

博士論文

上皮細胞の形態制御機構と疾患発症への関与の解析

梶保 祐子

目次	2
略語	3-4
博士論文の要旨	5
I 章 序論-上皮細胞の形態変化と疾患-	6-7
II 章 ポドサイトの形態変化を伴うネフローゼ症候群における スリット膜構成因子 SIRP α の研究	8
II-I 序文-ネフローゼ症候群におけるポドサイトの形態変化 および新規スリット膜分子 SIRP α -	9-14
II-II 実験材料および実験方法	15-20
II-III 結果	21-35
II-IV 考察	36-42
III 章 浸潤性乳がんに関与する Rab ファミリーのスクリーニング	43
III-I 序文-がんの浸潤と Rab ファミリー-	44-50
III-II 実験材料および実験方法	51-60
III-III 結果	61-87
III-IV 考察	88-94
IV 章 考察-二つの研究を通して-	95-96
引用文献	97-106
謝辞	107-108

略語

aPKC ; atypical protein kinase C

Arp ; actin related protein

CD2AP ; CD2-associated protein

CNS ; congenital nephrotic syndrome

DOX ; doxycycline

EGF ; epidermal growth factor

EMT ; epithelial-mesenchymal transition

ERGIC ; ER-golgi intermediate compartment

GAP ; GTPase-activating protein

GEF ; guanine-nucleotide exchange factor

GLEPP ; glomerular epithelial protein

GRASP55 ; Golgi reassembly stacking protein of 55 kDa

HGF ; hepatocyte growth factor

HOPS ; homotypic fusion and vacuole protein sorting

IP : immunoprecipitation

ITIM ; immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

MT1-MMP ; membrane type 1-matrix metalloproteinase 1

NC ; negative control

N-WASP ; neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein

PAN ; puromycin aminonucleoside

PS ; protamine sulfate

SFK ; Src family kinase

SHP ; SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase

shRNA ; short hairpin RNA

SIRP ; signal regulatory protein

TRPC ; transient receptor potential cation channel

VPS ; vacuolar protein sorting

WT ; Wilms tumor

博士論文の要旨

上皮細胞の正常形態からの逸脱は疾患の発症と密接な関連を持つ。本研究において腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）でスリット膜分子 **SIRP α** が **Nephrin** と複合体を形成し、ポドサイトの足突起の癒合を伴い蛋白尿を呈す病態で **SIRP α** 自身のリン酸化を減弱することを見出した。また、がん化した上皮細胞が浸潤する際にも形態変化が必要であり、乳がん細胞における浸潤能を指標とし低分子量 G タンパク質 **Rab** ファミリーのスクリーニングを行い、**Rab2A** を浸潤に重要な因子として同定し、三次元環境での浸潤に必須かつ下流因子の浸潤への関与を示した。以上より、上皮細胞の形態変化を通じ多様な因子が病態に関与することが示された。

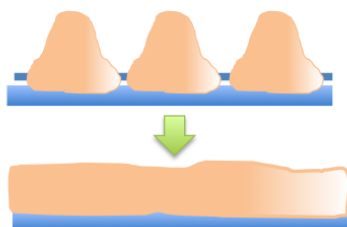
I 章. 序論 -上皮細胞の形態変化と疾患-

上皮は密に接着した上皮細胞が形成したシート状の構造である[1]。細胞外組織を含む基底膜上に接着し、主な機能として選択的透過性、吸収、分泌、物質の輸送、防御や感覚受容などを担い、生体の恒常性を保つのに必須である。上皮細胞は、細胞骨格に支持されることによって固有の形態を保持しているが、種々の刺激や環境変化によって細胞骨格を再編し形態を変化させる[2]。この細胞骨格の再編は正常の細胞においても発達段階や細胞辺縁などで観察されるが[2]、蛋白尿、がん、線維症など種々の病態においては特殊な形態が観察され[3-5]、上皮細胞の正常な形態からの逸脱は疾患の発症と関連を持つと推測される。しかし現時点では疾患につながる上皮細胞の形態制御機構には依然不明な点が多い。この形態制御機構を解明するためには、病態によって細胞の種類や変化させた形態が大きく異なることから、個々の病態に応じた解析が必要と考えられる。

本研究では、図 1 に示す様に上皮細胞の形態変化が特徴的な病態として、II 章では腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の形態が変化し足突起の癒合を呈するネフローゼ症候群、そしてIII章では細胞外基質に浸潤する際に上皮細胞の形態を変化させる浸潤性の乳がんの 2 つに焦点をあて、それらの形態制御に関与する機構について研究を行っ

た。

II章 腎臓糸球体上皮細胞(ポドサイト) ネフローゼ症候群



III章 乳がん細胞 浸潤性乳がん

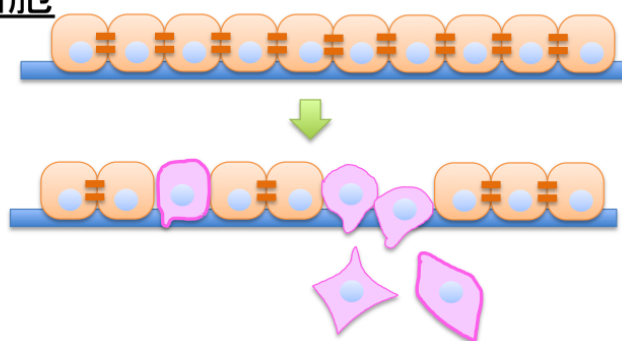


図 1. 本研究で取り上げた 2 疾患の上皮細胞の形態変化の模式図

Ⅱ章

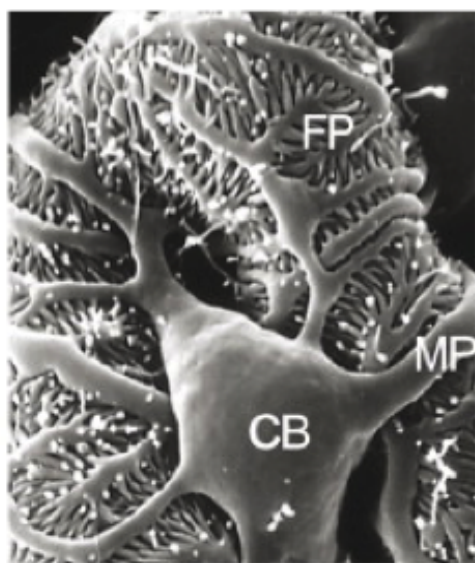
ポドサイトの形態変化を伴うネフローゼ症候群における

スリット膜構成因子 SIRP α の研究

Ⅱ・Ⅰ．序論

－ネフローゼ症候群におけるポドサイトの形態変化および

新規スリット膜分子 SIRP α －



腎臓の糸球体における臓側上皮細胞であるポドサイトは、細胞体と細胞体から伸びた太い一次突起、および一次突起から伸びた細かい足突起から成る特徴的な形態を呈する。各足突起は隣接するポドサイトの足突起と組み合わせる（図 2-1、[6]より一部改変）、その間に細胞間接着装置であるスリット膜が存在する（図 2-2A、[7]より一部改変）。大量の蛋白

図 2-1. ポドサイトの電子顕微鏡写真

CB；細胞体、MP；一次突起、FP；足突起

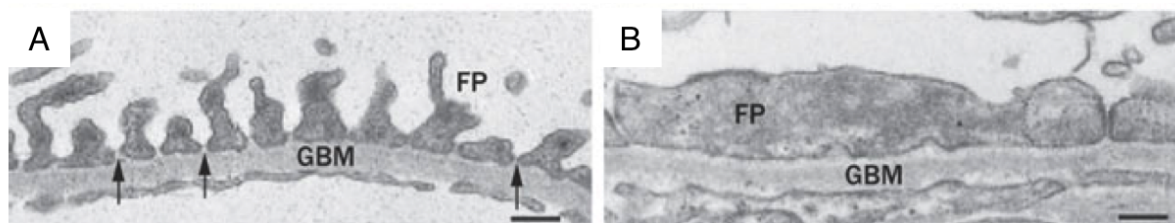


図 2-2. 正常症例の腎臓（A）とネフローゼ症候群を呈した症例の腎臓（B）の電子顕微鏡写真

スリット膜を矢印で示した。B では足突起が癒合しスリット膜が消失している。

Scale bar; 20 nm FP；足突起、GBM；糸球体基底膜

尿を呈するネフローゼ症候群の原因として小児で最も多い微小変化型ネフローゼ症候群や、巣状糸球体硬化症や先天性ネフローゼ症候群など[8, 9]では、腎糸球体を電子顕微鏡で観察すると、ポドサイトの形態が平坦化し足突起が癒合（foot process effacement）し、スリット膜が消失している特徴的な所見が観察される（図 2-2B、[7]より一部改変）。微小変化型のような可逆性の病変では、ステロイド剤の投与により蛋白尿が消失した場合には、足突起の癒合は改善傾向に転じスリット膜が再び出現する[10, 11]。ここから、ポドサイトの形態変化は、ネフローゼ症候群における蛋白尿と密接な関連を持つと考え、焦点をあてることとした。

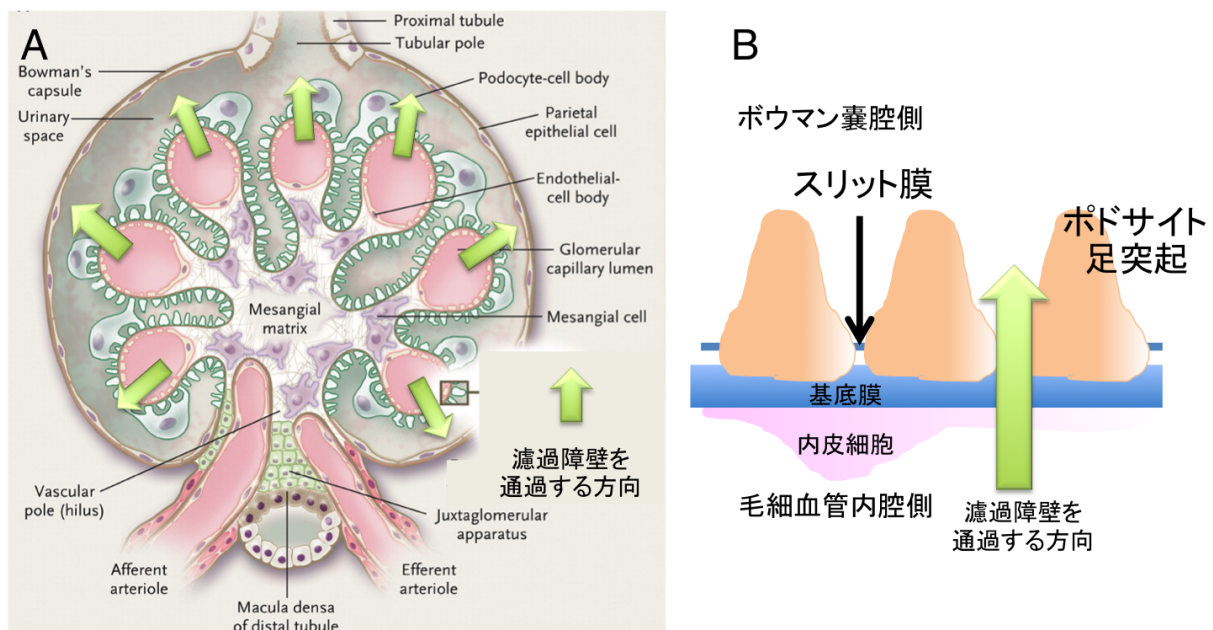


図 2-3. 糸球体の構造の模式図

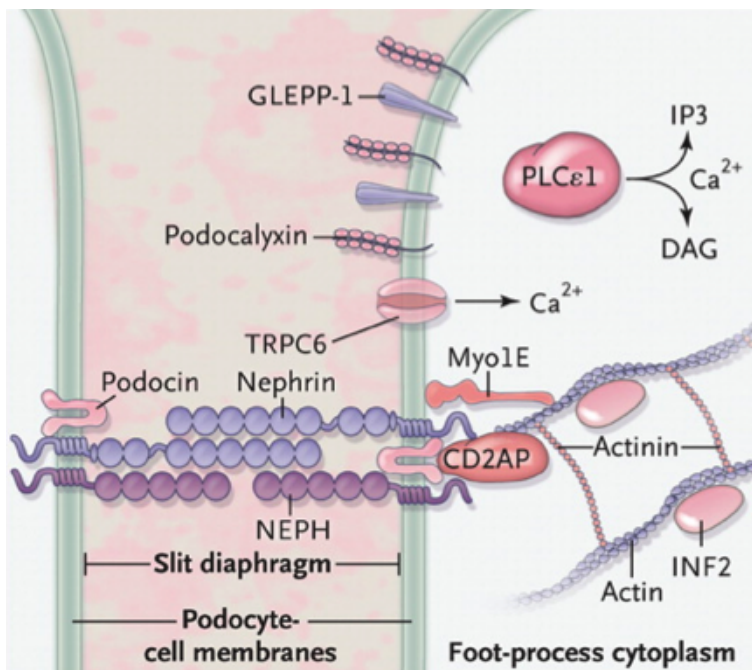
A. 糸球体の模式図、B. 濾過障壁を形成する三層の細胞の模式図

AB 両図において尿の生成に際し濾過障壁を通過する方向を緑の矢印で示した。

尿は生成される際に腎臓において糸球体濾過を受けるが（図 2-3A、[12]より一部改

変)、これは血液中のタンパク質を血中に保持しつつ血液を選択的に濾過できるシステムであり、有孔内皮細胞、糸球体基底膜、ポドサイトの3層により濾過障壁が形成されている(図2-3B)。そのため、ネフローゼ症候群において尿中に漏出した大量のタンパク質は、糸球体の濾過障壁が破綻していることを意味する。

濾過障壁の破綻の原因については、先天性ネフローゼ症候群や家族性巣状糸球体硬化症の遺伝子解析を契機として、ポドサイトが大きな役割を果たす可能性があると考えられるようになった[5]。1998年にフィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子である *NPHS1* が最初に報告され[13]、それがコードする *Nephrin* はポドサイト間の接着装置であるスリット膜に局在していた[14]。*Nephrin* のノックアウトマウ



スはスリット膜の形成が確認されず、重症の蛋白尿を呈し早期致死に至る[15]。その後蛋白尿の発症に関連すると報告された膜タンパク質である *Neph1*[16]、*Podocin*[17]や *CD2-associated protein (CD2AP)* [18]も、スリット膜に局在し *Nephrin* と複合

図2-4. スリット膜および周辺の分子の模式図

体を形成する。その他、ポドサイトにおいてスリット膜以外の部位においても、Wilms tumor (WT) -1[19]、podocalyxin[20]や glomerular epithelial protein (GLEPP) -1[21]などの多数のタンパク質が蛋白尿に関連する[10, 12]と報告されている(図 2-4、[12]を一部改変)。

ポドサイトの足突起の形態は、主にアクチン線維によって維持されている[6]。そのため足突起の癒合にはポドサイトのアクチン骨格の再編が必要となる。先天性ネフローゼ症候群の原因蛋白である **Nephrin** はスリット膜に存在し、その細胞内領域は **Src** ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) の **Fyn** によってチロシンリン酸化を受け、発達段階や蛋白尿を呈する動物モデルのポドサイトにおいては **Nephrin** がチロシンリン酸化を受けていることが報告されている[22, 23]。チロシンリン酸化された **Nephrin** はアダプター蛋白 **Nck** と結合し、糸球体ポドサイトのアクチン細胞骨格を変化させる[23, 24]。また、別のスリット膜構成因子である **Neph1** は、**Fyn** でチロシンリン酸化され **Grb2** をリクルートし、これは細胞膜上でアクチンの重合化を誘導するのに必要である[25, 26]。また、家族性巣状糸球体硬化症の原因蛋白の一つと報告された **TRPC6** は、 Ca^{2+} チャネルとしてスリット膜に存在し、チロシンリン酸化により活性を増加し、**Nephrin** との結合で負の制御を受ける[27]。また、チロシンキナーゼ **Fyn** の欠損マウスは蛋白尿を呈し足突起の癒合が見られる[22, 28]。このように、

スリット膜は構成因子がチロシンリン酸化を受けることで、シグナル伝達のプラットフォームとして機能し、さらにそのシグナル伝達を通じてポドサイトの形態制御に関与していることが示唆される。

近年、チロシンリン酸化を受けうる SIRP(signal regulatory protein) α (CD172a、Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate (SHPS)-1) と呼ばれる) がポドサイトのスリット膜に局在していることが報告された[29]。

SIRP α は樹状細胞、マクロファージや好中球に高い発現が報告されている一回膜貫通型のタンパク質であり、細胞外に 3 個の免疫グロブリン様構造を有することから免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。インテグリンと相互作用を持つ分子として同定された膜貫通型タンパク質の CD47 は SIRP α のリガンドであり、SIRP α の細胞外部分に結合する。この相互作用は細胞内に負のシグナルを伝達し、特に、マクロファージによる貪食作用を抑制する作用があることから “don't-eat-me” シグナルとして知られる[30-32]。SIRP α の細胞内領域は 4 つのチロシン基が存在し、免疫受容体チロシン抑制モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif: ITIM) を形成している[32, 33]。ITIM は CD47 の結合などによる刺激でチロシンリン酸化を受け、その際細胞内の脱リン酸化酵素である SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase(SHP)-1 や SHP-2 をリクルートし活性化する[32, 33]。この結

果、様々な基質を脱リン酸化し下流のシグナル伝達を概ね抑制的に制御している[32]

(図 2-5、[32]を一部改変)。

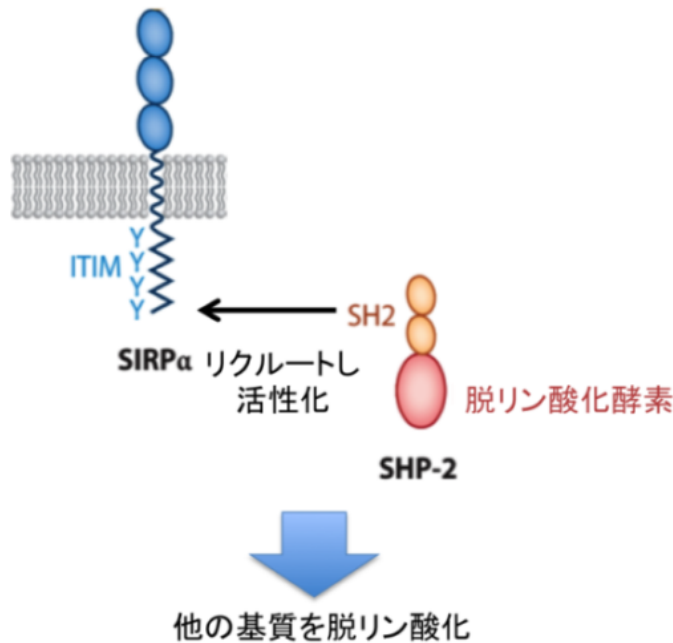


図 2-5. 免疫細胞における SIRP α によるシグナル伝達の模式図

SIRP α は ITIM 部位のチロシンリン酸化により、脱リン酸化酵素をリクルートし活性化することで他の基質を脱リン酸化する。

腎糸球体においては、CD47 はメサンギウム細胞に発現しているが[29]、ポドサイトとメサンギウム細胞は基底膜を挟んで離れている。そのためスリット膜における SIRP α は、他の細胞で研究されてきた CD47 との関連以外に、独自の役割を担っている可能性があると考えた。そこで、SIRP α はチロシンリン酸化を介してスリット膜において形態制御および蛋白尿に関わるシグナル伝達に関与しているという仮説を立て、研究を開始した。

II-II 実験材料および実験方法

試薬と抗体

抗 FLAG 抗体(M2; Sigma、St.Louis、MO)、抗 HA 抗体(3F10; Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)、抗 c-Myc 抗体 (sc-40; Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)、抗リン酸化チロシン抗体(4G10; Upstate、Lake Placid、NY)、ウサギ抗 SIRP α 抗体 (Upstate、Lake Placid、NY)、マウス抗 SIRP α 抗体 (Santa Cruz)、抗 ZO-1 抗体 (33-9100; Invitrogen、Carlsbad、CA)、抗 GLEPP-1 抗体 (MU336-UC; BioGenex、San Ramon、CA)、抗 WT1 抗体 (M3561; Dako、Carpinteria、CA)、抗 podocalyxin 抗体 (MAB430; Millipore、Bedford、MA) は購入した。ウサギ抗リン酸化 SIRP α 抗体 (α -pY501) は、抗原として CPSFSEpYASVQVQ (最初のシステインは SIRP α の配列ではない) の配列からなる合成ペプチドを keyhole limpet hemocyanin (Pierce、Rockford、IL) と結合させ、それをウサギに投与し得られた抗血清を、抗原ペプチドが結合した Sulfolink gel (Pierce) に通しアフィニティー精製し、非リン酸化ペプチド CPSFSEYASVQVQ を用いて吸収し作製した。ウサギ抗 podocin 抗体は KPVEPLNPKKKDSPML を抗原として作製した。

細胞培養および細胞への遺伝子導入

Human embryonic kidney HEK293T 細胞は ATCC (Manassas, VA) より購入し、10 %FBS (fetal bovine serum) を添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を用いて 5 %CO₂ 存在下 37 °C で培養、継代維持した。トランスフェクションは Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いてリポフェクション法にて行った。

発現ベクターの構築

ラット Nephin、Nephin-FLAG、Y1204F Nephin、ラット Neph1-FLAG は張田豊博士より提供して頂いた[26, 34]。活性型 Fyn 発現ベクターとマウス TRPC6-HA はそれぞれ東京大学医科学研究所癌細胞シグナル分野 手塚徹博士、理化学研究所脳科学研究センター 久恒智博博士の御厚意により提供頂いた。

5'-CGCGAATTCCCGCCATGGAGCCCGCCGGCCCGGC-3'、

5'-CCGGTCGACCTTCCTCTGGACTTGGACACTGGC-3'、

5'-CCCCTCGAGTAAGCTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC-3'、

5'-AAGGGTACCTTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGA-3'

をプライマーとし、ラット SIRP α と podocin を PCR 法にて増幅し、pCMV-Tag4A ベクター (Stratagene, Cedar Creek, TX) に挿入した。SIRP α 変異 (Y436F、Y460F、

Y477F、Y501F) は標準 PCR 法を用いて作製した。作製したプラスミドはシーケンス解析を行い配列の確認を行った。

ウエスタンブロット

等量のタンパク質を含むように調整した各試料を SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)にて分離した。泳動、展開した蛋白質を PVDF 膜 (Polyvinylidene difluoride; Immobilon Transfer Membranes, Millipore) にセミドライ式で転写した。蛋白質を転写した PVDF 膜はブロッキング液 (3 %BSA/ 0.05 % Tween20/ TBS) 内にて 1 時間室温で振盪した。1 次抗体は 1/2000、2 次抗体は 1/10000 で使用した。

免疫沈降

細胞は IP Buffer (20 mM Tris/HCl pH7.5、150 mM NaCl、1 % NP-40、1 mM phenylsulfonyl fluoride、10 mg/mL antipain、10 mg/mL leupeptin、100 U/mL aprotinin、50 mM NaF、1 mM EDTA、1 mM orthovanadate) を用いて、氷上で 15 分溶解し遠心分離した。得られた上清は ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma, St. Louis, MO)と 4 °Cで 1 時間振盪させ、その後ビーズを IP buffer で 3 回洗浄し、

100 mM glycine-HCl (pH2.6) で結合蛋白を溶出した。

組織染色

正常ラットから摘出した腎臓を n-ヘキサン中で急速凍結し-70 °C で保存した。凍結検体はクライオスタットを用い厚さ 3 μ m の切片とし、4 %パラホルムアルデヒドで固定した。凍結切片は NaCl/Pi (0.9% NaCl、25 mM sodium phosphate、pH 7.4) で洗浄し NaCl/Pi 中 1%BSA 溶液でブロッキングした。その後切片を 1 次抗体と反応させ、洗浄後 Alexa Fluor 標識 2 次抗体 (Invitrogen) と反応させた。パラホルムアルデヒド固定後パラフィン包埋したヒト腎臓検体は、キシレンにて脱パラフィン処理し、濃度を変えたエタノールを用い水和した後に、pH6 の Target retrieval Solution (S1699; Dako、CA) 中でオートクレーブ法 (121°C、15 分) を用い不活化を行った。切片は室温に戻してから 1 次抗体と反応させ、洗浄後 Alexa Fluor 標識 2 次抗体と反応させた。画像は倒立顕微鏡 (IX71; Olympus、Tokyo、Japan) で撮影し、Adobe Photoshop CS3 を用いて解析した。

