シグ
 ナルがいかんして化学的シグナルに変換さ
 れるのか、その受容・伝達機構(メカノトラ
 ンスダクション機構)については未だ多くの
 点が不明である。



力学的刺激による細胞応答において、Rho
 ファミリーの活性化とその下流で起こるア
 クチン骨格の再編成や転写調節が重要な役
 割を担っている。しかし、力学的刺激による
 Rho ファミリーの活性化機構は未だ不明で
 ある。私達は、力学的刺激による Rho ファ
 ミリーの活性化機構を解明するため、Rho ファ
 ミリーの活性化因子(GDP-GTP 交換因子)
 である RhoGEF 69 種類に対する shRNA ラ
 イブラリーを作製し、RhoGEF の網羅的な発
 現抑制スクリーニングを行った。その結果、
 ECMの硬さ依存性なMCF10A細胞の形質転
 換に必要な Rho-GEF として Farp1 (CDEP)
 を同定した。

2. 研究の目的

細胞外マトリクス(ECM)は細胞・組織の支
 持体として働くだけでなく、その硬さに依存
 した機械的シグナルは細胞の増殖・分化の制
 御や癌の悪性化にも関わっている。乳腺上皮
 由来 MCF10A 細胞を正常組織と同程度の硬
 さの ECM 内で3次元培養すると内腔を持つ
 シスト(嚢胞)を形成するが、より硬い ECM
 内で培養すると上皮-間葉転換様の形質転換
 が起こり、細胞増殖能が亢進し、頂底極性
 が崩壊した無秩序な細胞塊が形成される。



MCF-10A細胞を硬度の異なる細胞外マトリクス中で培養すると、軟
 らかいECM中では極性化したシスト構造を、硬いECM中では極性の
 崩壊した細胞塊を形成する。

私達は最近、ECM の硬さ依存性な
 MCF10A 細胞の形質転換に関与する
 RhoGEF を網羅的に探索し、Farp1(CDEP)

を同定した。本研究では、ECM の硬さ依存
的な形質転換における Farp1 の活性化機構
と機能を解明し、力学的刺激が3次元培養下
の上皮細胞の増殖能や極性を変化させ、形質
転換を誘導する分子機構を解明することを
目的とする。

3 . 研究の方法

硬度の異なる ECM を用いて正常乳腺上皮
細胞の3次元培養をおこない、ECM 硬度依
存的な形質転換の解析をおこなった。プロテ
オミクス解析や免疫沈降法により Farp1 の
結合蛋白質とその結合部位を同定し、細胞内
局在およびアクチン細胞骨格、細胞形態への
影響を調べることにより、結合の意義を検討
した。Farp1 による細胞の形質転換機構を解
析するため、細胞移動、細胞接着、上皮形態
形成における Farp1 の役割を Farp1 の過剰
発現や発現抑制により検討した。

4 . 研究成果

(1) ECM 硬度依存的な形質転換における Farp1 の役割

硬度の異なるコラーゲンゲルで MCF10A 細
胞を3次元培養したところ、1mg/ml のコラー
ゲン濃度の軟らかいゲルで培養したコント
ロール細胞は内腔を持つ極性化したシスト
構造を形成したが、3mg/ml のコラーゲン濃度
の硬いゲルでは内腔を持たない大きな細胞
塊を形成した。Farp1 を発現抑制した細胞で
は、硬いゲルで培養した場合でもシストの大
きさの増加が抑制され、内腔をもつシストを
形成した。軟らかいゲルで培養した場合には
シストの大きさには影響は見られなかった
ことから、Farp1 は ECM の硬さ依存的な細胞
増殖能の上昇と極性の崩壊に必要なが、正常
な細胞増殖には関与しない可能性が示唆さ
れた。

(2) Farp1 の活性化機構

ECM は細胞膜表面の受容体であるインテグ

リンにより認識され細胞内へそのシグナル
が伝達される。Farp1 がインテグリンと相互
作用するかどうかを免疫沈降法を用いて解
析したところ、Farp1 はインテグリンと共沈
ことが明らかとなった。また、Farp1 のドメ
イン欠失変異体を用いた結合実験により、N
末端の FERM ドメインを介してインテグリン
と結合することを明らかにした。インテグリン
との結合が Farp1 に及ぼす影響を調べるた
め、HeLa 細胞に Farp1 とインテグリンを共発
現させ細胞内局在を解析すると、インテグリン
の共発現により Farp1 の細胞膜への局在が
促進されることが明らかとなった。また、イン
テグリンと Farp1 の共発現により細胞が大き
く広がった形態をとり、アクチン骨格の再
構築が誘導されたことから、Farp1 へのイン
テグリンの結合は Farp1 の細胞膜局在を促進
し、Farp1 の活性化を引き起こす可能性が示
唆された。

(3) 細胞移動、接着、上皮形態形成における Farp1 の役割

Farp1 による細胞の形質転換機構を解析す
るため、細胞移動、細胞接着、上皮形態形成
における Farp1 の役割を検討した。Farp1 を
HeLa 細胞に過剰発現させると ECM 上への
細胞接着が促進され、Farp1 を発現抑制する
と細胞接着が抑制された。さらに ECM が誘
導する細胞増殖が Farp1 の発現抑制により
阻害された。また、MCF10A 細胞を用いた
wound healing assay により、Farp1 が細胞
移動に必要なことが明らかとなった。さら
に、MCF10A 細胞の ECM 中での3次元培
養を用いて上皮形態形成における Farp1 の
役割を検討した結果、MCF10A 細胞の乳腺分
岐構造の形成に Farp1 が関与することが明
らかとなった。

以上の結果から、Farp1 はインテグリンと
相互作用し、ECM が制御する細胞増殖、細
胞接着、細胞移動において役割を果たす可
能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

梶 紀子、萱場 敦子、高橋 将太、大橋 一正、水野 健

Farp1 is involved in epithelial morphogenesis by stimulating Rho GTPase activity

第 37 回分子生物学会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

梶 紀子、萱場 敦子、高橋 将太、大橋 一正、水野 健作

Farp1 is involved in integrin-mediated cell adhesion and signaling by regulating Rho GTPase activity

第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11 日奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

梶 紀子、高橋 将太、萱場 敦子、大橋 一正、水野 健作

Farp1 is involved in ECM stiffness-induced transformation of mammary epithelial cells

第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 20 日ウインク愛知 (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/itoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 紀子 (KAJI, Noriko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

研究者番号: 20444002

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし