

平成30年6月26日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18417

研究課題名(和文) 乳癌の浸潤を制御する新規シグナル経路の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of adhesion-GPCRs involved in breast cancer cell invasion

研究代表者

梶 紀子 (Noriko, Kaji)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞は原発巣で増殖するのみでなく、細胞外マトリクスである基底膜への接着と分解、細胞移動により浸潤・転移する。G蛋白質共役型受容体のAdhesion-GPCRファミリーは細胞-基質間接着や細胞-細胞間接着に関与すると考えられているが、その機能は不明である。私はヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231をECM内で培養する3次元培養において、Adhesion-GPCRの網羅的スクリーニングを行ないLPHN2、GPR56、GPR64、GPR115を得た。これらのAdhesion-GPCRの乳癌細胞の浸潤における機能解析を行ない、細胞増殖、細胞移動、細胞接着、ECM分解などを制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumor cells not only proliferate at the primary site but also metastasize to other organs by cell adhesion to extracellular matrix (ECM), degradation of ECM, and cell migration. Adhesion-GPCRs are subfamily of G-protein coupled receptor (GPCR) and thought to be involved in cell-ECM adhesion or cell-cell adhesion, but the function of adhesion-GPCRs are largely unknown. In this study, I performed a screening of adhesion-GPCRs for breast cancer cell invasion using 3D culture of MDA-MB-231 breast cancer cell line, and obtained LPHN2, GPR56, GPR64, GPR115. I examined the role of these adhesion-GPCRs in breast cancer cell invasion, and found that these adhesion-GPCRs regulate cell proliferation, migration, and cell adhesion.

研究分野：分子生物学

キーワード：浸潤 細胞外マトリクス Adhesion-GPCR

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は原発巣で無秩序に増殖するのみでなく、他の組織へと浸潤・転移していくことで癌が悪化する。乳癌の浸潤は、乳癌細胞が細胞外マトリクス (Extracellular Matrix: ECM) から成る基底膜に接着し、ECM を分解しながら間質層に細胞が入り込むことで進行する。ECM は細胞の周りや細胞と細胞の間に存在し細胞や組織を支える物理的支持体として働くのみでなく、細胞膜表面に存在する受容体を介して細胞内にそのシグナルを伝えることにより細胞の増殖、分化、接着、移動、極性、細胞骨格の再構築など様々な細胞機能を制御している。近年、ECMの組成や硬度が癌の悪性化と密接に関連することが報告されつつあるが、その分子機構については不明な点が多い。7回膜貫通型のG蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)のサブファミリーの1つである Adhesion-GPCR ファミリーは、長い細胞外ドメインを持つことを特徴とし、ヒトでは33種類存在する。Adhesion-GPCR の細胞外ドメインには蛋白質間の相互作用に関わるドメインが多く含まれることから、細胞-基質間接着や細胞間接着に関与すると考えられており、実際に Adhesion-GPCR に属する GPR56 や GPR126 は ECM の主要分子であるコラーゲンを認識することが報告されている。また、いくつかの Adhesion-GPCR は癌細胞で高発現することが報告されているが、大部分の Adhesion-GPCR はその機能が未解明であった。

2. 研究の目的

私は最近、高転移能を持つヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231をECM内で培養する3次元培養系において、軟らかいECMで培養すると球状の細胞塊が形成されるが、硬いECMでは細胞塊から細胞が離脱し周囲のECMへの浸潤が起

こることを見出した。これまでに硬い ECM での3次元培養を用いて乳癌細胞の浸潤を制御する Adhesion-GPCR のスクリーニングを行ない、4つの候補分子を得た。本研究では、ECM シグナルによる乳癌細胞の浸潤に関する Adhesion-GPCR の作用機序を明らかにすることで、乳癌の浸潤・転移を制御する新たな分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Adhesion-GPCR の網羅的スクリーニングにより得られた4つの候補分子について、以下の機能解析を行なうことにより、乳癌細胞の浸潤の分子機構の新規解明を目指した。

(1) 3次元培養

MDA-MB-231細胞をコラーゲンを含むゲル中で1週間培養し、ECMへの浸潤過程を観察した。YFP-H2Bにより核を可視化した生細胞でのタイムラプス解析により、個々の細胞の動きを解析した。またアクチン細胞骨格や核等の染色を行ない、浸潤時のアクチン構造の解析を行なった。

(2) 乳癌細胞の浸潤における Adhesion-GPCRsの機能解析

スクリーニングにより得られた4つの Adhesion-GPCRs について、正常乳腺由来細胞株 MCF-10A、乳癌細胞株の MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453細胞における発現量をqPCRにより検討した。

また、これらの Adhesion-GPCRsの浸潤における役割を解析するため、MTTアッセイ、Wound healingアッセイ、Spreadingアッセイ、ゼラチン分解アッセイなどを行ない、細胞増殖、細胞移動、細胞-基質間接着、ECM分解活性を評価した。

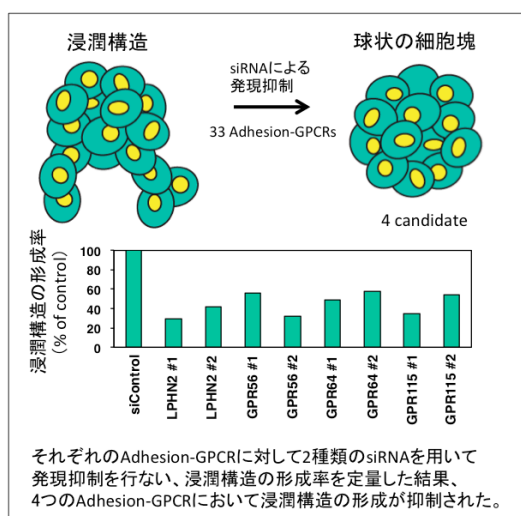
(3) 機能性抗体を用いた解析

GPR56の細胞外ドメインに対する機能性モノクローナル抗体を用いて、MDA-MB-231細胞の浸潤におけるGPR56の機能解析を行った。

4. 研究成果

siRNAを用いた発現抑制による、乳癌細胞の浸潤に関するAdhesion-GPCRの網羅的スクリーニングにより、LPHN2、GPR56、GPR64、GPR115の4分子を得た。これらの4分子の発現抑制により、硬いECM中での浸潤がコントロール細胞と比較して減少していることを明らかにした(図1)。またこれらの4分子の発現量をqPCRにより検討した結果、いずれの分子も発現量が減少していることを確認した。

図1 3次元培養を用いた乳癌細胞の浸潤に関するAdhesion-GPCRのスクリーニング



(1) 浸潤過程の解析

MDA-MB-231細胞を硬いECM中で培養し、乳癌細胞の浸潤過程を生細胞及び固定細胞で観察したところ、浸潤する細胞集団の先端の細胞が、アクチン繊維を豊富に含む突起を伸ばしながらECM中を浸潤していくことが明らかとなった。一方、LPHN2、GPR56、GPR64、GPR115を発現抑制した細胞ではこのような

細胞の突起形成が起こらず、浸潤が抑制されることを明らかにした。これらの結果からLPHN2、GPR56、GPR64、GPR115がアクチン骨格を制御し、浸潤に関与する可能性が示唆された。

(2) 乳癌細胞株における発現量の検討

正常乳腺由来細胞株MCF-10Aと乳癌細胞株 MCF-7、MDA-MB-231細胞でLPHN2、GPR56、GPR64、GPR115の発現量をqPCRにより比較した。この結果、LPHN2とGPR56は乳癌細胞株において顕著な発現量の増加が観察されたが、GPR64とGPR115については正常細胞株と乳癌細胞株において発現量の大きな変化は見られなかった。一方、2次元培養と3次元培養とで発現量を比較した結果、LPHN2、GPR56、GPR64は大きな違いが見られなかった。しかし、GPR115については3次元培養下で発現量の増加が観察されたことからECMによりGPR115の発現量が制御されている可能性が示唆された。

(3) 乳癌細胞の浸潤におけるAdhesion-GPCRsの機能解析

LPHN2、GPR56、GPR64、GPR115について、siRNAを用いて発現抑制を行ない、細胞増殖、細胞移動、細胞接着に対する影響を検討した結果、いずれの分子の発現抑制においても、細胞増殖、細胞移動、ECMへの接着が抑制された。

一方で、LPHN2、GPR56、GPR64、GPR115について、siRNAを用いて発現抑制を行ない、ECMの分解活性を評価したところ、LPHN2とGPR115の発現抑制によりECM分解活性が減少したが、GPR56とGPR64ではコントロール細胞と有意な差は見られなかった。

以上の結果から、LPHN2、GPR56、GPR64、GPR115が細胞増殖、細胞移動、細胞接着を、

LPHN2とGPR115がECMの分解を制御することが明らかとなった。

(4) 機能性抗体を用いた解析

GPR56に対してアゴニスト様に働くモノクローナル抗体を用いて、乳癌細胞の浸潤におけるGPR56の役割を解析した。抗GPR56抗体を添加して3次元培養を行なうと、コントロール細胞に比較して、より長く枝分かれした細胞塊が形成され、浸潤が促進される様子が観察された。このことからGPR56の活性化は乳癌細胞の浸潤を促進する可能性が示唆された。

本研究により、LPHN2、GPR56、GPR64、GPR115が乳癌細胞の浸潤を制御する新規分子として同定された。これらのAdhesion-GPCRが細胞増殖、細胞移動、細胞接着、ECM分解などを制御することにより乳癌細胞の浸潤を制御する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 0 件)

[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

梶 紀子 (Noriko Kaji)
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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()