患者

ヒト腎生検検体は、東京女子医科大学腎臓病センターに入院中の患者に対し、今後

の治療を目的とし病態評価のために採取された腎生検検体の残りをを用いた。CNS 患者 1 (CNS1) は出生時より低アルブミン血症と高コレステロール血症を伴うネフローゼ症候群を呈し、生後 15 ヶ月で両側腎摘出術が施行された。CNS 患者 2 (CNS2) はアンギオテンシン II 阻害薬に抵抗性の重症ネフローゼ症候群を生後 6 週以内に発症し、生後 11 ヶ月時に片側腎摘出術が実施された。CNS1 では *NPHS1* のヘテロ結合ミスセンス変異 (P676R) が、CNS2 では *NPHS1* のホモ接合変異 (Q839RfsX849) が検出された。他の糸球体疾患として、IgA 腎症 (5 歳児) とアルポート症候群 (3 歳児) の検体を用いた。また、正常腎として奇形腫に隣接する部位 (2 歳児) の検体と腎移植のドナーの検体を用いた。全ての検体は本人または保護者による文書による同意を頂いており、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て解析を行った (No. 201)。

動物

全ての実験は東京大学医科学研究所動物センター (承認番号 17-3) および順天堂大学医学部実験動物委員会 (承認番号 230097) の承認を得た。6 週齢の Whistar Rat を Charles River Laboratories Japan, Inc. (Atsugi, Japan) より購入した。PS 腎症は、ラットにペントバルビタールを用いて麻酔をかけ、大血管を通して腎臓に 5

ml/min の速度で HBSS (Hank's balanced solution) を 20 分灌流した後 PS 溶液 (500 mg/mL) を 20 分投与して作成し、腎臓を摘出した。PAN 腎症は、腹腔内に体重 100 g 当たり 10 mg の PAN (Sigma) を投与して作成し、投与後 2、5、7、11 日後に腎臓を摘出した。蛋白を使用する実験には、腎臓を摘出後に糸球体をメッシュシービン
グ法により単離して用いた。

統計

値は平均値±標準誤差 (SE : Standard Error) で表示した。解析には t-test を用い、 $P<0.05$ を有意差ありと考えた。

II-III. 結果

SIRP α は Nephrin と結合する

スリット膜では構成因子が複合体を形成することによって、シグナルの伝達に影響を与えている[10]。そのため、SIRP α が既知のスリット膜構成因子と結合するかを調べた。HEK293T 細胞において、SIRP α に加えて Nephrin、Podocin、TRPC6 並びに Nephrin を共発現させ免疫沈降すると、Podocin、TRPC6 および Nephrin は SIRP α と結合しなかったが、Nephrin は SIRP α と結合した (図 2-6)。また、抽出したラットの糸球体においても、SIRP α は Nephrin と結合していることを確認した (図 2-7)。

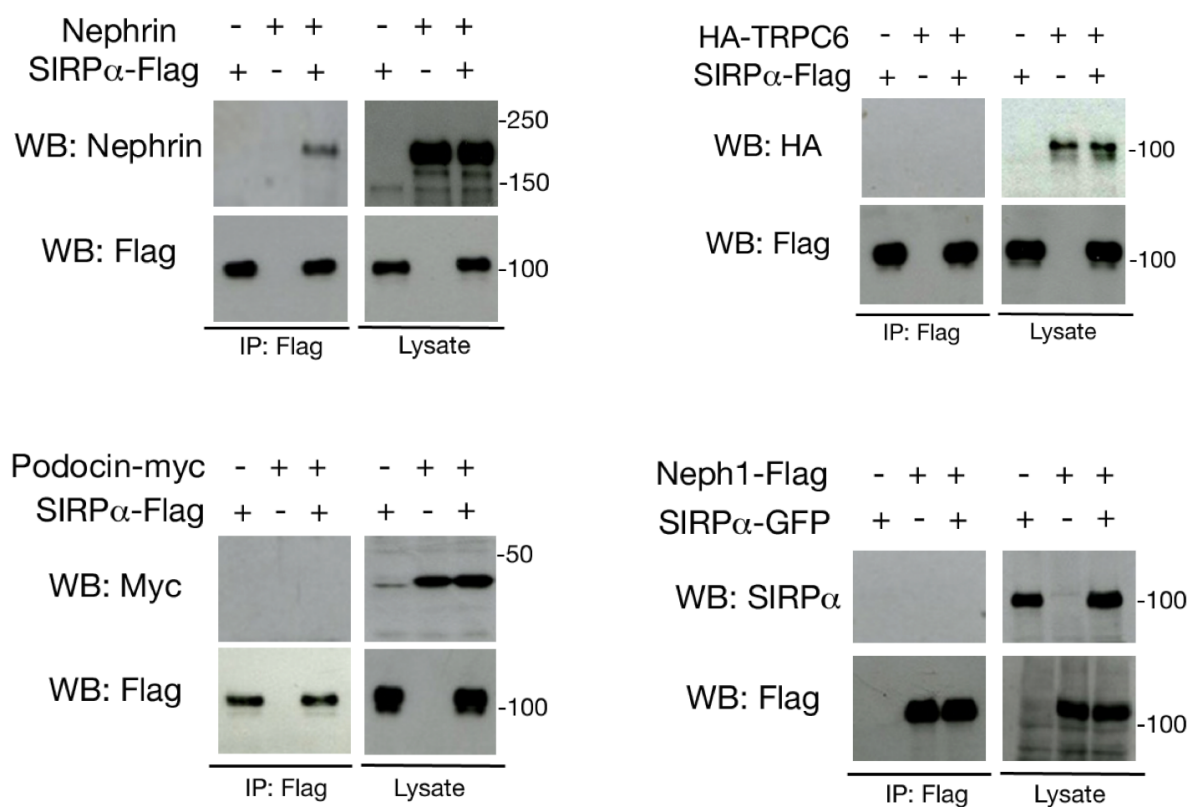


図 2-6. 図の説明は次頁

図 2-6. SIRP α は Nephrin と結合し、TRPC6、Podocin および Nep1 とは結合しない（図は前頁）

HEK293T 細胞に SIRP α と Nephrin、HA-TRPC6、Podocin-myc、Neph1-FLAG を導入し、FLAG ビーズを用い免疫沈降 (IP) し表示の抗体にて Western blot(WB) を行った。

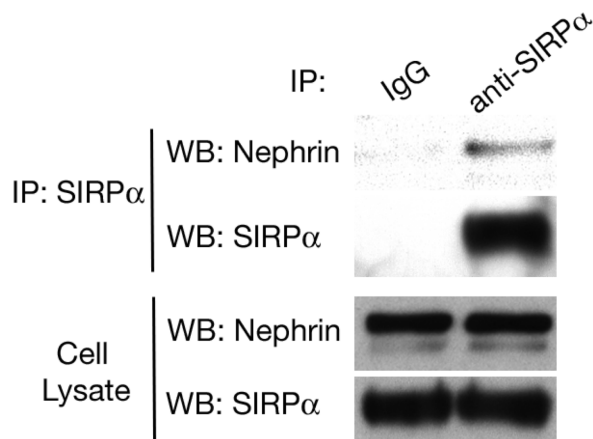


図 2-7. 単離糸球体において SIRP α は Nephrin と結合する

ラットの糸球体を単離し、SIRP α 抗体を用いて免疫沈降 (IP) し Western blot(WB)を行った。

結合することが分かった Nephrin と SIRP α はいずれもチロシンリン酸化を受けうるため、次に、二者の結合がそれぞれのリン酸化状態に影響を受けるかを調べた。まず、SIRP α のリン酸化の影響を調べるために、SIRP α の細胞内領域に存在する 4 箇所のリン酸化を受けうるチロシン(Y)をフェニルアラニン(F)に変換した変異体(SIRP α 4YF)を作製した。この変異体を用いて HEK293T 細胞における Nephrin と SIRP α を共発現させたところ、Nephrin と SIRP α は SIRP α のリン酸化状態に関わらず結合することが分かった (図 2-8)。次に、その部位がリン酸化することで Nephrin が PLC γ -1 と結合することが指摘されている[34] Nephrin の Y1204 を F に変換した変異体を用いて、SIRP α 、Nephrin および Fyn を HEK293T 細胞に共発現させた。

その結果、SIRP α と Nephrin は、Nephrin の Y1204 のリン酸化状態に関わらず結合した (図 2-9)。

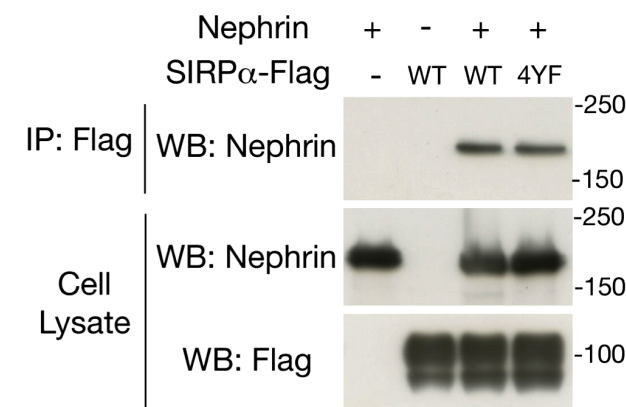


図 2-8. SIRP α のリン酸化の状態に関わらず Nephrin と SIRP α は結合する。

HEK293T 細胞に SIRP α -FLAG または SIRP α 4YF-FLAG と Nephrin を導入し、FLAG ビーズを用い免疫沈降 (IP) し表示の抗体にて Western blot(WB)を行った。

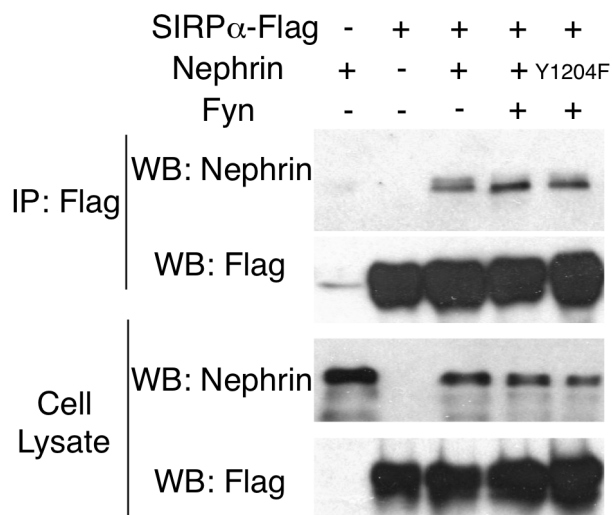


図 2-9. Nephrin のリン酸化の状態に関わらず Nephrin と SIRP α は結合する。

HEK293T 細胞に SIRP α -FLAG と Nephrin または Nephrin Y1204F を導入し、FLAG ビーズを用い免疫沈降 (IP) し表示の抗体にて Western blot(WB)を行った。

また、Nephrin は Nephrin1 のような他のスリット膜構成因子とも結合し複合体を形成する[16]。そのため、Nephrin と結合するタンパク質、Nephrin および SIRP α の 3 者間においては 3 量体を作る可能性があると考えた。この仮説に基づき HEK293T 細胞に FLAG-SIRP α 、Nephrin および Nephrin1 を導入し FLAG ビーズを用いて免疫沈降を行うと、前述の通り Nephrin と SIRP α は共沈し、Nephrin が存在する場合に

のみ SIRP α と Nephrin は共沈した (図 2-10)。この結果から、SIRP α は Nephrin および Nephrin と 3 量体を形成することが分かった。

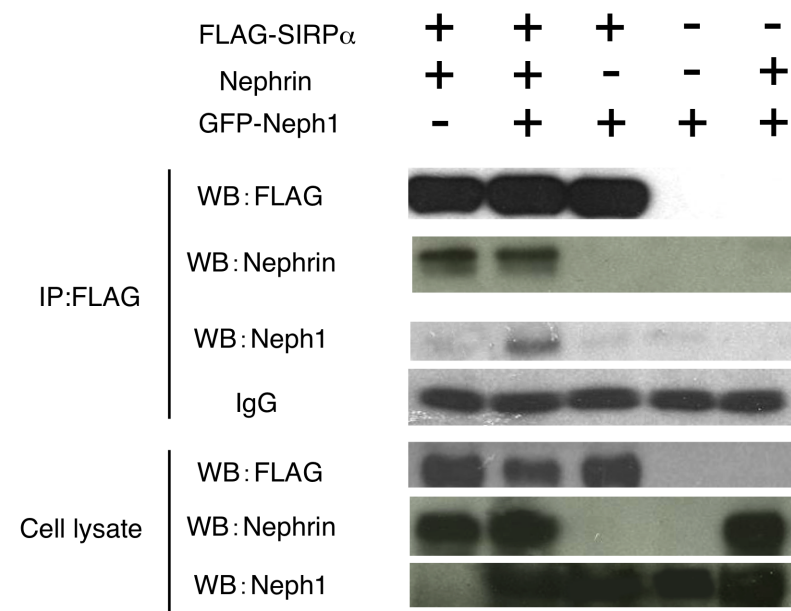


図 2-10. SIRP α 、Nephrin および Nephrin は 3 量体を形成する。

HEK293T 細胞に SIRP α -FLAG と Nephrin および GFP-Neph1 を導入し、FLAG ビーズを用い免疫沈降 (IP) し表示の抗体にて Western blot(WB)を行った。

SIRP α および Nephrin の正常および発達段階の腎組織における発現

SIRP α と Nephrin が結合することが分かったので、組織における SIRP α と Nephrin の局在を蛍光二重染色により確認した。まず、正常ヒト腎臓である成人の移植前のドナー腎臓検体の染色を行うと、SIRP α は糸球体係蹄壁に沿って染色され同部位で Nephrin と共局在し (図 2-11)、*in vivo* における結合を示唆した。

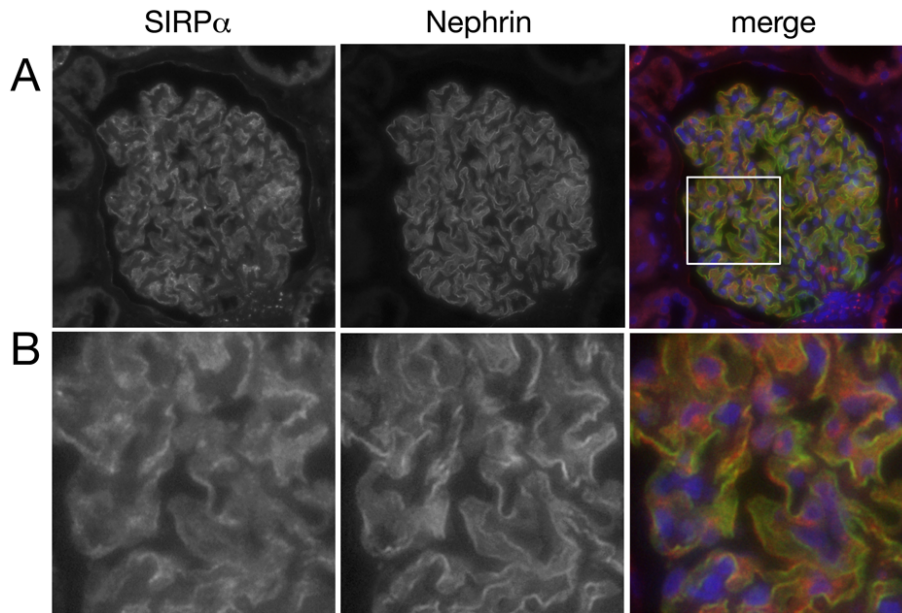


図 2-11. ヒト正常糸球体における SIRP α と Nephtrin の組織染色

ヒト正常糸球体を SIRP α (赤)、Nephtrin (緑) で染色し蛍光顕微鏡で観察した。SIRP α と Nephtrin は糸球体糸球壁に沿って共局在する。

A ; 倍率 ; 400 倍 B ; A において四角で囲った領域の拡大図

次に、発達段階での SIRP α と Nephtrin の関係を解析するために、まず腎糸球体における SIRP α 発達段階での発現を調べた。ラットの新生仔の腎臓において SIRP α と他のスリット膜構成因子である zonula occludens 1 (ZO-1) の二重染色を行った (図 2-12)。ZO-1 は、主にポドサイトの足突起に存在しスリット膜部位に濃縮して観察される因子で、発達段階の腎臓の S 期より発現する [35]。SIRP α は S 期に幼若なポドサイトの細胞表面に沿って出現し、基底膜面に特に強く発現していた (図 2-12)。糸球体の成熟に伴い、SIRP α と ZO-1 は幼若なポドサイトの基底膜面でほぼ共局在した。ここからは、SIRP α は細胞間接合組織の成熟とともにスリット膜に集約すると推測される。幼若なポドサイトにおいて Nephtrin と Neph1 をそれぞれ SIRP α と二重染

色すると、両者共に細胞表面で共局在し、それは基底膜面で特に顕著であった（図 2-13）。ここから、発達段階の腎臓においても、SIRP α 、Nephrin および Neph1 は密接な関係にあることが示唆された。

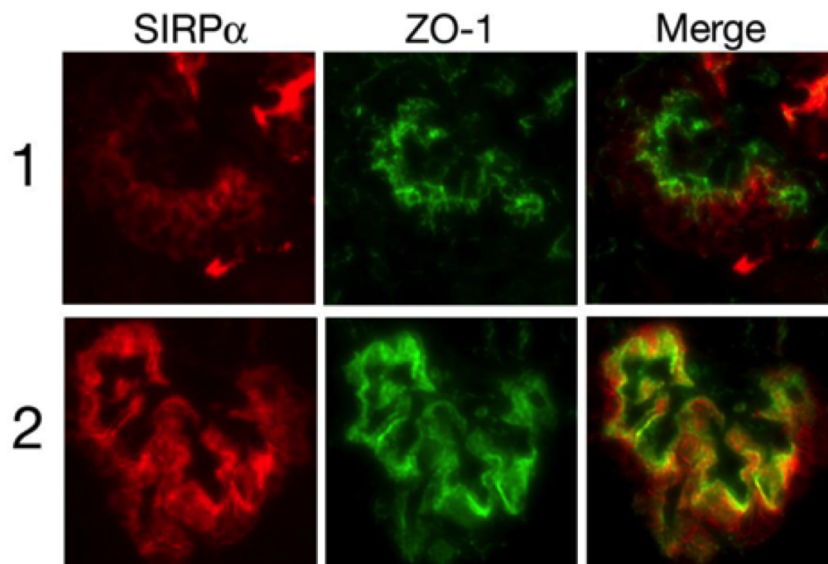


図 2-12. ラットの発達段階の腎臓における SIRP α の組織染色

新生仔のラットの腎臓を SIRP α （赤）と ZO-1（緑）で二重染色し蛍光顕微鏡で観察した。SIRP α は、上段 1 の S 期のポドサイトでは細胞表面に沿って幅広く発現し、上段 1 より成熟の進んだポドサイト（下段 2）では基底膜面に強く集約している。倍率；200 倍

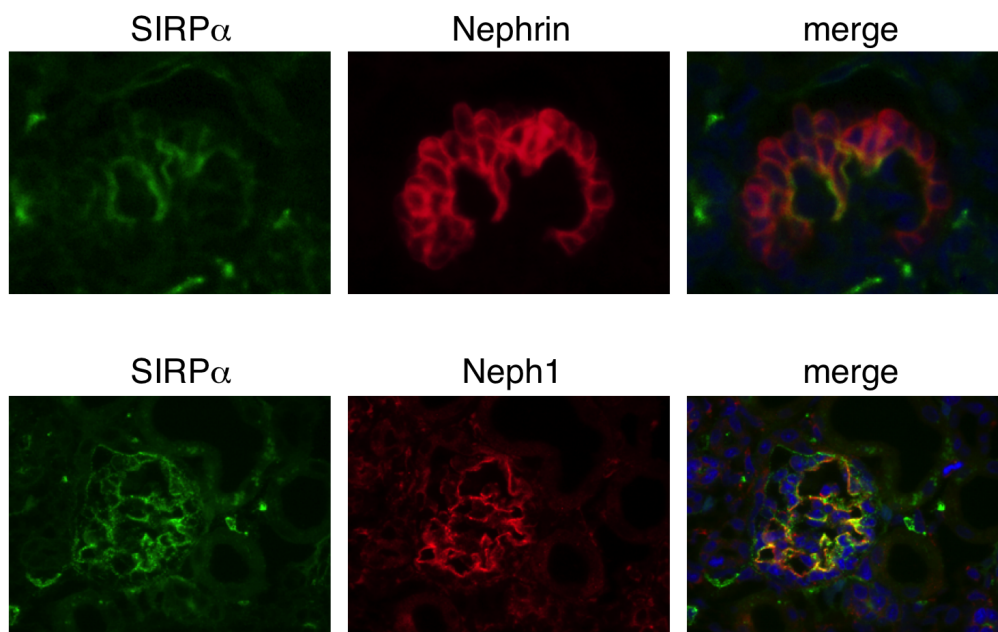


図 2-13. 新生仔期から SIRP α は Nephrin、Neph1 と共局在する（説明は次頁）

図 2-13. 新生仔期から SIRP α は Nephrin、Neph1 と共局在する(図は前頁)
新生仔のラットの腎臓を SIRP α (緑)、Nephrin または Neph1 (赤)、DAPI (青) で染色した。SIRP α は細胞表面に発現し、基底膜側で強く Nephrin および Neph1 と共局在している。倍率 ; 200 倍

先天性ネフローゼ症候群の腎臓における SIRP α の発現の変化

SIRP α と Nephrin が結合することが分かったので、次に、Nephrin の発現が先天的に阻害された状態において、SIRP α の発現が変化するかを調べた。Nephrin は *NPHS1* にコードされ、*NPHS1* の変異は先天性ネフローゼ症候群 (congenital nephrotic syndrome ; CNS) をきたし、スリット膜の形成不全を生じる[13]。そのため、*NPHS1* のヘテロ接合性のミスセンス変異 (P676R) を有する症例 (CNS1) と *NPHS1* のホモ接合性変異 (Q839RfsX849) を有する症例 (CNS2) の腎臓において、Nephrin と SIRP α の組織染色による解析を行った (図 2-14)。その際、Nephrin と SIRP α に加えて、他のスリット膜構成因子である Neph1、Podocin および ZO-1、さらにその他のポドサイトの構成因子であり蛋白尿の発症に関連するとされる GLEPP-1、podocalyxin および WT-1 についても解析を行った。正常コントロールとして腫瘍の隣接した部位の正常腎を用い、その他の代表的な糸球体疾患として IgA 腎症とアルポート症候群の腎臓との比較を行った。コントロール腎において、SIRP α 、Nephrin および他のスリット膜構成因子は、糸球体係蹄壁に沿ってシグナルが観察さ

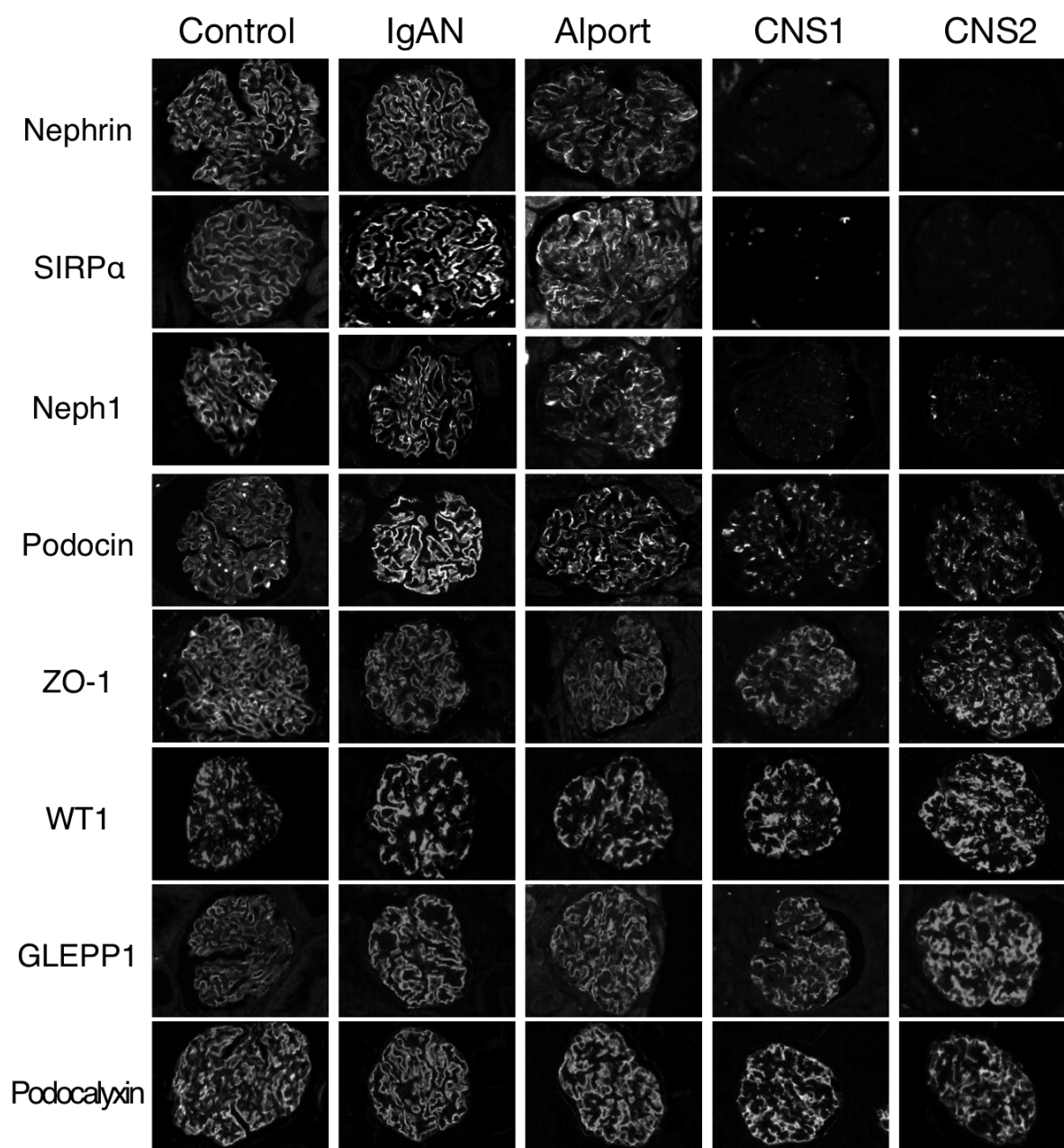


図 2-14. 先天性ネフローゼ症候群 (CNS) の糸球体における SIRP α およびポドサイト発現蛋白の発現の変化

CNS2 例 (CNS1、CNS2) の患児の腎生検検体を SIRP α およびポドサイト構成蛋白の抗体を用いて免疫組織染色を行った。正常コントロール (Control) として腫瘍隣接部位の正常腎を用い、また比較のためにその他の代表的糸球体疾患として IgA 腎症 (IgAN)、アルポート症候群 (Alport) も同じ抗体で染色した。CNS 症例の検体では、Nephrin の発現は認められず、SIRP α と Neph1 の発現も大幅に減少していた。倍率 ; 400 倍

れた。IgA 腎症とアルポート症候群の検体においても同様の染色パターンを認めた。

それに対し CNS 症例の検体では、Nephrin の発現は認められず、SIRP α と Neph1 の発現も大幅に減少していた。同症例において、Podocin の発現はやや低下し荒い顆粒状の染色パターンを示した。その他 ZO-1、GLEPP-1、WT-1 および Podocalyxin は、コントロール腎および CNS を含む糸球体疾患において染色パターンの変化は見られなかった。これらから、糸球体における SIRP α と Neph1 の発現には Nephrin の存在が重要であることが示唆された。

後天的ネフローゼ症候群モデルの腎臓における SIRP α の発現の変化

次に、puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症ラットの腎臓において、SIRP α 、Nephrin および Neph1 の発現の変化を調べた(次頁、図 2-15)。PAN 腎症ラットは、正常ラットの腹腔内に PAN を投与すると、蛋白尿および足突起の癒合を呈することから、正常ポドサイトが傷害されて発症するネフローゼ症候群モデルと考えられており[23, 26, 34]、蛋白尿の出現に伴う経時変化を観察が可能である。これを用い、正常に形成されたポドサイトが傷害を受ける過程で、SIRP α の発現に変化が生じる可能性を考え、解析を行った。蛋白尿は PAN を投与後 5 日目頃より出現することが知られており、Nephrin と Neph1 は既報の通り[36-38]蛋白尿の発現時期に一致し発現が減少した。それに対し SIRP α の発現パターンの変化は見られなかった。ここからは、

Nephrin が存在し正常に形成されたスリット膜においては、その後のポドサイトの傷害によって Nephrin および Neph1 が減少しても、SIRP α が保存されることが分かった。

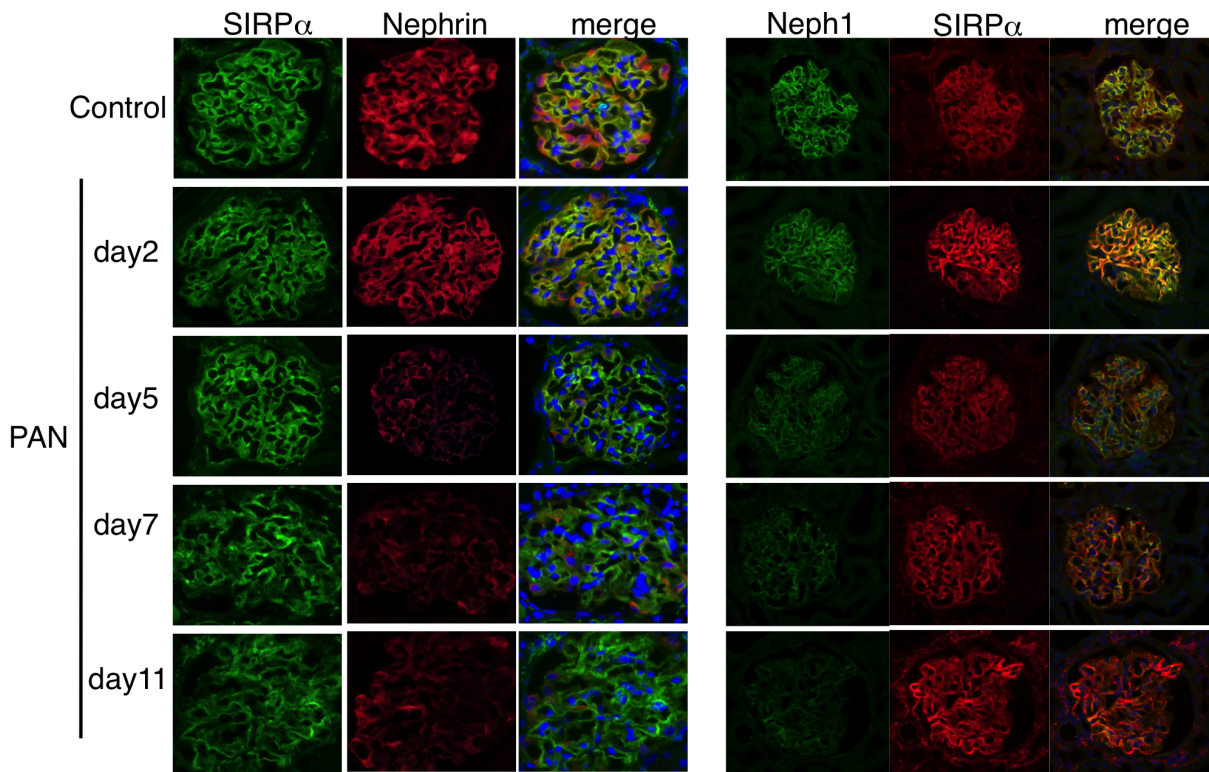


図 2-15. PAN 腎症ラットの腎糸球体における SIRP α 、Nephrin および Neph1 の発現

ネフローゼ症候群の動物モデルである PAN 腎症ラット (PAN) および正常ラット (Control) の腎糸球体を SIRP α 、Nephrin および Neph1 の抗体で染色した。経過を通じて SIRP α のシグナルは保持されていた。倍率 ; 400 倍

蛋白尿を呈した腎臓における SIRP α のリン酸化の変化

次に、SIRP α はチロシンリン酸化を受けシグナル伝達に関与することが知られて

いるため、糸球体においてもリン酸化を受けている可能性があると考えた。SIRP α は細胞内領域に 4 つの YXX (L/V/I) モチーフ (Y436、Y460、Y477 および Y501) を有し、これらはチロシンリン酸化を受けるにあたって SHP-1 および SHP-2 をリクルートする。そこで SIRP α のリン酸化を評価するために、Y501 のリン酸化に対する抗体をウサギを用いて作製した (pY501)。Y501 領域のアミノ酸配列はラット、マウスおよびヒトで保存されている。この抗体の特異性を確認するために、SIRP α の野生型、SIRP α の Y501 のチロシンをフェニルアラニンに変換した変異体 (Y501F)、および SIRP α のチロシンリン酸化を受ける 4 つのチロシン (Y436、Y460、Y477 および Y501) をフェニルアラニンに変換した変異体 (4YF) を Fyn と共に HEK293T 細胞に導入した。作製したリン酸化 SIRP α 抗体 (pY501) は SIRP α のリン酸化を認識した (図 2-16)。同抗体は SIRP α Y501F に対して野生型よりは弱いもののシグナルが検出された。これは 4 箇所の ITIM 領域において類似性があり、他の ITIM 領

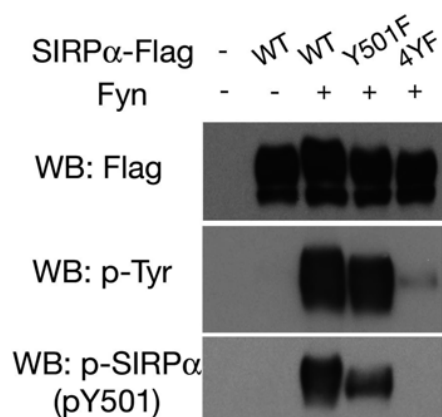


図 2-16. 作製したリン酸化 SIRP α 抗体 (pY501) は SIRP α のリン酸化を認識する。

HEK293T 細胞に野生型 (WT) または変異体 (Y501F、4YF) の SIRP α -FLAG および Fyn を導入し、表記の抗体で Western blot(WB)を行った。SIRP α の変異体において、Y501F は Y501 のチロシンを、4YF はチロシンリン酸化を受ける 4 つのチロシン (Y436、Y460、Y477 および Y501) をフェニルアラニンに変換した。

域に反応したためと考えた。しかし、SIRP α 4YF と Fyn を発現させた場合にはシグナルは検出されず、このリン酸化 SIRP α 抗体 (pY501) は、4 箇所のチロシンがリン酸化された SIRP α の検出に有用であることが示された (図 2-16)。この抗体を用いて糸球体において SIRP α がリン酸化されているかを調べた。ラットから抽出した糸球体に対し 1% NP-40 を用いて可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれを SIRP α 抗体とリン酸化 SIRP α 抗体 (pY501) を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、ラットの糸球体においてリン酸化した SIRP α を検出した (図 2-17)。

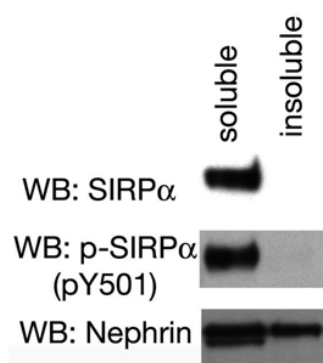


図 2-17. ラットの正常糸球体においてリン酸化した SIRP α が存在する

ラットから抽出した糸球体に対し 1%NP-40 を用いて可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれを SIRP α 抗体、リン酸化 SIRP α 抗体 (pY501) および Nephryn 抗体を用いて Western blot(WB)を行った

次に、傷害を受けた糸球体において SIRP α のリン酸化が変化するかをウェスタンブロッティング法で調べた。この実験では、前述の PAN 腎症ラットに加えて、ポドサイトの足突起の癒合を示す別のポドサイト傷害モデルである硫酸プロタミン (Protamine Sulfate ; PS) 灌流ラット[26, 39]を用いた。SIRP α 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、双方のモデルの糸球体において検出された SIRP α の総量に著変は見られなかった (図 2-18)。しかし PAN 腎症ラットの糸球体において、SIRP α

のリン酸化は、リン酸化チロシン抗体およびリン酸化 SIRP α 抗体 (pY501) のいずれを用いても減少を認めた (図 2-18A、B)。PS 灌流ラットの糸球体においても、リン酸化チロシン抗体を用いて SIRP α のリン酸化の減少を認めた (図 2-18C)。

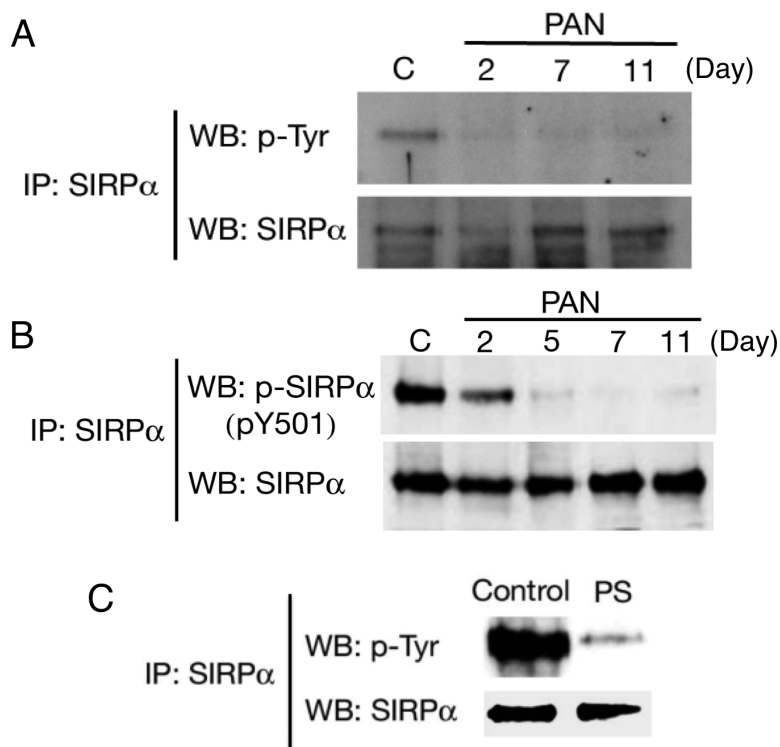


図 2-18. ポドサイト傷害時には SIRP α のリン酸化が減弱する

ポドサイトの傷害モデルである PAN 腎症ラットと PS 灌流腎を作成後に糸球体を単離し、抗 SIRP α 抗体で免疫沈降 (IP) 後、表記の抗体で Western blot (WB) を行った。

SIRP α のリン酸化と Nephrin のリン酸化の関連

SIRP α は自身がチロシンリン酸化を受け、その際脱リン酸化酵素である SHP-1/2 をリクルートすることによって他の基質を脱リン酸化し、下流のシグナル伝達を抑制的に制御する作用がある[32]。スリット膜においては、Nephrin のチロシンリン酸化が細胞骨格の制御と関連する可能性が指摘されていることから[23, 24, 34]、SIRP α のチロシンリン酸化が Nephrin のチロシンリン酸化を変化させるか検討を行った。

HEK293T 細胞に SIRP α と Nephrin をそれぞれ発現させ、免疫沈降物をリン酸化チ

ロシン抗体で検出すると、それぞれの検体にバンドが検出され、SIRP α と Nephrin の一部がリン酸化されていることが分かった (図 2-19A、B)。Src family kinase(SFK) の阻害剤である SU6656 を添加するとこのバンドは消失し、SIRP α と Nephrin いずれのタンパク質のチロシンリン酸化についても SFK を介していることが分かった (図 2-19A、B)。これを踏まえ、HEK293T 細胞に SIRP α と Nephrin を共発現させると、SIRP α を発現させないコントロールと比べ Nephrin のチロシンリン酸化が減少 ($P<0.01$) していた (図 2-19C、D)。同じ系で野生型の SIRP α の代わりに SIRP α 4YF を発現させると Nephrin のリン酸化の減少は見られなかった (図 2-19C、D)。この結果から、*in vitro* において SIRP α は Nephrin のチロシンリン酸化と関連を有する可能性が示唆された。

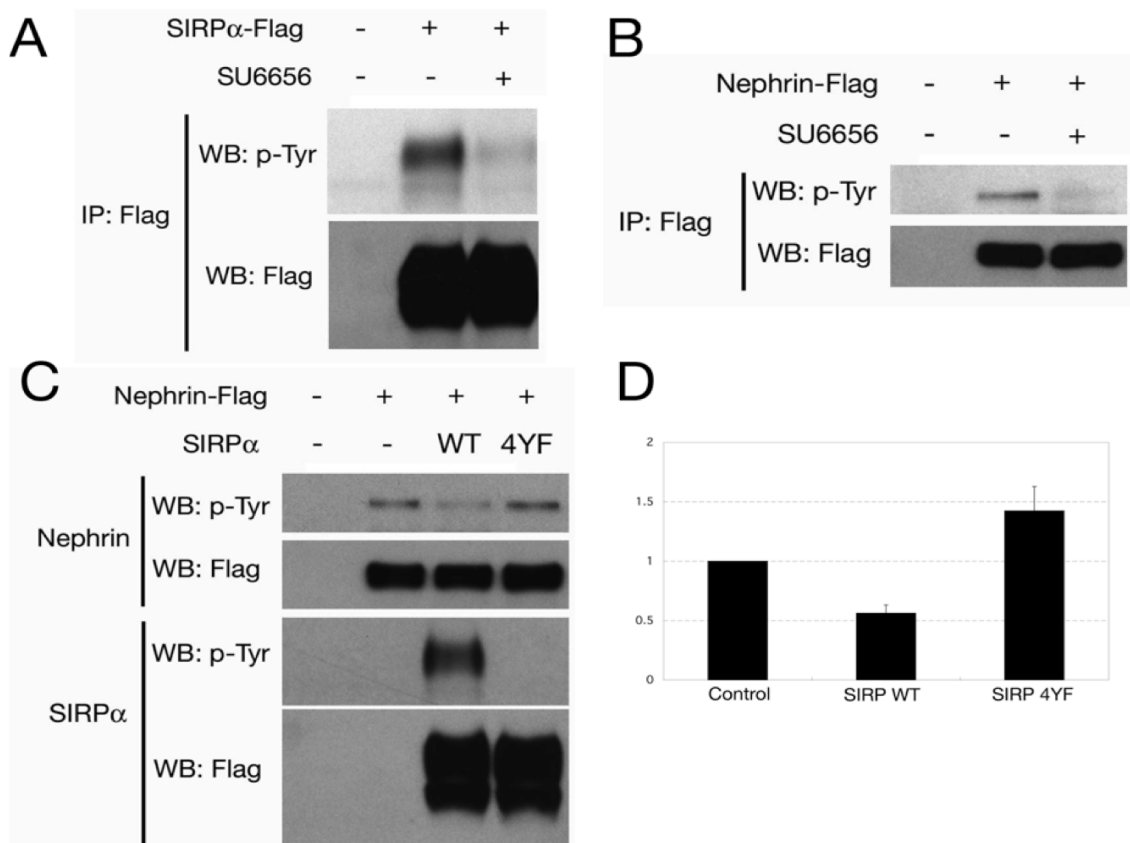


図 2-19. *in vitro* で Nephrin のリン酸化は SIRP α によって抑制される。

(図は前頁)

A、B ; HEK293T 細胞に SIRP α -FLAG (A) または Nephrin-FLAG (B) を導入し、5 μ M の SU6656 を 60 分間添加した。その後 FLAG ビーズで免疫沈降 (IP) し、表記の抗体で Western blot (WB) を行った。

C ; SIRP α の野生型 (WT) および変異体 (4YF) と Nephrin-FLAG を導入し、FLAG ビーズで免疫沈降 (IP) し、表記の抗体でウエスタンブロッティングした。

D ; C における Nephrin のチロシンリン酸化のシグナルの強度を示した。それぞれの値はコントロールにあたる C の 2 レーン目のシグナルの強度を用い標準化した。

II-IV. 考察

スリット膜分子のチロシンリン酸化はポドサイトの形態制御に関わりを持つが、スリット膜に存在する **SIRP α** の、他のスリット膜分子との相関やチロシンリン酸化の変化については、これまで解明されていなかった。今回の研究において、**SIRP α** はスリット膜構成因子であり細胞骨格の制御を通してポドサイトの形態変化に関わる **Nephrin** と互いのチロシンリン酸化に関わらず結合し、更に **SIRP α** 、**Nephrin** および **Neph1** とは 3 量体を作ることが分かった。そして、**SIRP α** と **Nephrin** は発達段階から関連を持つことが示唆され、**Nephrin** が先天的に欠損しているネフローゼ症候群ではポドサイトにおいて **SIRP α** の発現も低下していた。しかし、後天的なネフローゼ症候群モデルでは、**Nephrin** の発現は低下したが **SIRP α** の発現は保持されていた。また、そのようなポドサイト障害モデルでは、**SIRP α** のチロシンリン酸化は蛋白尿の発症に伴い減少していた。そして、**Nephrin** と **SIRP α** を共発現させると **Nephrin** のチロシンリン酸化が減少し、**SIRP α** が **Nephrin** のチロシンリン酸化に影響を与える可能性が示された。これらからは、**SIRP α** が他のスリット膜分子と密接な関わりを持ち、さらにそのチロシンリン酸化の変化が他のスリット膜分子のシグナル伝達に影響を与え、本研究の仮説であるポドサイトの形態変化および蛋白尿の発症

と関連している可能性が示唆される。

Nephrin は CNS の原因タンパク質として同定され、ポドサイトの足突起間の接着構造の形成に寄与し[40]、チロシンリン酸化により Nck との結合を介して糸球体ポドサイトの細胞骨格の変化に関わるため[23, 24]、糸球体の形態変化をきたす蛋白尿の発症に関連して非常に注目されてきたタンパク質である。また、Neph1 はリン酸化により Grb2 をリクルートし細胞骨格の制御に関わり、Neph1 のノックアウトマウスは蛋白尿を呈し胎児期に死亡する[16]。最近では Neph1 の細胞内領域の導入がポドサイトの傷害に対し保護的に働くと報告された[41]。この Nephrin と Neph1 が属するタンパク質複合体に SIRP α が含まれることは、SIRP α がポドサイトの形態制御システムに関わる可能性があることを示唆する。

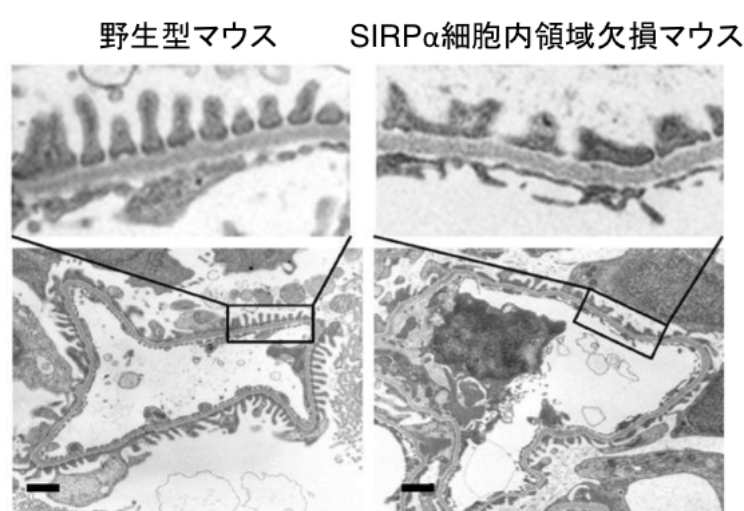


図 2-20. SIRP α の細胞内領域欠損マウスの腎糸球体電子顕微鏡写真

SIRP α の細胞内領域欠損マウスではポドサイトの形態変化が見られる。

本研究の結果のみでは、ポドサイトの形態制御における SIRP α の直接的な関与に踏み込むには至っていない。しかし、近年 Takahashi らは SIRP α がチロシンリン酸化を受けうる細胞内領域を欠損したマウス

スにおける腎糸球体の研究を報告した[42]。この研究において、SIRP α の細胞内領域欠損マウスは新生仔期には正常マウスと同様の形態のポドサイトを有するが、成長に伴いポドサイトの足突起の平坦化と鈍化が観察され（図 2-20、[42]より一部改変）アルブミン尿を呈した。このマウスと野生型マウスの糸球体では、Nephrin およびリン酸化された Nephrin のタンパク量の変化は見られなかった。また、片腎の摘出およびアドリアマイシンの投与はラットにおいて巣状糸球体硬化症を惹起するが[43, 44]、C57BL/6 マウスはこれに耐性を持つ[45]。しかし SIRP α の細胞内領域が欠損した C57BL/6 マウスは、容易に足突起の癒合および巣状糸球体硬化症を来した[42]。これらの結果は、チロシンリン酸化を受ける SIRP α の細胞内領域が、成熟した糸球体においてポドサイトの細胞形態に直接影響を与え蛋白尿の発症と関わることを示し、本研究の仮説を支持すると考えられる。しかしこの SIRP α の細胞内領域の欠損によって *in vivo* での Nephrin のチロシンリン酸化は変化せず、本マウスにおけるポドサイトの形態変化は Nephrin を介したシグナル伝達に起因するとは考えにくい。また、C57BL/6 マウスにおける巣状糸球体硬化症発症の理由は不明であるが、SIRP α の細胞内領域の欠損によってポドサイトが非常に傷害を受けやすい不安定な状態にある可能性を示唆する。

SIRP α がポドサイトの形態制御に関わる機序として本研究での *in vitro* の結果からは、SIRP α の脱リン酸化により Nephrin のチロシンリン酸化を促し細胞骨格に影響を与えた可能性が考えられる（図 2-21）。しかし前述の通り SIRP α の細胞内領域欠損マウスにおいて Nephrin は関与していない可能性がある。その場合考えられる機序としては、SIRP α によりリクルートされる SHP-2 を介した経路が挙げられる。SHP-2 は低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーの制御に関わり [46, 47]、Rho ファミリーは一般に細胞骨格の制御を司るため [48]、ポドサイトにおいても細胞骨格を制御し蛋白尿の発症と関連することが指摘されている [49]。また、貪食細胞では SIRP α は SHP-1 を介して nonmuscle myosin- II A を制御し細胞骨格の再編成に関わることから [50]、SHP-1 を介した経路も考えうるが、現在までのところ糸球体におい

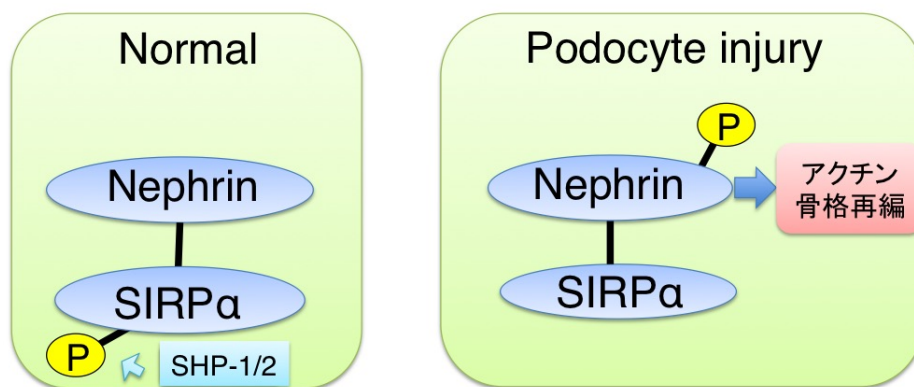


図 2-21. 本研究から考えられる SIRP α と Nephrin の関係

正常糸球体において SIRP α は自身をチロシンリン酸化することで Nephrin のチロシンリン酸化を抑制する。ポドサイト傷害時には SIRP α のチロシンリン酸化が減弱し、Nephrin のチロシンリン酸化が亢進することでアクチン細胞骨格の再編に関わる。

て SIRP α と SHP-1 の結合は見られていない[29, 42]。さらに、貪食細胞では SIRP α はインテグリンを介した細胞骨格の再編成に関わることも指摘されているが[51]、ポドサイトを含む他の細胞での関与は現時点では不明である[32]。

SIRP α は細胞内領域に ITIM を有し、各種細胞において、SHP-1 や SHP-2 をリクルートすることで、他のリン酸化基質を脱リン酸化しシグナル伝達を負に制御している[32]。糸球体において SIRP α は SHP-2 と共局在し[29]結合することが示されている[42]。本研究において *in vitro* の系で SIRP α との共発現により Nephrin のリン酸化が低下したことからは、Nephrin のチロシンリン酸化に対し SIRP α が一部負の制御を行う可能性を否定はできない。これまでポドサイトには、脱リン酸化酵素として SHP-2、PTP1B、PTP-PEST、PTP36(別称; PTPD2)が高発現することが知られ[52]、Nephrin の脱リン酸化については、PTP1B が Nephrin と結合し脱リン酸化させることや[53]、最近では高血糖時にのみ SHP-1 の発現が上昇し Nephrin と結合して脱リン酸化させること[54]が報告されている。しかし現時点で *in vitro* の系において Nephrin の脱リン酸化において SHP-2 の関与は明らかでない[53]。そのため、現時点では SHP-2 を介した SIRP α による Nephrin の脱リン酸化は考え難く、負のシグナルを伝達するには間に他の経路を挟む必要がある。

本研究からは SIRP α と Nephrin は発達段階から密接な状態にあり、更には先天的

に Nephtrin が欠損しスリット膜が形成されないと SIRP α の発現が阻害されることがわかった。ここからは SIRP α の発生段階からの発現には Nephtrin が必要であることが示されたが、それに対して Takahashi らの結果[42]からは Nephtrin の発現には SIRP α の細胞内領域は必ずしも必要でないことが分かる。今後、発達段階における SIRP α と Nephtrin の関連については、SIRP α の細胞外領域の関与も含めた検討が必要と考えられる。

先天的なスリット膜の障害では Nephtrin と SIRP α の両者が低下するが、後天的な障害では SIRP α のみ維持される理由としては、両者の発現を制御するシステムやターンオーバーサイクルの違い、また後天的な傷害により分子の安定性に変化を生じる可能性などが考えられる。そして SIRP α は一度ポドサイトに正常に発現してしまうと、その後の発現を保持するには Nephtrin の正常な発現は必要がないのかもしれない。その点からは、微小変化型ネフローゼ症候群や巣状糸球体硬化症など、後天的に足突起の癒合を伴い蛋白尿を呈し Nephtrin の発現の低下が報告されている疾患[55-57]においては、SIRP α の発現は低下していないことが予想される。後天的なポドサイト傷害における SIRP α の詳細な挙動については、足突起の癒合およびスリット膜の消失による SIRP α の局在の変化に対し電子顕微鏡を用いた詳細な検討などを行うことでより明らかにできると考えられる。

SIRP α は、CD47 のようなリガンドへの結合、成長因子や、細胞接着に関与する Thrombospondin-1 やインテグリンの刺激によってリン酸化が亢進することが知られている[32, 58-61]。神経細胞や免疫細胞においては、SIRP α は正常の状態ではリン酸化状態は低く保たれ、これらの刺激によりシグナル伝達に関与する[32, 62]。しかし、他の種々の細胞における *in vivo* のリン酸化の程度は不明な部分が多い[32]。正常ポドサイトでは *in vivo* において SIRP α は一部リン酸化され、ポドサイト傷害モデルにおいては SIRP α のリン酸化は減少していた。上記を踏まえると、正常ポドサイトにおいて SIRP α がリン酸化している理由としては、(i)スリット膜構成因子との結合による刺激、(ii)糸球体基底膜に含まれる細胞外基質へのインテグリンが制御する細胞接着による刺激や、(iii)他の細胞において産生された成長因子による刺激によるものなどが考えられる。

SIRP α は Nephrin と結合しシグナル伝達を介し、蛋白尿の発症に伴うポドサイトの形態制御に関わる可能性がある。今後臨床献体において SIRP α および Nephrin のリン酸化の詳細な検討を行うことで、実際の病態とそれに対する SIRP α のリン酸化の変化の関連をより明らかにできるであろう。そしてこのシグナル伝達の経路を解明することは、ポドサイトの形態制御および蛋白尿の発症メカニズムの理解の一端につながり、治療のターゲットの解明につながる可能性があると考えられる。

Ⅲ 章

浸潤性乳がんに関与する

Rab ファミリーのスクリーニング

Ⅲ-I 序論-がんの浸潤と Rab ファミリー-



図 3-1. 上皮間葉転換 (EMT) の模式図

正常上皮細胞（橙色）ががん化した後に EMT をきたし細胞外基質に侵入する際には（桃色）、個々の細胞が細胞骨格を再編し自身の形態を変化させる。

上皮細胞は細胞外基質を含む基底膜に接着し支えられており、上皮細胞ががん化した後に他の臓器に転移する際には、血管やリンパ管に至るために原発巣から基底膜を破り周辺組織（細胞外基質）へ浸潤することが必要となる。周辺組織へ

の浸潤の際に、細胞間接着を保持している細胞が上皮間葉転換（epithelial mesenchymal transition : EMT）を来すと、個々の細胞が細胞骨格を再編し形態を変化させ[63]、細胞は極性を失い細胞間接着が減弱し単独で運動を開始する（図 3-1）。

この形態変化を伴う運動において、細胞が紡錘形に変化し先端から細胞外基質を分解する酵素であるメタロプロテアーゼを分泌しながら進行する場合を間葉性運動、球形に変化してから基質間の間隙を抜けるように更に形態を変化させる場合はアメーバ

様運動と分類される[64]。どの様式を用いて浸潤を進行させるかはがんの種類により異なるが、いずれの運動様式においてもがん細胞の形態の変化は必要となる。これを



踏まえ、上皮細胞由来のがんの浸潤の機構について焦点をあてることとした。

間葉性運動の際に浸潤突起

図 3-2. 浸潤突起の電子顕微鏡画像

(invadopodia) と呼ばれる構造が

基底膜面に形成される(図

3-2、[65]より一部改変)。

ここには neuronal

Wiskott-Aldrich

Syndrome protein

(N-WASP) や actin

related protein (Arp) 2/3

複合体のようなアクチン

骨格の再編成に関与する

タンパク質が局在し、細胞

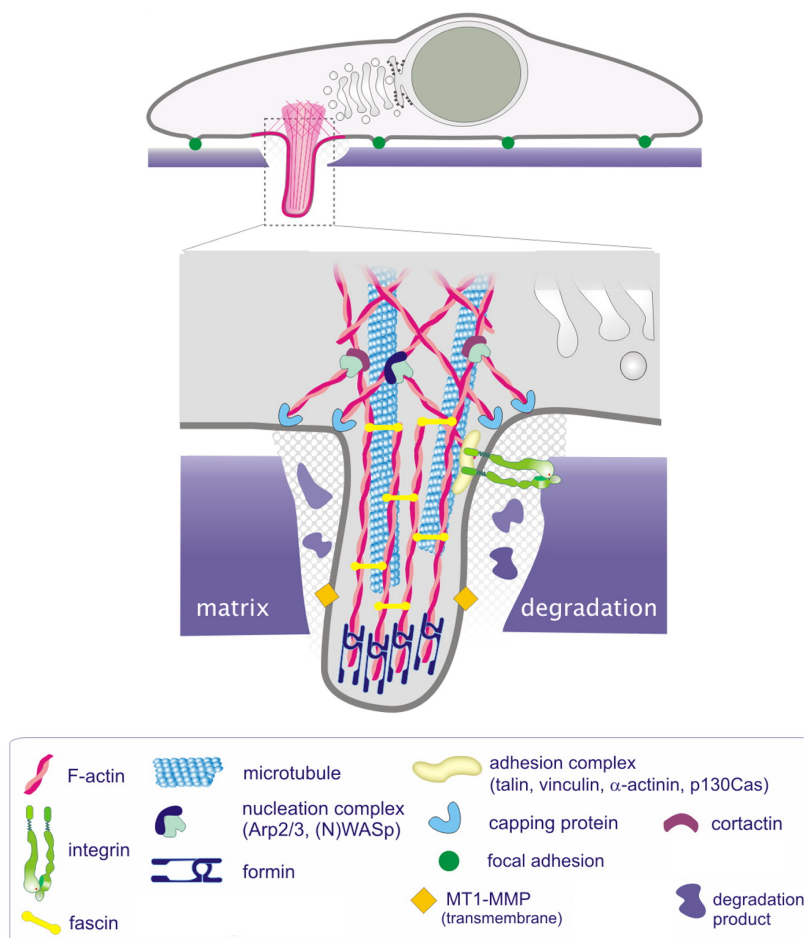
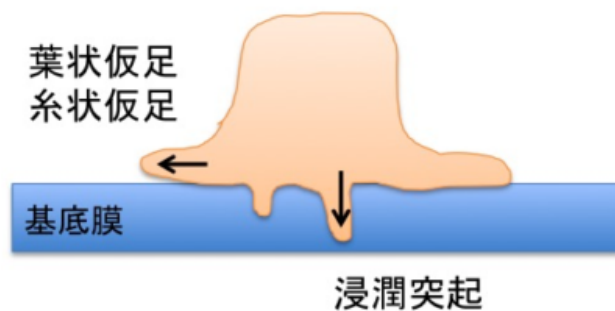


図 3-3. 浸潤突起とその構成分子

骨格の要となるアクチン繊維が集積して骨格形態が保持されている（図 3-3、[66]より一部改変）。また膜貫通型メタロプロテアーゼである membrane type 1-matrix metalloproteinase(MT1-MMP、別称 matrix metalloproteinase 14; MMP14)に代表される細胞外基質の分解酵素も局在している。このように種々の細胞の辺縁に存在し、アクチン骨格を再編成された形成された他の代表的な構造物としては、正常細胞にも存在する糸状仮足（filopodia）や葉状仮足（lamellipodia）が挙げられる。これら仮



足は細胞が運動する際に先端部となり、細胞体を前方に押し出すことで細胞の運動を亢進させる機能を持つと考えられているが、

図 3-4. 仮足と浸潤突起の局在の違いの模式図

	葉状仮足 (Lamellipodia)	糸状仮足 (Filopodia)	浸潤突起 (invadopodia)
特徴	シート状の突出	指状の突出	アクチンの芯の周囲にシグナル伝達に関与するタンパク質が存在
局在	細胞運動の先端	通常葉状仮足と同部位	基底膜側の表面
大きさ	径：0.1-0.2 μm	径：0.1-0.3 μm 長さ：3-10 μm	径：0.5-2 μm 長さ：>2 μm
形態を支持する アクチン骨格	枝分かれした アクチン繊維	平行なアクチン繊維束	細胞表層ではアクチン繊維が枝分かれし、突起内では枝分かれしないアクチン繊維束として存在
形状の持続時間	数分	数分	数時間
基質分解能	わずか	なし	高度(メタロプロテアーゼ等による)

表 3-1 仮足と浸潤突起の主な特徴の違い

浸潤突起と異なり細胞外基質の分解能は乏しい。仮足と浸潤突起の主な特徴の違いを

表 3-1 ([67]より一部改変) に示した。

細胞におけるアクチンなどの骨格因子の制御には低分子量 GTP 結合タンパク質 (以下 G タンパク質) の Rho ファミリーが中心的役割を担うことが知られている[68]。

	機能
Ras	細胞の分化と増殖
Rho	アクチン細胞骨格の制御
Rab	細胞内小胞輸送
Arf	細胞内小胞輸送
Ran	細胞核内外への輸送

低分子量 G タンパク質には

Rhoを含む5つのファミリーが

あり、各々の主だった機能は表

3-2 に示す通りである。個々の

表 3-2. 低分子量 G タンパク質の代表的分類

低分子量 G タンパク質は通

常は不活性型の GDP 結合型

を取っている。上流からのシグナルに応じてグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF : guanine-nucleotide exchange factor) により活性型の GTP 結合型に変換され、固有のエフェクターと結合することで下流へとシグナルを伝達する。その後 GTP を加水分解する GTPase 活性化タンパク質 (GAP : GTPase-activating protein) により元の不活性型の GDP 結合型になる。これらの活性型と不活性型のサイクルを繰り返すことによって低分子量 G タンパク質は細胞内のシグナル伝達因子として機能している。

浸潤突起の形成に、この Rho ファミリーがアクチン細胞骨格の制御を通じて関与する事がかねてより指摘されてきた[66, 69]。また、アクチン骨格の再編成に関与するタンパク質やメタロプロテアーゼの浸潤突起形成に必要な因子が浸潤突起へと集積するために細胞内の様々な小器官からの小胞輸送が必要であることから、細胞内小胞輸送の中心的な制御を担う Rab ファミリーも Rho ファミリー同様、重要な役割を果たすと考えられる。近年では低分子量 G タンパク質 Rab ファミリーに属する Rab5

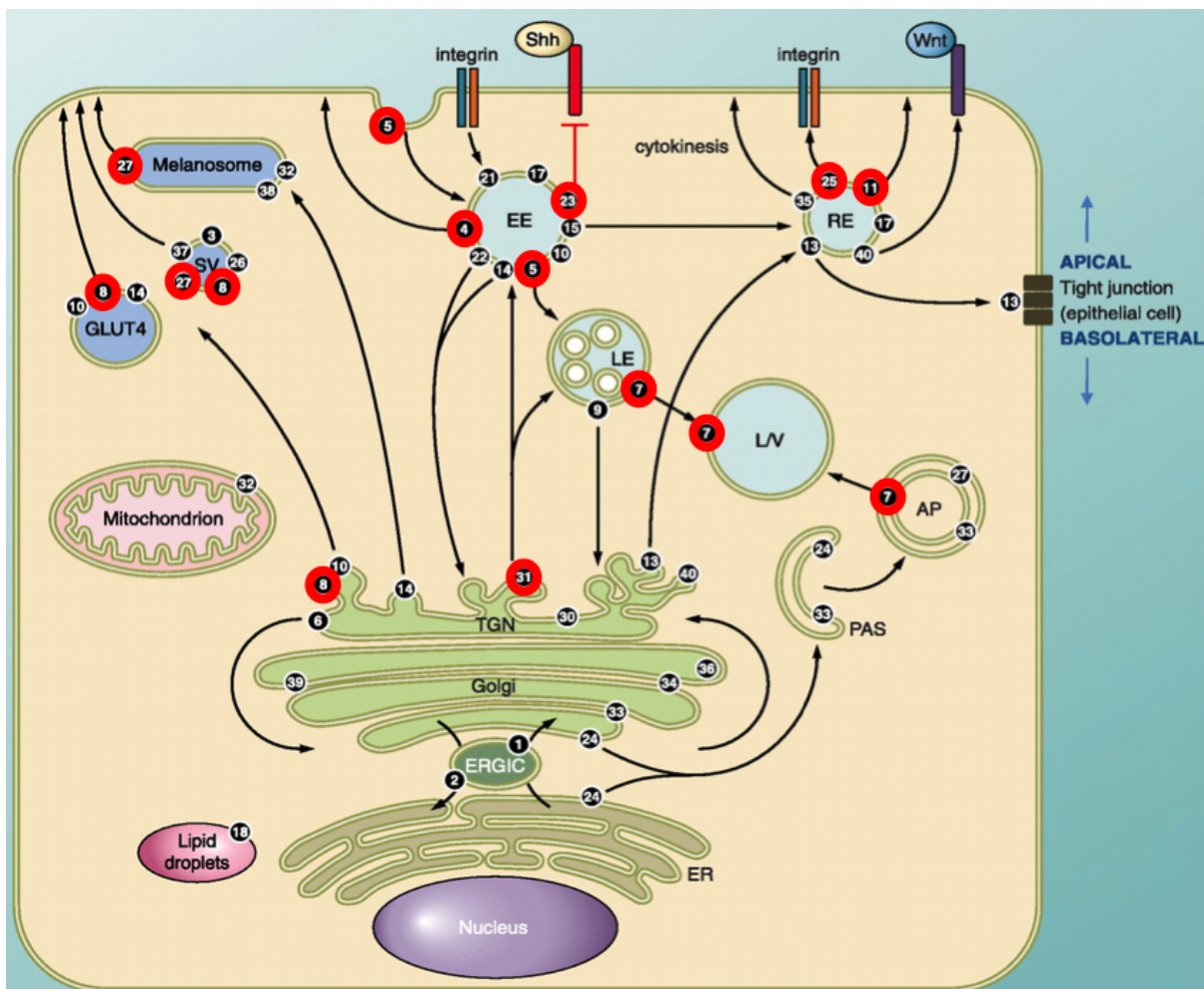


図 3-5. 細胞における Rab ファミリーの局在および代表的な小胞輸送の経路

過去にがんの浸潤に関与するとの既報のある Rab を赤丸で示した。

が Rho ファミリーと協調して細胞の形態制御および浸潤能の獲得に関与することが報告されている[70]。Rab ファミリーは低分子量 G タンパク質の中でも最大のファミリーを形成し、酵母から哺乳動物まで全ての真核生物に良く保存され、ヒトでは 66 種類が報告されている[71]。各々の Rab は図 3-5 ([72]より一部改変) に示すように、特異的なオルガネラへの局在を示し、細胞内の小胞の形成と輸送および標的部位への繫留や融合の制御を行う[73]。その後幾つかの Rab についても浸潤への関与の報告が続いたが(表 3-3、次頁、[74]より一部改変)、浸潤の機構においては、Rab ファミリーは Rho ファミリーとの協調による浸潤突起の形成という細胞骨格制御の観点に加え、更にはメタロプロテアーゼの浸潤突起への輸送という観点からも関わる[75, 76] ため、現在までに同定されていない Rab が関与している可能性も考えられる。しかし、これまで浸潤への関与の有無を全 Rab ファミリーに対して網羅的に検討した報告はない。そこで全 Rab family に対する siRNA ライブラリーを用いることで浸潤に関与する Rab のスクリーニングを行い、同定された Rab について浸潤に関与する分子機序の検討を行った。

Rab	がんの種類	浸潤における作用
Rab4a	乳がん、黒色腫	MT1-MMPの輸送への関与
Rab5a	子宮頸がん、乳がん	インテグリン、Rac1の機能低下、 MT1-MMPとβ3インテグリンの輸送への関与
Rab7	肝臓がん、前立腺がん	プロテアーゼの分泌低下
Rab8	肺腺がん	MT1-MMPの分泌への関与
Rab11	乳がん、大腸がん、肺がん、 卵巣がん、腎がん	E-カドヘリンの機能低下
Rab23	胃がん	unknown
Rab25	大腸がん、卵巣がん	インテグリンのリサイクリング
Rab27b	神経膠腫、乳がん、肝臓がん	IGF-2の分泌、MMP2の活性化への関与
Rab31	乳がん	接着能の低下

表 3-3. がんの浸潤に関する既報のある Rab の一覧

IGF ; Insulin-like growth factor

Ⅲ-Ⅱ 実験材料および実験方法

試薬と抗体

抗 FLAG 抗体(M2; Sigma、St.Louis、MO)、抗 Rab2 抗体 (PA521754 ; Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA)、抗 GRASP55 抗体 (10598-1-AP ; Proteintech)、抗 ERGIC53 抗体 (ENZ-ABS300-0100 ; Enzo Life Sciences)、抗 TGN46 抗体 (AHP500G ; Serotec)、抗 GM130 抗体 (610823 ; BD Transduction Laboratories)、Fluorescein Isothiocyanate (FITC) および Tetramethylrhodamine (TRITC)-phalloidin (Sigma) は購入した。SU6656 (Merck KGaA、Darmstadt、Germany)、recombinant HGF (R&D Systems、Minneapolis、MN)、EGF (Vinci-Biochem、Firenze、Italy)、Hygromycin (Invitrogen)、Doxycycline hyclate (Sigma)、GM6001 (EMD Millipore) は購入した。

細胞培養および細胞への遺伝子導入

Human embryonic kidney HEK293T 細胞は ATCC (Manassas、VA)より購入し、10 %FBS (fetal bovine serum) を添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を用いて 5 %CO₂ 存在下 37 °Cで培養、継代維持した。MDA-MB-231 細

細胞は ATCC より購入し、10 %FBS を添加した Leibovitz's L-15 medium を用いて 0%CO₂ 存在下 37 °C で培養、継代維持した。MCF10A 細胞に H-Ras が導入され、腺管上皮内がん (ductal carcinoma in situ : DCIS) 様の性質を持つ MCF10.DCIS.com 細胞は[77]、5 % horse serum、20 ng/ml EGF、10 µg/ml insulin、0.5 µg/ml hydrocortisone を添加した DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12、Invitrogen) を用いて 5 % CO₂ 存在下 37°C で培養、継代維持した。siControl nontargeting siRNA、Rab siRNA は Ambion より購入し、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入した。

ウエスタンブロット

等量のタンパク質を含むように調整した各試料を SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)にて分離した。泳動、展開した蛋白質を PVDF 膜 (Polyvinylidene difluoride; Immobilon Transfer Membranes、Millipore) にウェット式で転写した。蛋白質を転写した PVDF 膜はブロッキング液 (3 %BSA/ 0.05 % Tween20/ TBS) 内にて 1 時間室温で振盪した。1 次抗体は 1/2000、2 次抗体は 1/10000 で使用した。

ゼラチン分解アッセイ

(a) カバースリップを用いたゼラチン分解アッセイ

2 mg/ml の gelatin/PBS 溶液を Alexa Flour 594 labeling kit (Invitrogen) を用いて蛍光ラベルした。その後、径 20 mm ガラス製カバースリップをエタノールに浸したあと風乾し、蛍光ラベルしたゼラチンを表面に広げ室温で 15 分処理した。余剰なゼラチンを除去後 0.5% (w/v) glutaraldehyde (Electron Microscope Sciences, Hatfield, PA)/PBS を添加して 4°C 15 分静置し、PBS(-)で 3 回洗浄後 50 µg/ml 四ホウ酸ナトリウムで 15 分処理した。PBS(-)で 3 回洗浄後細胞に応じた培地を入れて 1 時間 37°C で静置した。MDA-MB-231 細胞はカバースリップ 1 枚あたり 7×10^4 細胞ずつ播種し細胞が接着してから、血清除去培地で 2 時間培養し、HGF を最終濃度 100 ng/ml となるように添加し 3 時間培養した後 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。MCF10.DCIS.com 細胞は、カバースリップあたり 7×10^4 細胞を播種し、3 時間後以降に培地に 100 ng/ml の HGF を添加し、24 時間培養してから 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。その後 FITC-phalloidin および DAPI で染色し、蛍光顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)で撮影した画像を Image J (NIH) を用いて解析を行った。

QPCR

real-time PCR法を用いた。まず、細胞からRNeasy kit(QIAGEN、Hilden、Germany)を用いてRNAの抽出を行った。全RNAのうち1.5 µgをSuperscript Vilo(Thermo)を用いて逆転写しcDNAを合成した。qPCRのコントロールとしてGAPDHまたは18s rRNAを用いた。PCRは三回繰り返し、標準偏差をエラーバーで表示した。real-time PCRに用いたTacMan probeはいかに記すThermoFisher社のものを使用した。

GAPDH, Hs99999905_m1; MT1-MMP, Hs00237119_m1;

N-WASP, Hs00187614_m1; RAB2A, Hs00234094_m1;

RAB18, Hs00222021_m1; RAB20, Hs00215134_m1;

RAB23, Hs00212407_m1; RAB26, Hs00205016_m1;

RAB28, Hs01017480_m1; RAB33A, Hs00191243_m1;

RAB36, Hs01016871_m1; TKS5, Hs00206037_m1,

VPS39, Hs00385779_m1

(b) 96 well プレートを用いたゼラチン分解アッセイ

gelatin from pig skin, Oregon Green® 488 conjugate (Molecular Probes、Thermo fisher Scientific)を 0.25 mg/ml に調製し、ViewPlate-96 Black, Optically Clear Bottom (Perkinelmer、Waltham、MA)に 40 μ l/well ずつ入れ 10 分静置した。ゼラチンを除去後 0.5% (w/v) glutaraldehyde/PBS を添加して 15 分静置し、PBS(-)で 3 回洗浄後 50 μ g/ml 四ホウ酸ナトリウムで 15 分処理した。PBS(-)で 3 回洗浄後 medium を入れて 1 時間 37°C で静置した。リバーstransフェクション法を用いて MDA-MB-231 細胞を 1 ウェルあたり 1000 細胞ずつ播種した。この際、底面に張り付いた細胞がゼラチンを分解しない様に 20 μ M GM6001 を添加した。2 日後に各 well を培地で 3 回洗浄後、GM6001 を含まない培地を添加して分解反応を開始させた。翌日各 well を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。その後 Tetramethylrhodamine (TRITC)-phalloidin および DAPI で染色し、蛍光倒立顕微鏡(Olympus、Tokyo、Japan)により撮影された画像を Image J (NIH) を用いて解析を行った。

インバースインベージョンアッセイ

氷上で Matrigel Growth Factor Reduced (以降 Matrigel と表記、Corning、Corning、NY)を等量の冷 PBS で希釈し、fibronectin を添加した (最終濃度 25 μ l/ml)。その希

釈したマトリゲルを 24-well トランスウェルシステム (Corning) に 100 μ l のせ、37°C の培養機で 1 時間以上静置した。その後トランスウェルを上下逆転させ 12 well プレートの各ウェルにおき、メッシュ面に培地 100 μ l あたり目的の MDA-MB-231 細胞を 4×10^4 細胞ずつ播種した。4 時間培養し細胞がトランスウェルに接着した後に、24 well プレート中にトランスウェルを上下戻して設置し、血清無添加培地で洗浄し、下のチャンバーに血清無添加培地を 600 μ l、上のチャンバーに血清添加培地を 100 μ l および HGF を加えた。48 時間培養した後トランスウェルを PBS で洗浄し、4 μ M の Calcein AM (Corning) 溶液を加え 37°C で 1 時間反応させ細胞を染色した。その後 PBS で洗浄し、ライカ SP2 共焦点顕微鏡を用い 5 μ m 毎の高さでマトリゲルの横断面を撮像した。解析には ImageJ (NIH) を用いた。

Cultrex を用いた 3D 浸潤アッセイ

Cultrex® 3-D Spheroid cell invasion assay kit (Trevigen、Gaithersburg、MD) を用いた。目的の MDA-MB-231 細胞を Spheroid formation ECM で希釈し、1 ウェルあたり 3000 細胞ずつ丸底の 96 ウェルプレートに播種した。その後室温のスウィングローターで 200g、3 分間遠心し、37°C の培養器で 72 時間培養した。その後スフェロイドを形成していることを確認し、氷上で 15 分静置してから各ウェル 50 μ l の

Invasion matrix を加え、4℃のスウィングローターで 300g、5 分間遠心した後、37℃の培養器で 1 時間静置しゲルを個相化した。その後 L-15 培地を 100 μ l/ウェル加え、37℃で培養した。24 時間毎にスフェロイドの変化を撮像し、ImageJ を用いスフェロイドの断面の面積を算出した。

コラーゲンとマトリゲルを用いた 3-D 浸潤アッセイ

氷上で、PureCol® (Advanced Biomatrix, San Diego, CA)、滅菌した 10 倍濃縮 PBS、0.1 M NaOH、0.1 M HCl、Matrigel を混和し、Collagen の最終濃度を 1.6 ng/ml とした。それらを 8 well チャンバースライドの上に塗布し、37℃の培養機の中で乾燥させ、MCF10.DCIS.com 細胞を 1 ウェルあたり 2500 細胞として 5 ng/ml の EGF と 2%の Matrigel を含む培地 400 μ l と共に播種した。4 日毎に培地を交換し、スフェロイドを形成した後に recombinant HGF を 20 ng/ml 添加した。2 日毎に撮像し、各々のスフェロイドの断面に対し ImageJ を用いて円周と面積を算出し、 $\text{面積} \times 4\pi / (\text{円周})^2$ を Circularity として計算した。Circularity は 1 に近い程正円に近く、値が小さいほど正円と形態が異なり表面が不整であることを表している。

Rab2A shRNA テトラサイクリン誘導性 MCF10.DCIS.com 細胞株の樹立

文献に基づき[78]作製を行った。ヒト Rab2A に対する shRNA となる配列をデータベース (<http://cancan.cshl.edu/cgi-bin/Codex/Codex.cgi>) より探索し下記のオリゴを用い、98°C 1 min, 70°C から 20°C まで-1°C/min の条件でアニールさせた。

5'-AGCGCGGAGCTTTACTAGTTTACGATTAGTGAAGCCACAGATGTAATCGT
AAACTAGTAAAGCTCCT-3'

5'-GGCAAGGAGCTTTACTAGTTTACGATTACATCTGTGGCTTCACTAATCGTA
AACTAGTAAAGCTCCG-3'

BfuAI で処理した pEN-TmiRc2 ベクターとライゲーションして、シークエンスにより配列を確認した。この pEN-TmiRc2(shRab2A)と pSLIK-Hygro ベクター(Addgene)を Gateway LR clonase Enzyme Mix (Invitrogen)でリコンビネーション反応させ pSLIK-Hygro(shRab2A)を作製した。

HEK293T 細胞に pMDLg/pRRE, pVSV-G, pRSV-REV と pSLIK-Hygro(shRab2A)をリン酸カルシウム法により導入した。なお、拡散防止措置の区分で P2 レベルの実験施設にてすべての細胞操作を行った。2 日後に細胞から medium に分泌された lenti virus を回収した。MCF10.DCIS.com に上記 lenti virus を感染させ、感染 2 日後から 50 µg/ml Hygromycin B 下でセクションを行った。shRNA の誘導には 400 ng/ml Doxycycline を用いた。

マウス Rab2A テトラサイクリン誘導性 MCF10.DCIS.com 細胞株の樹立

マウス線維芽細胞(MEF) cDNA を鋳型として PCR によりマウス Rab2A を増幅した。

用いたプライマーは以下の通りである。

5'-CAGAATTCATGGCGTACGCCTATCTCTT-3'

5'-ATAGTCGACTCAACAGCAGCCTCCCCCT-3'

増幅した cDNA 断片および pCMV5myc ベクターを EcoRI/SalI 処理後ライゲーションし、シーケンスにより配列を確認した(pCMV5myc-マウス Rab2A)。次に pCMV5myc-マウス Rab2A を鋳型として下記のプライマーを用い cDNA を増幅した。

5'-GATACTAGTGTCAGAATTGGCCGCCACCATG-3'

5'-ATATGCGGCCGCTCAACAGCAGCCTCCCCCT-3'

この cDNA および pENTR-mcs を NotI/SpeI 処理後ライゲーションし、シーケンスにより配列を確認した(pENTR-mcs-マウス Rab2A)。このプラスミドを上記 Rab2A shRNA 誘導株樹立時と同様 pSLIK-Hygro へリコンビネーションした後に lenti virus を得て MCF10.DCIS.com に感染させ細胞株を樹立した。

統計

値は平均値±標準誤差（SE：Standard Error）で表示した。解析には t-test を用い、 $P<0.05$ を有意差ありと考えた。

III-III 結果

MDA-MB-231 細胞のゼラチン分解能を用いた 1、2 次スクリーニング

浸潤突起を介した細胞外基質の分解を *in vitro* で観察するために、蛍光標識したゼラチンの上で浸潤性の高い細胞を培養し、ゼラチン分解能を可視化した (図 3-6)。細



ゼラチンの分解

胞は蛍光ゼラチン分解能について既報のあ

る乳がん由来の MDA-MB-231 細胞を用い

[79]、全 Rab ファミリーに対する siRNA

図 3-6. MDA-MB-231 細胞によるゼラチン分解の模式図

ライブラリーを導入し各 Rab の発現が低

下した際のゼラチン分解能の変化を解析し

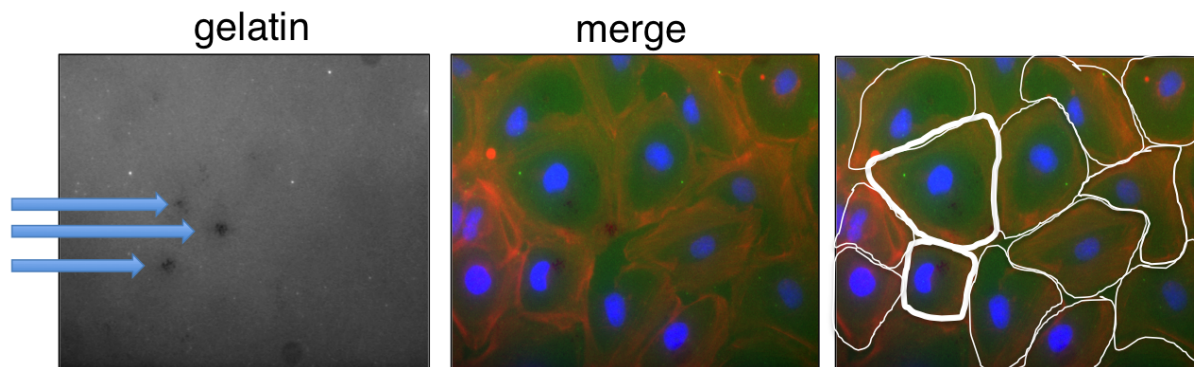


図 3-7. MDA-MB-231 細胞による蛍光ゼラチンの分解

96 ウェルプレートに蛍光ラベルしたゼラチンでコートし、その上で MDA-MB-231 細胞を培養した。最初の 48 時間は培地に GM6001 を添加し、その後 GM6001 無添加培地に交換し 24 時間培養した。固定し染色後、蛍光顕微鏡で観察した。ゼラチンの分解を有する細胞を計測する際には、右図のように白線で囲んだ全細胞数における太線で囲んだ細胞の割合を算出した。

緑 ; ゼラチン、赤 ; F-actin、青 ; DAPI

た。多種のサンプルを用いるため顕微鏡観察用の 96 ウェルプレートを用い、先に蛍光標識されているゼラチンで各ウェルをコートした上で siRNA を導入した MDA-MB-231 細胞を培養しゼラチンの分解を行う系を構築した。発現の低下が誘導される 48 時間後まではメタロプロテアーゼ阻害剤である GM6001 を添加してゼラチンの分解を抑制し、その後 GM6001 を除去しゼラチンの分解を開始させた。ゼラチンが分解された箇所は図 3-7 のように黒い点として観察されることから、1 視野中の全細胞数におけるゼラチン分解を有する細胞数の割合をゼラチン分解能として定量した。まず、コントロール siRNA と比べ、浸潤に関与すると既報のある N-WASP、

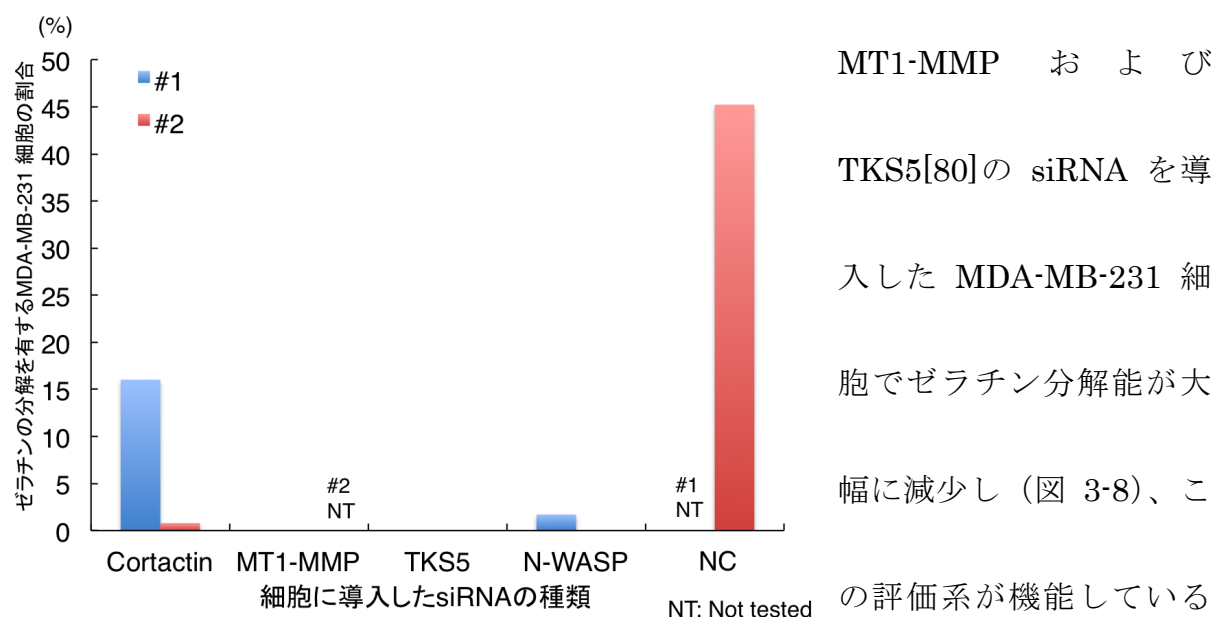


図 3-8. siRNA を導入した MDA-MB-231 細胞におけるゼラチン分解能の予備検討

siRNA を導入した MDA-MB-231 細胞をゼラチンコートした 96 ウェルプレート上で培養し、計測した全細胞中のうちゼラチンの分解を有する細胞の割合を算出した。

MT1-MMP および TKS5[80]の siRNA を導入した MDA-MB-231 細胞でゼラチン分解能が大幅に減少し (図 3-8)、この評価系が機能している

ことを確認した。

そこで 1 次スクリーニングとして、それぞれ

3つの異なるターゲット配列をプールした全ヒト Rab ファミリーに対する siRNA を MDA-MB-231 細胞に導入し、ゼラチン分解能を評価した。結果を図 3-9 に示す。浸潤に関与する可能性が指摘されている Rab については青字で示した。ゼラチン分解能を有する細胞を 20 %以下に減少させる Rab ファミリーを本スクリーニングにより選出した。なお、ネガティブコントロールの siRNA を導入した細胞と比較し、一部の Rab の siRNA の導入によってはゼラチンの分解能が亢進したが、ばらつきも多く

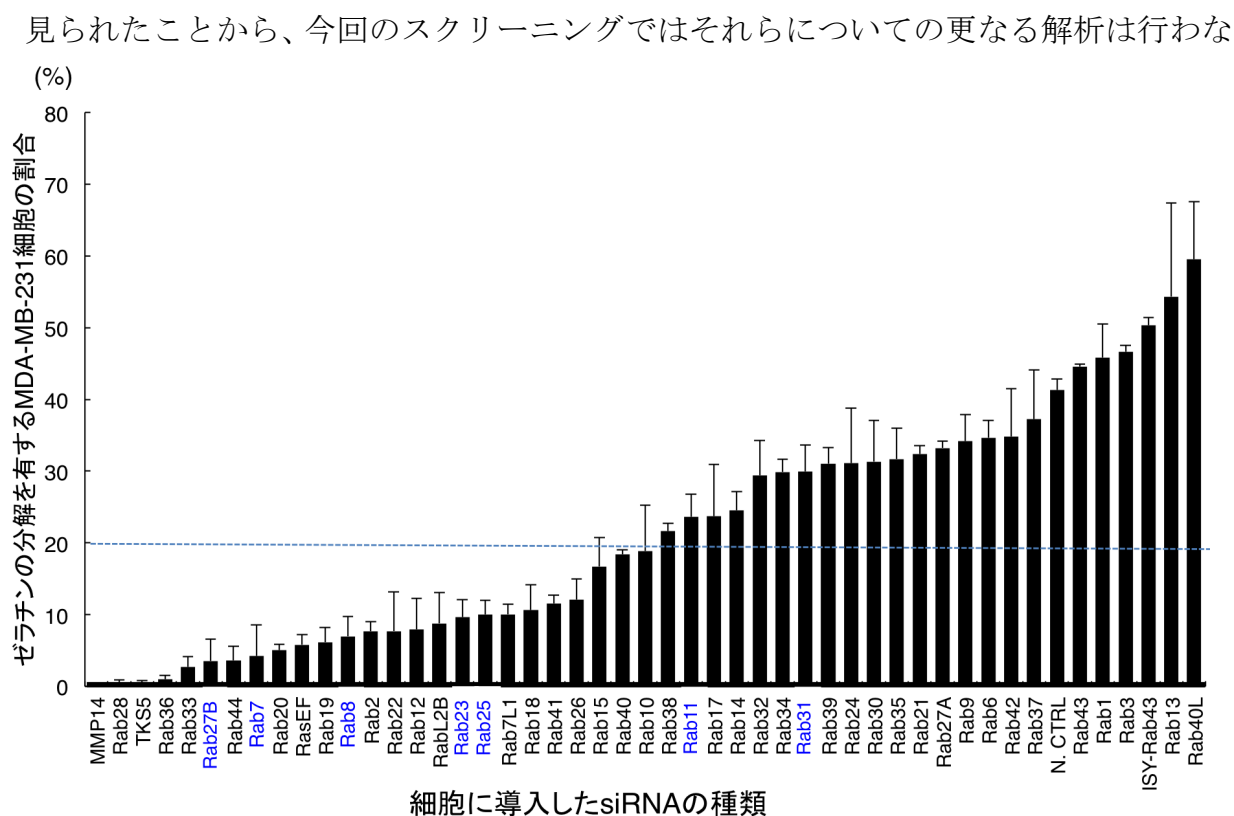


図 3-9. Rab ファミリーの siRNA 導入による MDA-MB-231 細胞のゼラチン分解能の変化（1 次スクリーニング）

個々の Rab に対する異なる 3 種類の siRNA をプールしたものを MDA-MB-231 細胞に導入し、蛍光ラベルしたゼラチンでコートした 96 ウェルプレート上で培養した。観察した全細胞数におけるゼラチンの分解を有する細胞の割合を算出した。がんの浸潤における関与が報告されている Rab は青字で示した。

かった。

続いて 2 次スクリーニングを行った。1 次スクリーニングを通過した候補の Rab に対し 3 つの異なる配列の siRNA を単独で MDA-MB-231 細胞に導入してゼラチン分解能を評価した (図 3-10)。その結果、どの siRNA を導入してもゼラチン分解能を有する細胞を 10 %以下に減少させる Rab を 9 個選出した。

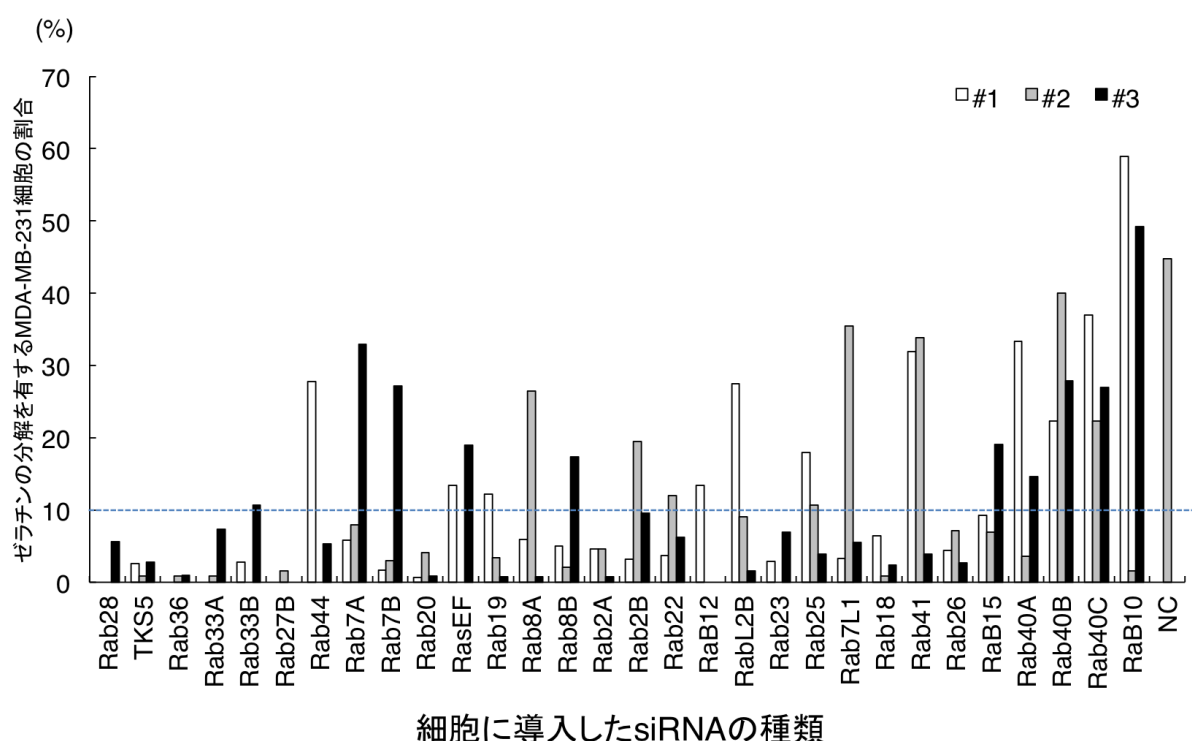


図 3-10. Rab ファミリーの siRNA 導入による MDA-MB-231 細胞のゼラチン分解能の変化 (2 次スクリーニング)

1 次スクリーニングを通過した Rab に対する異なる 3 種類の siRNA を個々に MDA-MB-231 細胞に導入し、蛍光ラベルしたゼラチンでコートした 96 ウェルプレート上で培養した。観察した全細胞数におけるゼラチンの分解を有する細胞の割合を算出した。

MCF10.DCIS.com 細胞を用いた 3 次スクリーニング

次に、2 次スクリーニングにより選ばれた Rab を他の乳がん由来細胞でノックダウンした際に細胞外基質の分解が抑制されるかを検討した。そこで、hepatocyte growth factor (HGF) 刺激により高い浸潤性を示し[76]、乳がん様の性質を示す MCF10.DCIS.com 細胞を用いたゼラチン分解能の解析を行った。MDA-MB-231 細胞と同様の手法を用いたところ、ゼラチンの分解は不明瞭であった(データ非表示)。そこで高倍率の対物レンズによる細胞観察を可能にするために、蛍光標識したゼラチンで 20 mm カバースリップをコートし、その上であらかじめ標的の siRNA を導入し

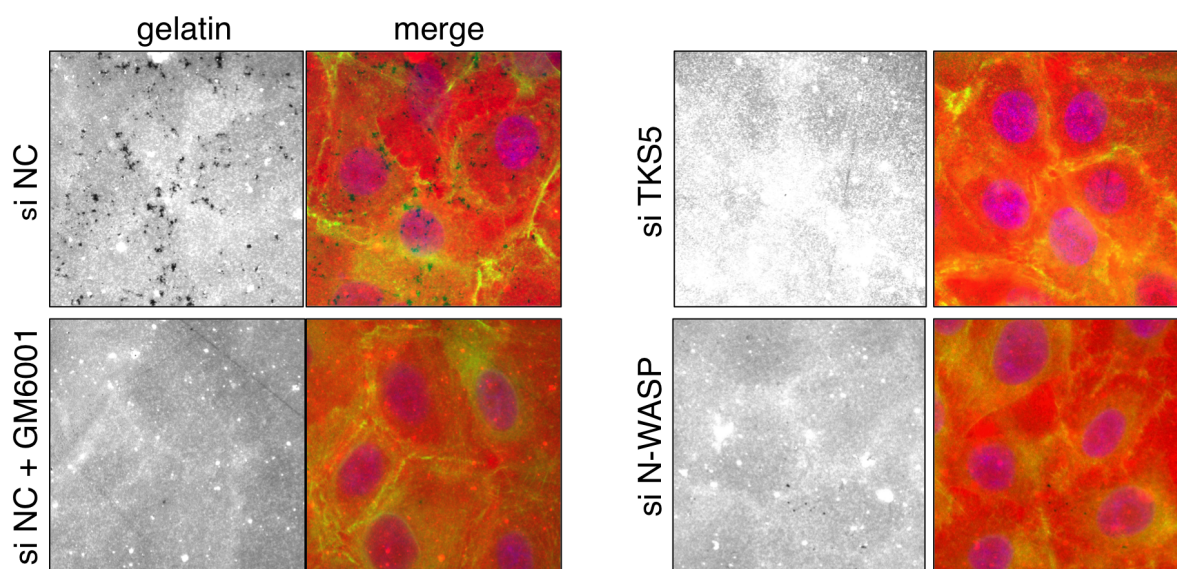


図 3-11. MCF10.DCIS.com 細胞によるゼラチン分解の予備検討

蛍光ラベルしたゼラチンでカバースリップをコートし、その上で表記の siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞を培養し、24 時間 HGF による刺激を加えた後に、固定および染色を行った。メタロプロテアーゼ阻害剤の添加または浸潤への関与の既報がある分子の siRNA の導入によりゼラチンの分解は大幅に減少した。

倍率;400 倍、赤 ; ゼラチン、緑 ; F-actin、青 ; DAPI

ておいた細胞を培養し、HGF 刺激を加える系を用いた。ネガティブコントロールの siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞では、ゼラチンの分解は黒い点として観察され、N-WASP の siRNA を導入した細胞ではこのゼラチン分解が大幅に減少し、この評価系が機能していることを確認した(図 3-11)。そこで 2 次スクリーニングを通過

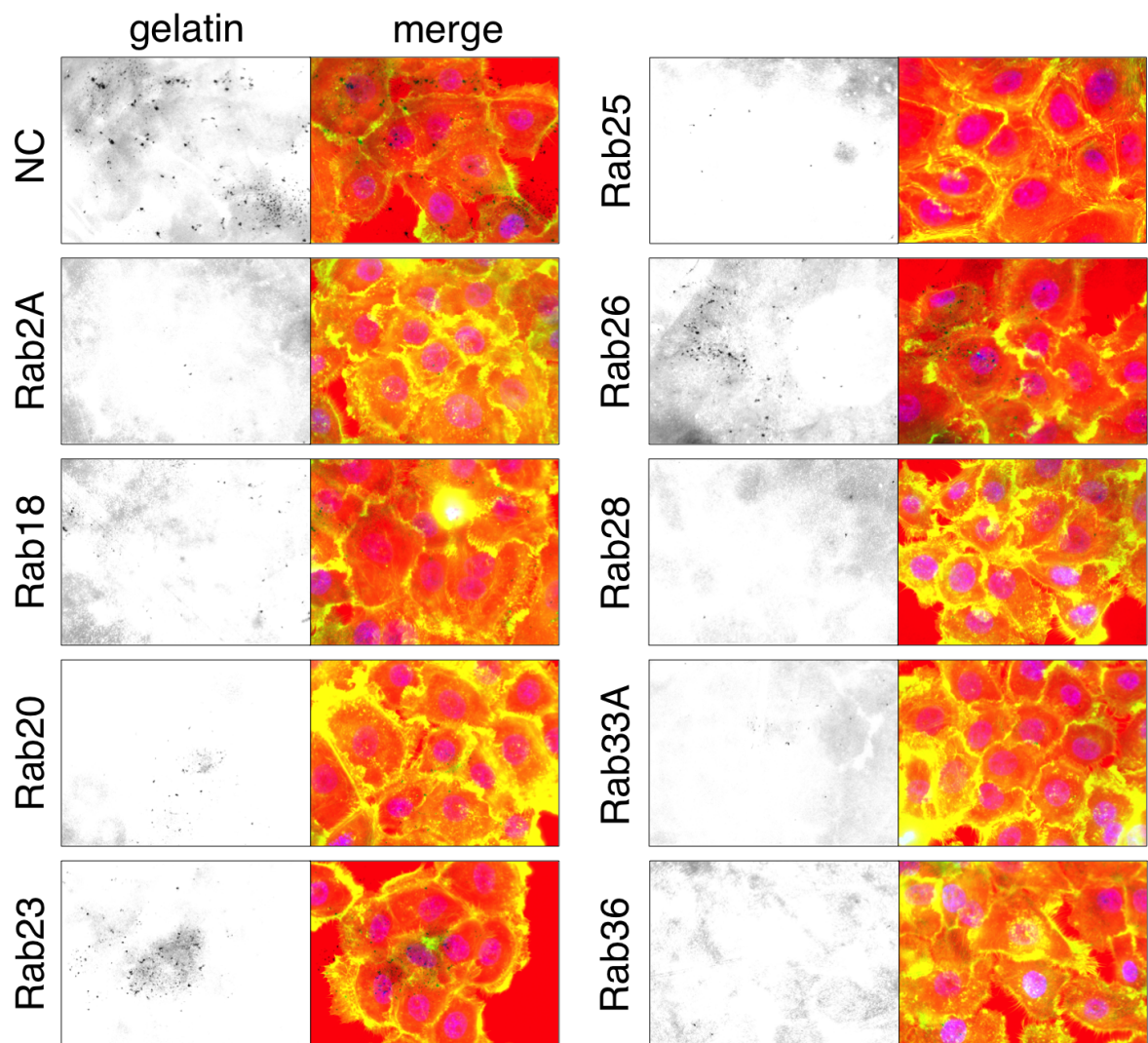


図 3-12. MCF10.DCIS.com 細胞によるゼラチン分解 (3 次スクリーニング)

蛍光ラベルしたゼラチンでカバースリップをコートし、その上で表記の siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞を培養し、24 時間 HGF による刺激を加えた後に、固定および染色を行った。定量結果は図 3-13 に示した。

倍率 ; 400 倍、赤 ; ゼラチン、緑 ; F-actin、青 ; DAPI

した候補因子に対し、siRNA を導入してゼラチン分解能を解析した(図 3-12、3-13A)。

なお、標的因子の mRNA の低下は qPCR 法を用いて確認した (図 3-13B)。Rab33A

の mRNA は検出できなかった。定量の結果、ゼラチンの分解を有する細胞の割合を

30 %以下に減少させる Rab を選出した。その際、細胞外基質の分解に関わるメタロ

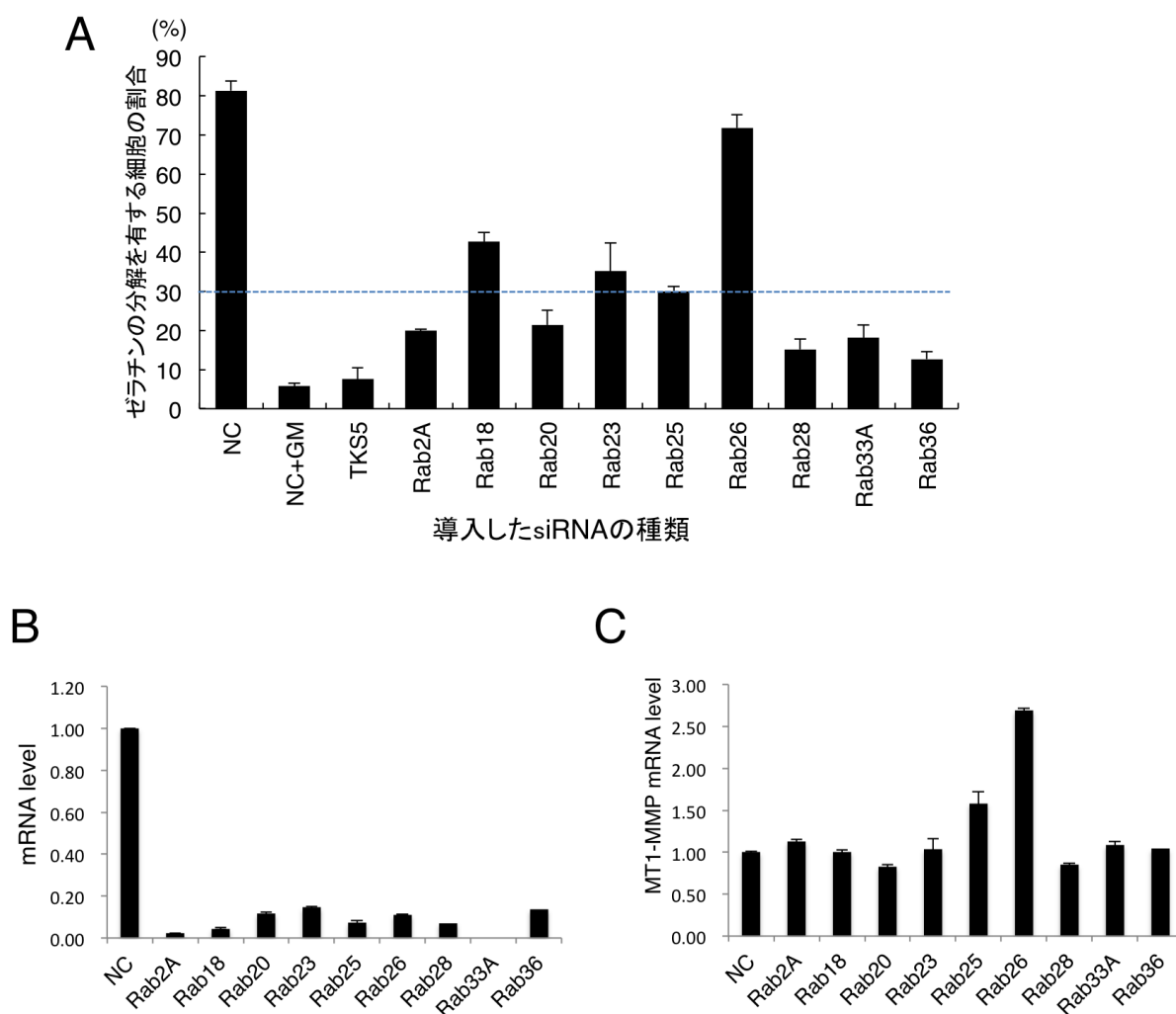


図 3-13. MCF10.DCIS.com 細胞によるゼラチン分解能の評価

(3 次スクリーニング)

MCF10.DCIS.com 細胞に表記の siRNA を導入し、ゼラチン分解アッセイを行った。(蛍光顕微鏡写真を図 3-12 に示した)

A. 計測した全細胞数におけるゼラチン分解を有する細胞の割合

B. アッセイに用いた細胞における siRNA の標的因子の mRNA 量

C. アッセイに用いた細胞における MT1-MMP の mRNA 量

プロテアーゼの中でも主要な役割を担うとされる MT1-MMP[81, 82]の mRNA を同時に定量したが、有意な減少を呈する因子は見られなかった。

インバースインベイジョンアッセイを用いた 4 次スクリーニング

ここまでで、細胞の浸潤の起点となる細胞外基質の分解について検討を行ったので、次に 3 次スクリーニングによって選ばれた Rab をノックダウンした際にがん細胞の細胞外基質への浸潤が抑制されるかを検討した。そこで、人工的に調整された基底膜構成成分であるマトリゲルを用い検討した。既報に基づき[83]、トランスウェル内でマトリゲルを固相化し、図 3-14 に示すように底面で MDA-MB-231 細胞を培養し、トランスウェルを反転後、上下にそれぞれ培地を入れて底面からマトリゲル内を上行した細胞数を比較した。一般的な浸潤を測定するトランスウェルを使ったアッセイでは、マトリゲルが塗布されたトランスウェルのチャンバー上槽の上に細胞を播種し、下槽への移行した細胞を計る。本アッセイでは上方への細胞の移行を計るため「イン

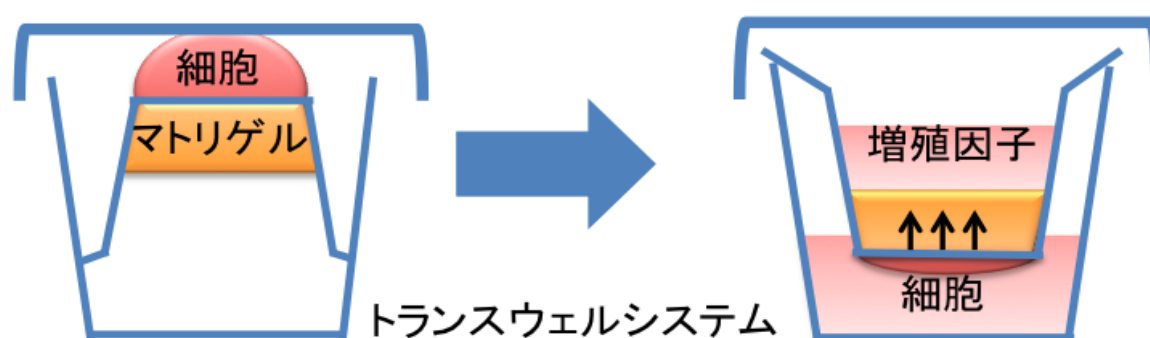


図 3-14. インバースインベイジョンアッセイの模式図

バースインベージョン」と呼ばれる。移行した細胞の数のみならず、移行した距離も測定できるため一般的な浸潤のアッセイよりもより詳しく解析することが可能である。本インバースインベージョンアッセイにおいて、トランスウェルのチャンバー上

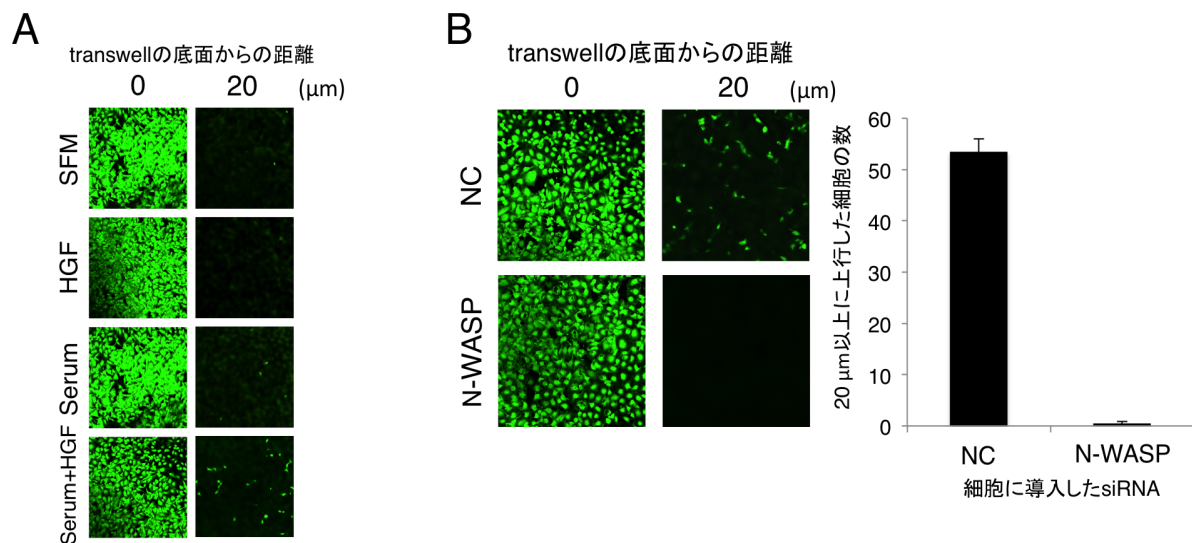


図 3-15. MDA-MB-231 細胞を用いたインバースインベージョンアッセイ
(予備検討)

MDA-MB-231 細胞を、トランスウェル内で個相化させたマトリゲルの中を 48 時間上行させ、Calcein を用いて生細胞を染色した後に、トランスウェルの底面と底面から 5 μm 毎の高さの断面を共焦点顕微鏡を用いて撮影した。

- A. トランスウェルの上のチャンバーに血清除去培地 (Serum free medium: SFM)、HGF を添加した血清除去培地 (HGF)、血清含有培地 (Serum) または HGF を添加した血清含有培地 (Serum+HGF) を加えた。トランスウェルの底面と底面から 20 μm の高さの断面を共焦点顕微鏡を用いて撮影した画像を示した。Serum +HGF のサンプルにおいて細胞の上行が最も促されている。
- B. HGF を添加した血清含有培地を加えトランスウェルの上のチャンバーに対し、表記の siRNA を導入した MDA-MB-231 細胞を上行させ、20 μm 以上の高さに上行した細胞数を計測した。

槽の培地の条件については事前に比較し、HGF を添加した血清含有培地を使用した際に最も細胞の上行が促進されたので（図 3-15A）、以降の実験はその条件下で行った。まず N-WASP の siRNA の導入により細胞の上行が大幅に抑制され、この系が機

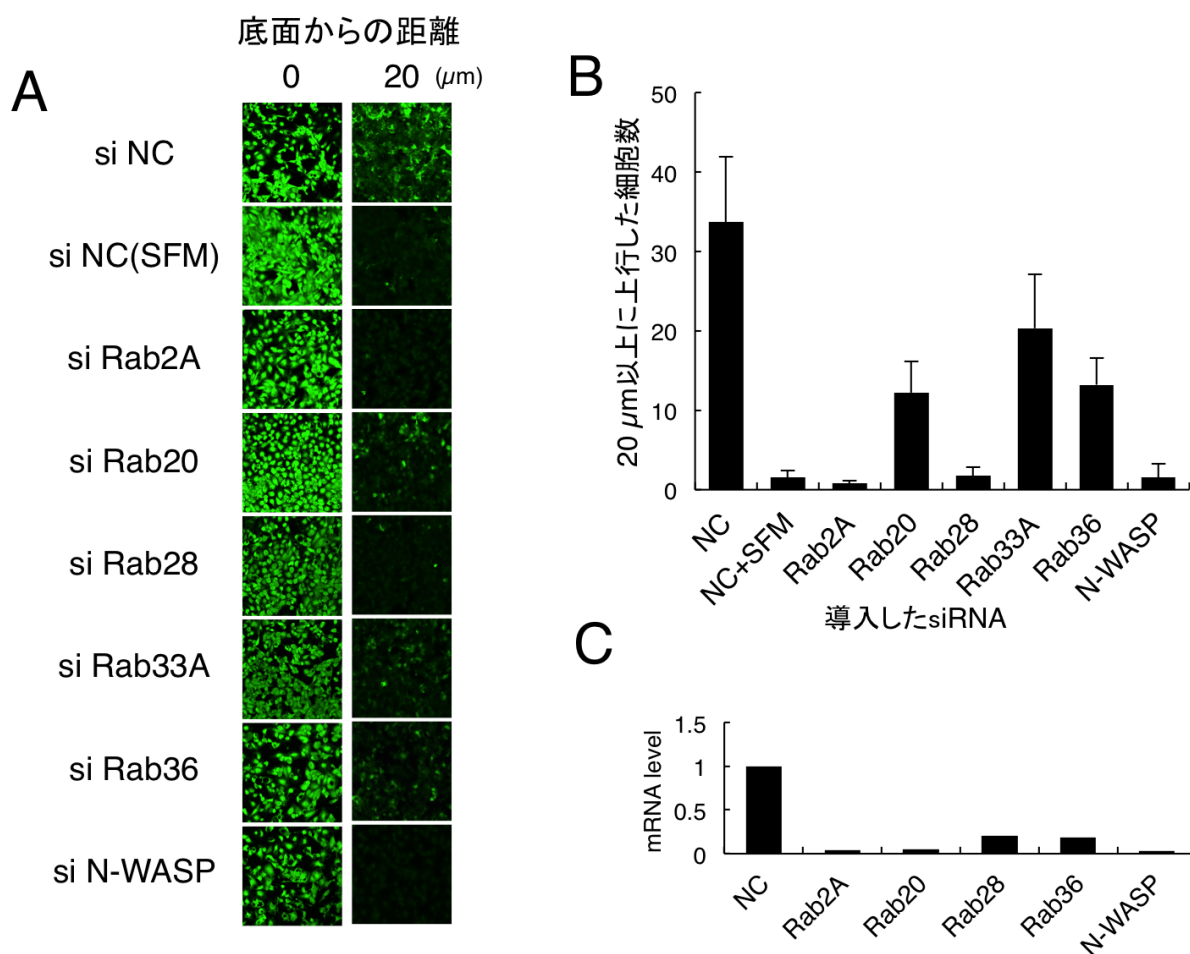


図 3-16. MDA-MB-231 細胞を用いたインバースインベジョンアッセイ（4 次スクリーニング）

表記の siRNA を導入した MDA-MB-231 細胞を、トランスウェル内で個相化させたマトリゲルの中を 48 時間上行させ、Calcein を用いて生細胞を染色した。

A. トランスウェルの底面と底面から 20 μm の高さの断面を共焦点顕微鏡を用いて撮影した画像。

B. 20 μm 以上の高さに上行した細胞数。

C. 本アッセイで用いた細胞の siRNA の標的因子の mRNA 量。Rab33A は測定不能。

能していることを確認した（図 3-15B）。3 次スクリーニングで選出した候補因子の siRNA を導入すると、候補となる全ての Rab の発現低下によって細胞の上行は抑制され、その抑制効果は Rab2A と Rab28 において著明であった（図 3-16A、B）。qPCR 法を用いて標的因子の mRNA の低下を確認した（図 3-16C）。

臨床検体では Rab2A のゲノムの増幅が見られる

過去のがんの検体を用いて実施された研究の結果を探索できる、メモリアルスローンケタリングがんセンターにより公開された web サイトである cBioPortal を用いて、乳がん患者における候補因子のゲノム上での変化（増幅、欠失、変異など）を調べた。その結果、表 3-4 および図 3-17 に示すように、候補因子の中では Rab2A が最も頻度が高く 8.4% の症例で増幅していた。この値は 3 次スクリーニングで挙げられた Rab の中でも最も高い値であるだけでなく、ヒト全 Rab の中でも 5 番目（64 種類中）で

Gene	Percent sample amplification
Rab2A	8.4%
Rab20	2.7%
Rab36	1.1%
Rab33A	0.5%
Rab28	0.2%

あった。さらに、乳がん検体において Rab2A が高発現している患者では低発現の患者に比べ転移の頻度が有意に上昇していた（Kajiho H. ら、未発

表 3-4. 4 次スクリーニング通過因子の浸潤性乳がんにおける増幅の頻度

表）。

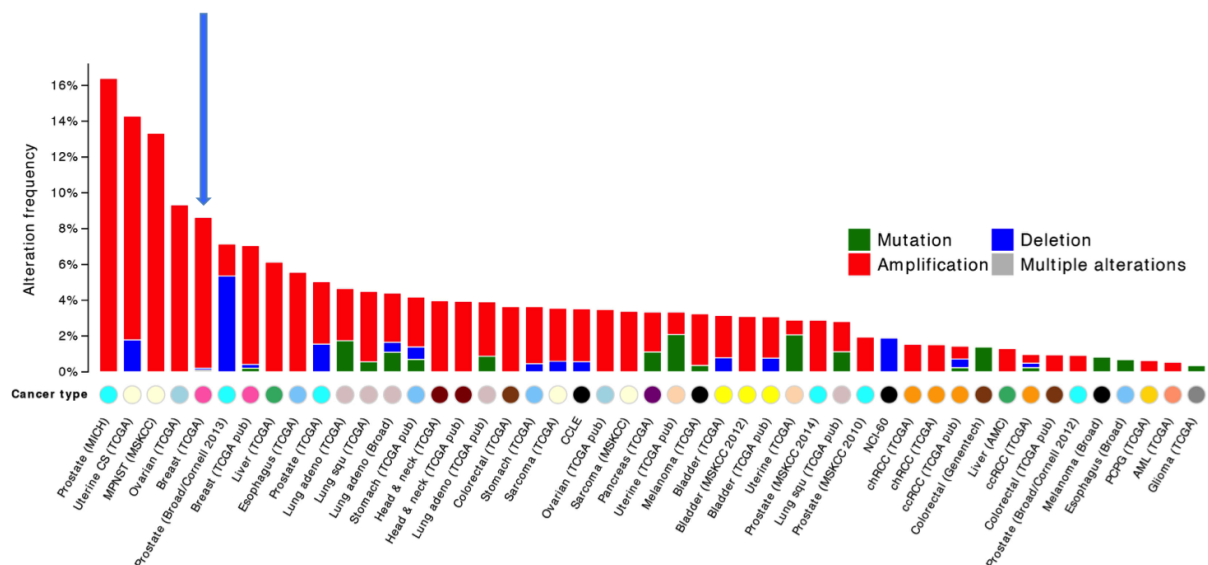


図 3-17. cBioPortal を用いた各種がん患者における Rab2A のゲノムの変異の頻度の解析

緑；変異、赤；増幅、青；欠失、灰；複数の変化。乳がんを青矢印で示した。

以上のスクリーニングの結果から、Rab2A が浸潤における重要な因子であることが強く示唆されたので、以降 Rab2A について詳細を検討することとした。

Rab2A の過剰発現によって乳がん細胞のゼラチン分解能は上昇し、siRab2A の導入によるゼラチン分解能の低下はレスキューされる

Rab2A の発現抑制により乳がん細胞のゼラチン分解能が低下することがスクリーニングにより分かったので、次に Rab2A の発現の増加によりゼラチン分解能が亢進するかを検討した。マウス Rab2A はヒト Rab2A とアミノ酸レベルで 99%の相同性を持つことから同等の機能を有すると期待されるだけでなく、ヒト Rab2A に対する siRNA のターゲット配列に対応するマウス Rab2A の塩基配列が完全一致しないこと

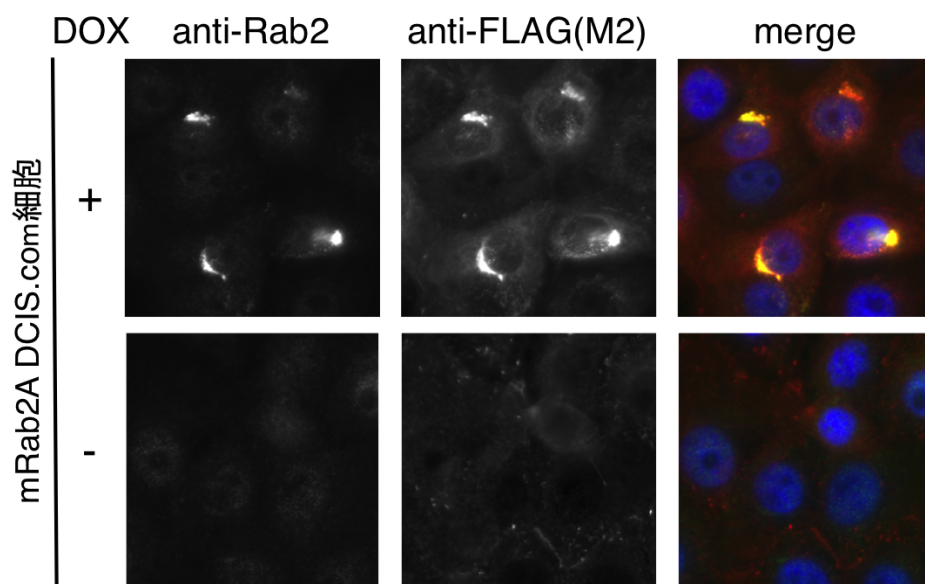


図 3-18. mRab2A DCIS.com 細胞の免疫染色

mRab2A DCIS.com 細胞にドキシサイクリン（DOX）を加え培養した後に、細胞を固定し表記の抗体で免疫染色を行った。倍率；400 倍
 緑；anti-Rab2、赤；anti-FLAG(M2)、青；DAPI

から後述のレスキュー実験にも用いることができる事を期待して、ドキシサイクリン存在下で因子の発現が誘導される Tet-on システムを用い、FLAG タグが付いたマウス由来の Rab2A を過剰発現する MDA-MB-231 細胞（以下 mRab2A MDA-MB-231 細胞）ならびに MCF10.DCIS.com 細胞（以下 mRab2A DCIS.com 細胞）、またそれぞれに対する空ベクターの細胞（以下 EV MDA-MB-231 細胞および EV DCIS.com 細胞）を作製した。作製した細胞がドキシサイクリン依存的にマウス Rab2A を発現することを免疫染色で確認した（図 3-18）。mRab2A MDA-MB-231 細胞ならびに mRab2A DCIS.com 細胞を用いて蛍光ゼラチンの分解能を調べたところ、ドキシサイクリン添加の有無、すなわちマウス Rab2A の発現誘導によってゼラチン分解能が上

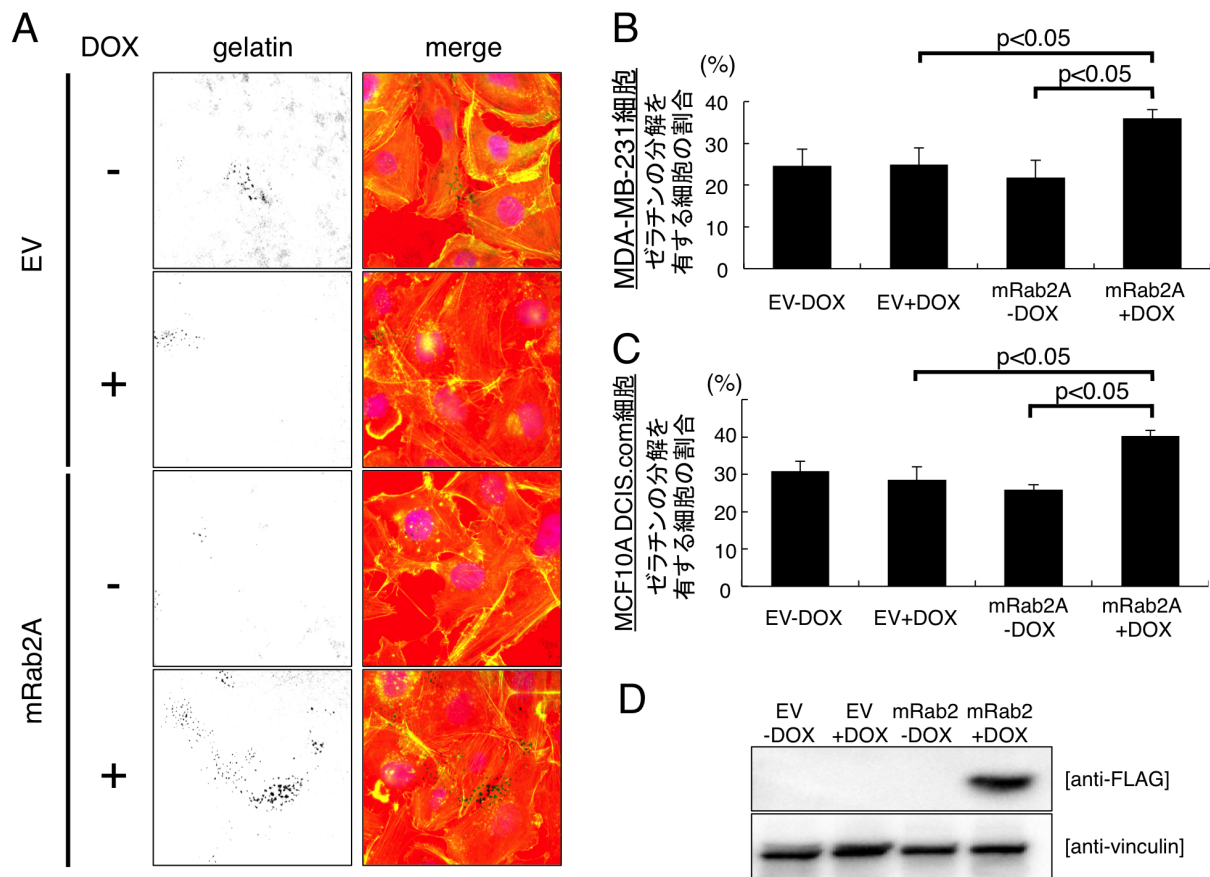


図 3-19. mRab2A の過剰発現によりゼラチン分解能が上昇する

- A. mRab2A DCIS.com 細胞 (mRab2A) および EV DCIS.com 細胞にドキシサイクリンを添加し、蛍光ラベルしたゼラチンでコートしたカバースリップの上で培養し、固定後に染色を行った。倍率；400 倍、赤；ゼラチン、緑；F-actin、青；DAPI
- B. mRab2A MDA-MB-231 細胞 (mRab2A) および EV MDA-MB-231 細胞 (EV) におけるドキシサイクリン添加の有無 (±DOX) による、ゼラチンの分解を有する細胞の割合の変化
- C. mRab2A DCIS.com 細胞 (mRab2A) および EV DCIS.com 細胞 (EV) におけるドキシサイクリン添加の有無 (±DOX) による、ゼラチンの分解を有する細胞の割合の変化
- D. C で用いた細胞を溶解後ウエスタンブロッティングし表記の抗体で検出した。

昇した (図 3-19)。解析に用いた個々の細胞におけるマウス Rab2A の発現は、免疫染色によって確認した。

次に、Rab2A の発現抑制によるゼラチン分解能の低下がマウス Rab2A の過剰発現によって回復するか検討した。mRab2A MCF10.DCIS.com 細胞にヒト Rab2A の siRNA を導入し、その後マウス Rab2A の発現を誘導したところ、ゼラチン分解能は Rab2A の発現抑制により低下し、その低下はマウス Rab2A の過剰発現により回復した (図 3-20)。Rab2A の発現低下は qPCR 法にて確認し(データ非表示)、個々の細胞のマウス Rab2A の発現は、免疫染色によって確認した。これらの結果より、Rab2A siRNA 導入時のゼラチン分解能の低下が Off target によるものではないことが明らかとなった。

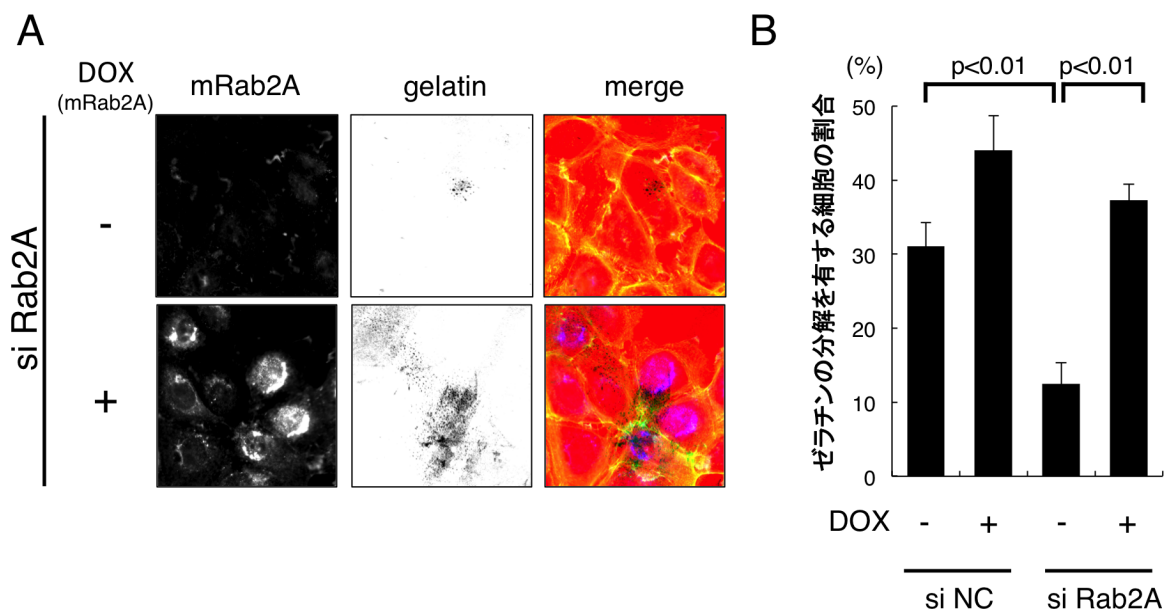


図 3-20. ヒト Rab2A の siRNA を導入後にマウス Rab2A を発現させた MCF10.DCIS.com 細胞のゼラチン分解能の変化

図の説明は次頁

図 3-20. ヒト Rab2A の siRNA を導入後にマウス Rab2A を発現させた MCF10.DCIS.com 細胞のゼラチン分解能の変化

A. mRab2A MCF10.DCIS.com 細胞にヒト Rab2A の siRNA を導入し、翌日からドキシサイクリン (DOX) を添加し、蛍光ゼラチンでコートしたカバースリップの上で培養し、固定後免疫染色を行った。

倍率 ; 400 倍、赤 ; ゼラチン、緑 ; F-actin、青 ; Rab2A

B. A の系における、計測した全細胞数あたりのゼラチンの分解を有する細胞の割合 NC ; ネガティブコントロール

Rab2A の発現低下は乳がん細胞のスフェロイドの周囲への浸潤を抑制する

次に、3 次元での浸潤における影響を探るために、3 次元培養において Rab2A の発現の低下ががん細胞の浸潤を抑制するかを検討した。が

ん細胞を細胞外基質成分の中で培養すると、球状のスフ



ェロイドを形成し増殖する。スフェロイドの状態での 3

図 3-21. スフェロイドの模式図

次元培養は、表面にある細胞と内部の細胞において酸素条件が異なる等の点から、2 次元培養より生体内のがんの挙動に近いと考えられている[84]。

スフェロイドの形成の実験で使用するために、ドキシサイクリン存在下では short hairpin RNA (shRNA) の誘導により標的因子の発現が抑制される Tet-on システムを用い、Rab2A の発現抑制を誘導できる MDA-MB-231 細胞 (以下 shRab2A

MDA-MB-231 細胞) ならびに MCF10.DCIS.com 細胞 (以下 shRab2A DCIS.com 細

胞) を作製した。作製後、この細胞がドキシサイクリンの誘導によって、Rab2A の mRNA 量を減少させるが MT1-MMP の mRNA 量に有意な変化は見られないこと (図 3-22)、およびゼラチン分解能を低下させること (図 3-23A、B) を確認した。

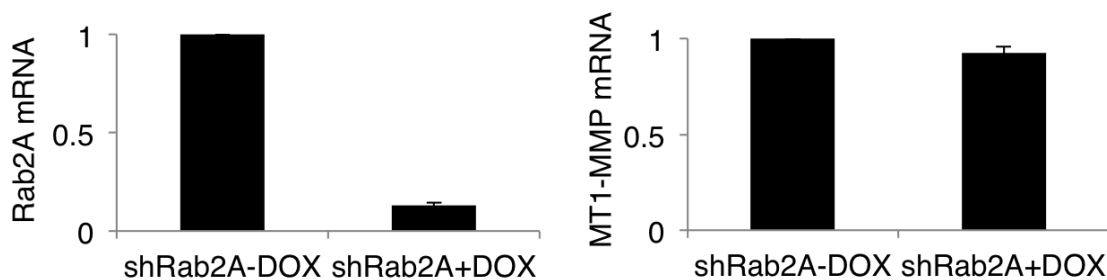


図 3-22. shRab2A DCIS.com 細胞におけるドキシサイクリン (DOX) の添加による Rab2A および MT1-MMP の mRNA 量の変化
DOX の添加により、Rab2A の mRNA 量は減少するが、MTA-MMP の mRNA 量は変化しない。

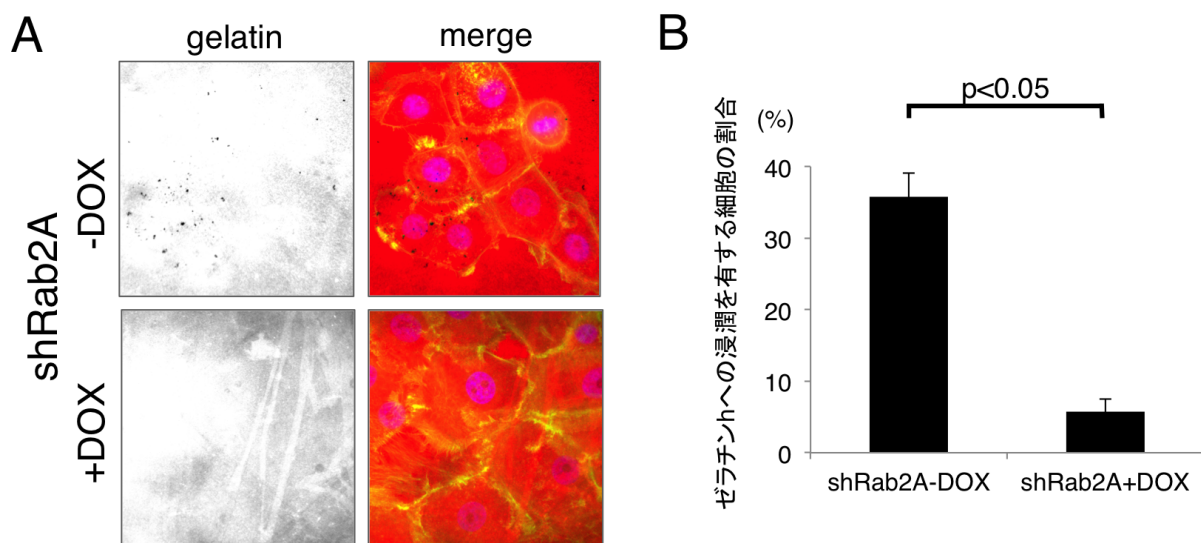


図 3-23. shRab2A DCIS.com 細胞におけるドキシサイクリン (DOX) の添加によるゼラチン分解能の変化

- A. shRab2A DCIS.com 細胞に DOX を添加し、蛍光ゼラチンでコートしたカバースリップス上で培養し、固定後染色した。倍率；400 倍
赤；ゼラチン、緑；F-actin、青；DAPI
- B. A の系における計測した全細胞中のゼラチン分解を有する細胞の割合

作製した細胞を用いて、まず市販されている Cultrex 3-D Spheroid cell invasion assay kit を使用しスフェロイド形成を行った。このキットではスフェロイドを形成した後、基底膜成分およびコラーゲンを含む invasion matrix を加えると、MDA-MB-231 細胞は紡錘様に突出し周囲に浸潤する。まず、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 の添加により浸潤が抑制され評価系が機能していることを確認した。この系において、shRab2A MDA-MB-231 細胞はドキシサイクリンの誘導によって周囲への浸潤が低下した (図 3-24A)。スフェロイドを形成した後の断面積の経時変化を図 3-24B に示した。このキットを MCF10.DCIS.com 細胞に応用した報告はないが、細胞数などの条件検討を行った上で (データ非表示)、shRab2A MCF10.DCIS.com

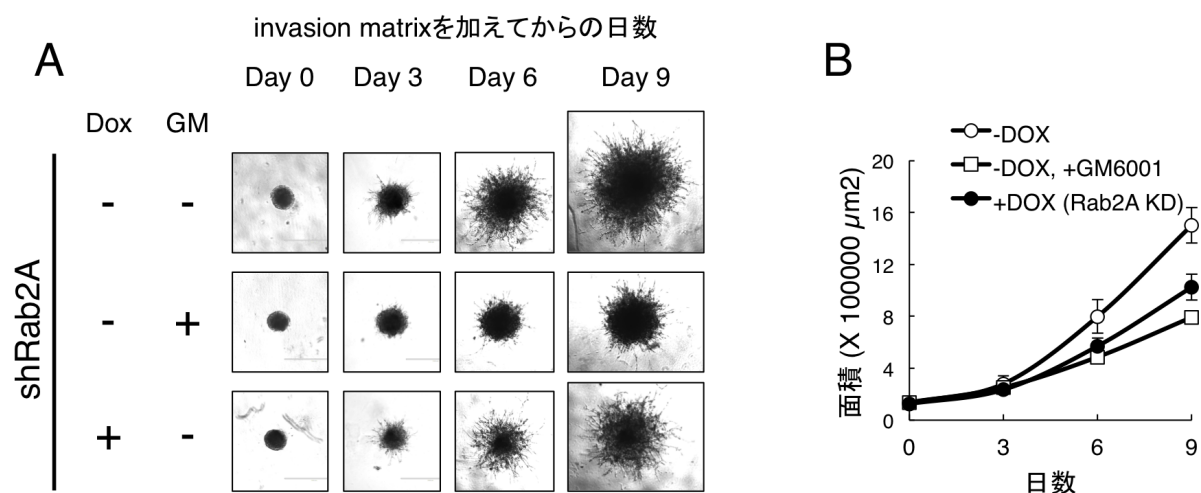


図 3-24. MDA-MB-231 細胞の Cultrex を用いた 3D 浸潤アッセイ

shRab2A MDA-MB-231 細胞を用いて、スフェロイドを形成後ドキシサイクリン (DOX) またはメタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 (GM) を添加後の 3 次元への浸潤の変化を観察した。

A. invasion matrix を加え浸潤を開始させた後のスフェロイドの形態

B. スフェロイドの断面積の経時変化

細胞を培養したところ、ドキシサイクリンの誘導によって周囲への浸潤が低下した

(図 3-25)。

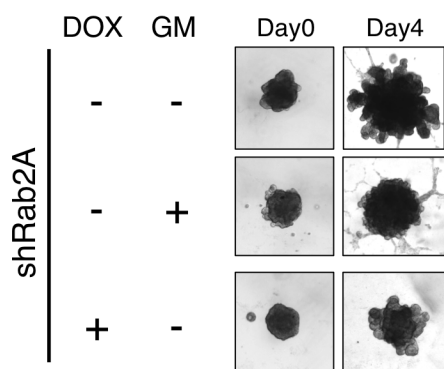


図 3-25. MCF10.DCIS.com 細胞の Cultrex を用いた 3D 浸潤アッセイ

shRab2A DCIS.com 細胞を用いて、スフェロイドを形成後ドキシサイクリン (DOX) またはメタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 (GM) の添加後の 3 次元への浸潤の変化を観察した。

更に MCF10.DCIS.com 細胞において、同細胞のスフェロイド形成の既報に従い[85, 86]マトリゲルとコラーゲンを混合し、その中でスフェロイドを形成させた。表面が整なスフェロイドを形成後、周囲の培地に HGF を添加すると周囲の基質成分に浸潤を開始する (図 3-26)。MCF10A の培養条件に必要な epidermal growth factor (EGF) にさらに HGF を加えた系で周囲への浸潤が最も顕著であることを確認した (図 3-27)。

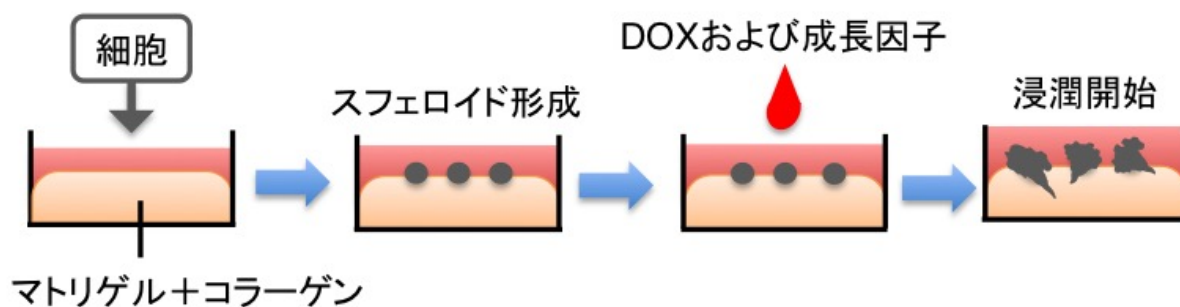


図 3-26. マトリゲルとコラーゲンをを用いたスフェロイドアッセイの模式図

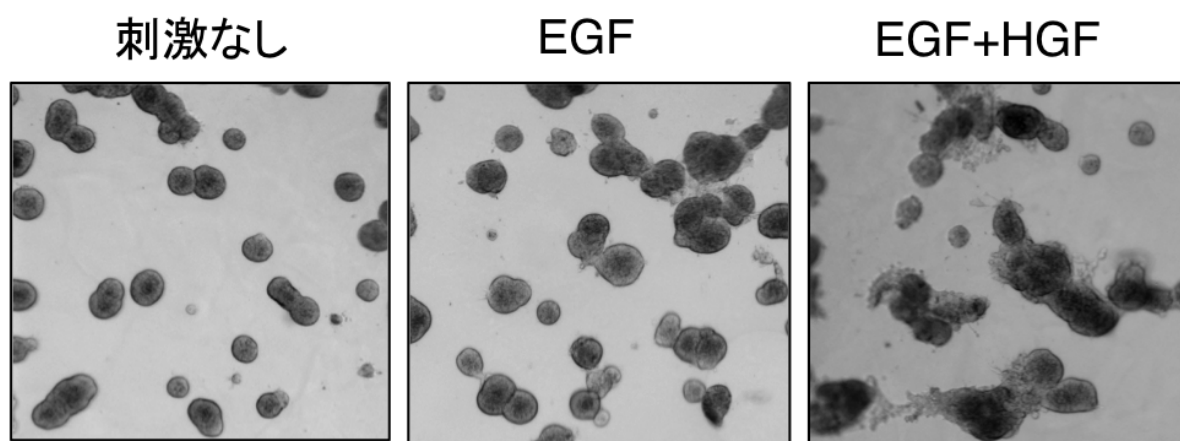


図 3-27. MCF10.DCIS.com 細胞によるコラーゲンとマトリゲルを用いた 3-D 浸潤アッセイ（予備検討）

コラーゲンとマトリゲルを混合し、その上に MCF10.DCIS.com 細胞を培養しスフェロイドを形成した後に、EGF 単独または EGF および HGF による刺激を行った。EGF および HGF による刺激により最も周囲の浸潤が促された。

この 3 次元培養系を用い shRab2A DCIS.com 細胞の浸潤を調べたところ、EGF および HGF を添加したスフェロイドにおいて、ドキシサイクリンによる shRab2A の誘導により周囲の基質への浸潤は抑制された（図 3-28A）。また、スフェロイドの断面に対し、面積 $\times 4\pi / (\text{円周})^2$ を Circularity として算出すると、Circularity が 1 に近いほどスフェロイド断面は正円に近く、値が小さい程表面が不整であり細胞がスフェロイドから周囲に浸潤を来していることが示される[86]。図 3-28B に示す通り、EGF および HGF を添加したスフェロイドにおいて、ドキシサイクリンの誘導により Circularity は有意に上昇した。用いた細胞の mRNA は qPCR 法により、Rab2A の発現低下を確認した。以上の結果より、Rab2A の発現低下によってスフェロイドの周囲への浸潤が抑制されることが示唆された。

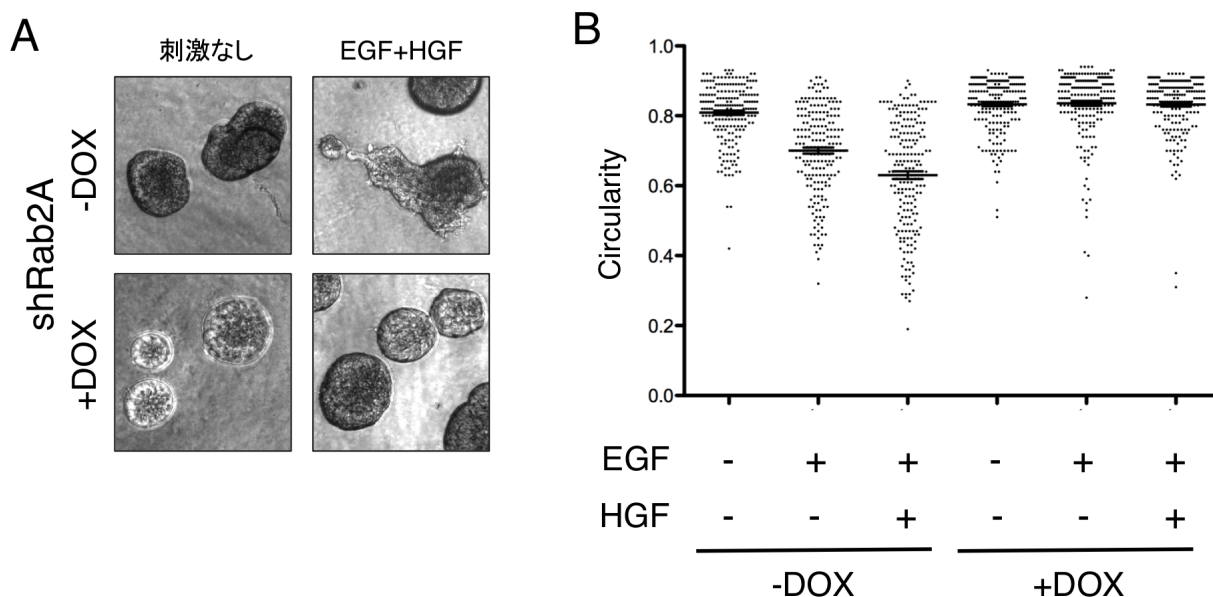


図 3-28. shRab2A DCIS.com 細胞によるコラーゲンとマトリゲルを用いた 3-D 浸潤アッセイ

コラーゲンとマトリゲルを混合し、その上に shRab2A DCIS.com 細胞を培養しスフェロイドを形成した後に、ドキシサイクリン (DOX) を添加し、さらに EGF および HGF による刺激を行った

A. 刺激開始 9 日後のスフェロイドの形態

B. 刺激開始 9 日後における、各スフェロイドの断面積 $\times 4\pi / (\text{円周})^2$ で算出される Circularity。Circularity が 1 に近いほど正円に近く、値が小さい程表面が不整であり周囲に浸潤を来していることが示される

Rab2A のエフェクターの発現低下によっても MCF10.DCIS.com 細胞のゼラチンの分解能は低下する

次に、Rab2A が浸潤に関与する分子機序を検討した。低分子量 GTP タンパク質は、GDP の結合した不活性型と GTP の結合した活性型をとり、活性型に固有のエフェクタータンパク質が結合することで、小胞輸送を促進する (図 3-29)。そのため、Rab2A

のエフェクターが浸潤に関与すると仮説を立て、検討を開始した。



図 3-29. Rab ファミリーの活性変化の模式図

まず、エフェクターとして既報のある Golgi reassembly stacking protein of 55 kDa (GRASP55、別称 golgi assembly stacking protein (GORASP) 2) [87]について、その発現低下がゼラチン分解能を変化させるか検討した。GRASP55 はゴルジ体に局在し、その形態を制御する機能を持つ[88]。代表的メタロプロテアーゼである MT1-MMP はゴルジ体に多く局在する furin によって活性化され[81, 89]、GRASP55、furin および MT1-MMP は複合体を形成し、この複合体の形成不全は MT1-MMP の活性化を阻害する[90]。また、GRASP55 は種々のタンパク質の糖鎖修飾に関与し[88]、MT1-MMP は細胞内で O 糖鎖修飾の障害により活性が低下する[91, 92]。この点に関しては、O 型糖鎖修飾の阻害剤である Benzyl GalNAc の添加により、MCF10.DCIS.com 細胞のゼラチン分解能が低下することを確認した(data 非表示)。

GRASP55 の siRNA 導入により MCF10.DCIS.com 細胞のゼラチン分解能

は低下した (図 3-30A)。GRASP55 の mRNA 量の低下は qPCR 法で確認した (図 3-30B)。

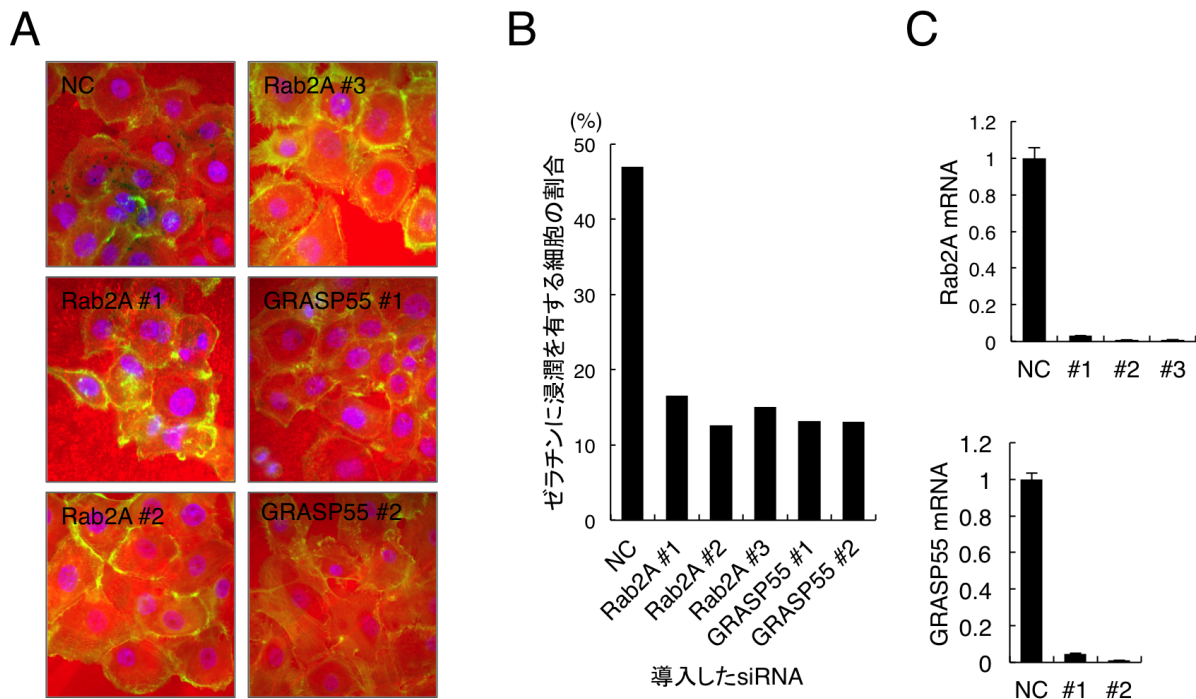


図 3-30. GRASP55 の siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞におけるゼラチン分解能の変化

MCF10.DCIS.com 細胞に複数の種類の GRASP55 および Rab2A の siRNA を導入し、蛍光ラベルしたゼラチンでコートしたカバースリップの上で培養し、固定後染色し蛍光顕微鏡で観察した。

- A. 各々の細胞の画像。赤；ゼラチン、緑；F-actin、青；DAPI
- B. 計測した全細胞数におけるゼラチンの分解を有する細胞の割合
- C. siRNA の標的因子の mRNA の変化

GRASP55 の発現低下により、ゴルジ体の局在が散在するという既報[93]があるため、

Rab2A の発現低下によるゴルジ体の局在を観察したところ、shRab2A DCIS.com 細

胞においてシスゴルジのマーカである GM130 のシグナルは散在化した(図 3-31)。

また、小胞体で合成されたタンパク質が細胞内の様々な部位に輸送される際に小胞体-ゴルジ中間体区画 (ER-golgi intermediate compartment ; ERGIC)、シスゴルジ (cis Golgi network ; cis Golgi) およびトランスゴルジ網 (trans Golgi network ; TGN) を経由していく (図 3-32、[94]より一部改変)。マウス Rab2A を過剰発現すると ERGIC

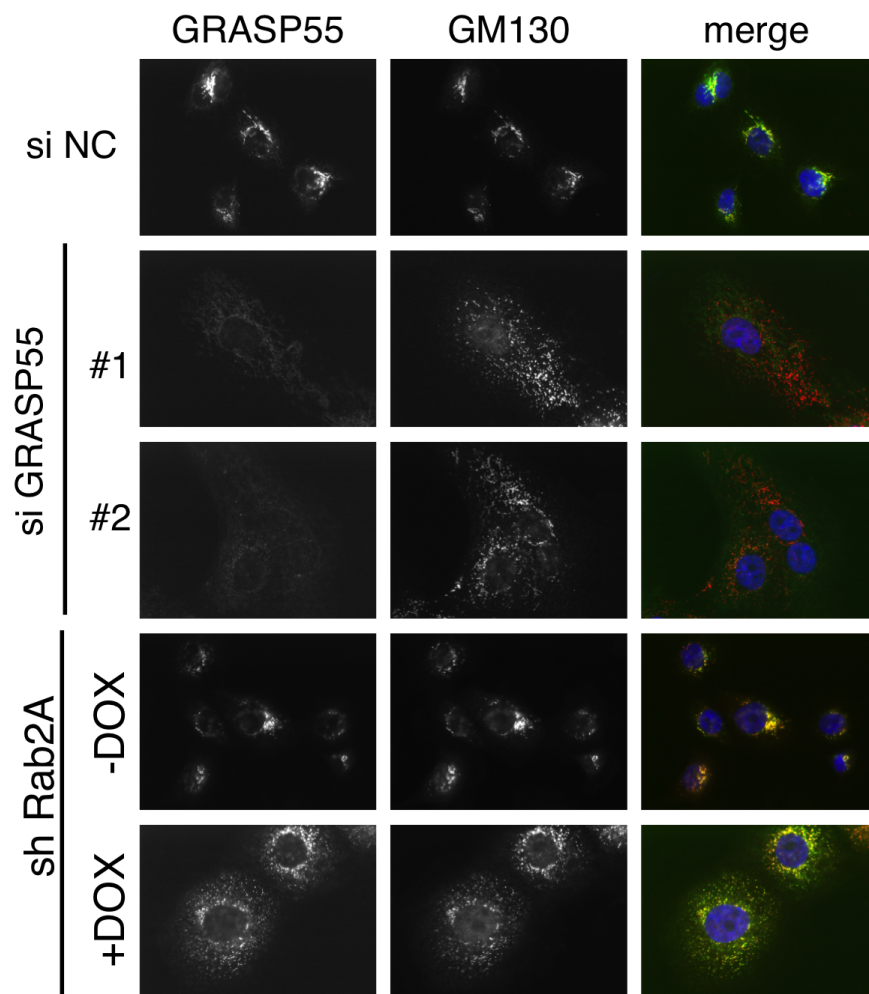


図 3-31. Rab2A および GRASP55 の発現低下による細胞内のゴルジ体の局在の変化

ネガティブコントロール (NC) または GRASP55 の siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞、およびドキシサイクリンを添加した shRab2A DCIS.com 細胞を、固定後表記の抗体を用いて免疫染色を行った。

緑 ; GRASP55、赤 ; GM130 (シスゴルジのマーカー)、青 ; DAPI

に局在する ERGIC53、TGN に局在する TGN46、および GM130 はより凝集した。

これらは Rab2A の siRNA の導入によりいずれも散在化し、その後マウス Rab2A を過剰発現すると再び凝集した（図 3-33）。

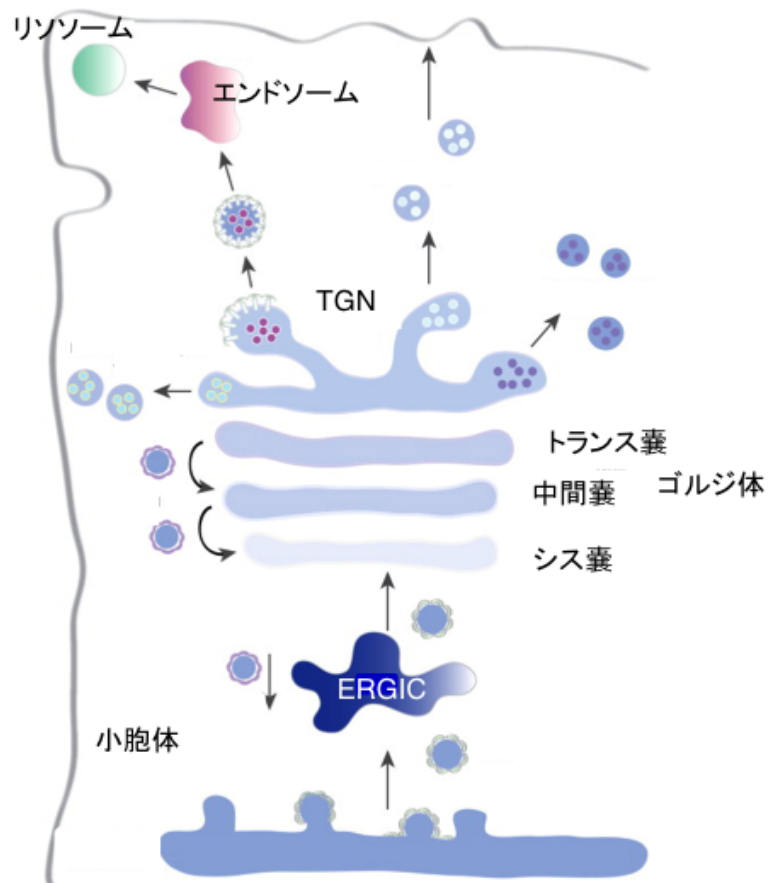


図 3-32. ゴルジ体を経由する小胞輸送の模式図

TGN ; トランスゴルジ網、ERGIC ; 小胞体-ゴルジ中間体区画

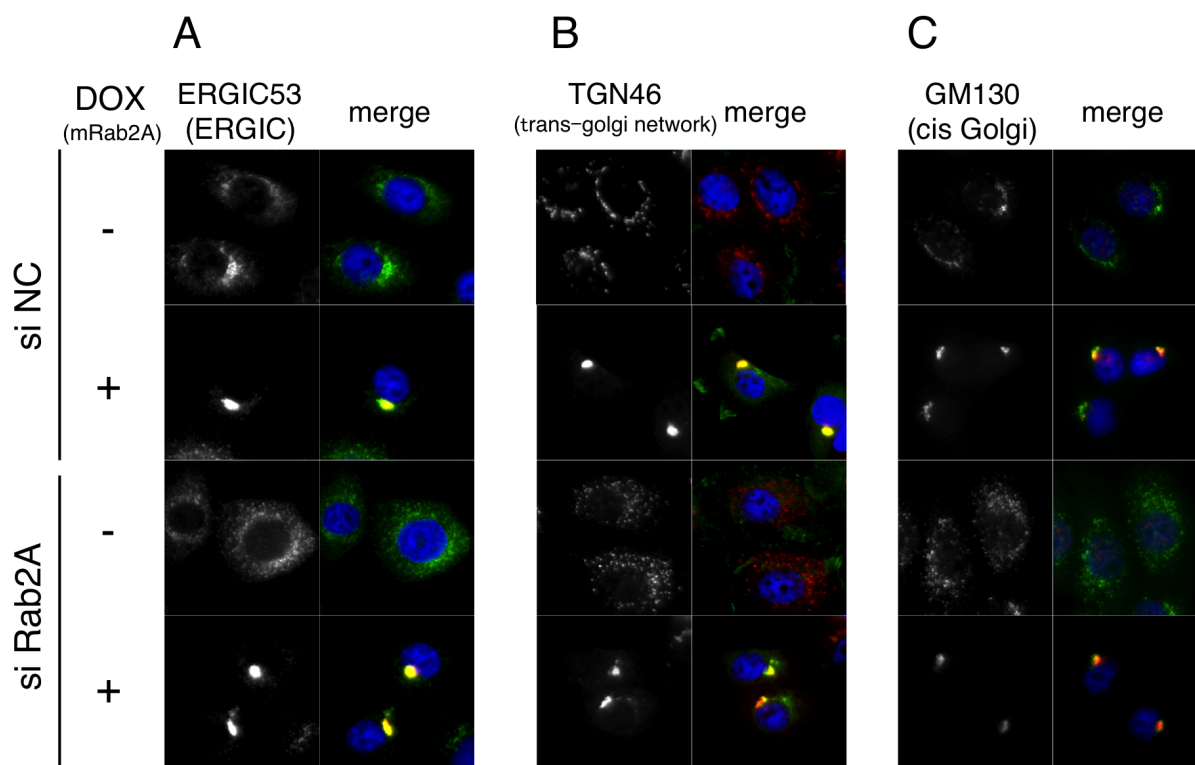


図 3-33. mRab2A DCIS.com 細胞における Rab2A の siRNA 導入後のマウス Rab2A 発現による ERGIC53、TGN46 および GM130 の局在の変化
ネガティブコントロール (NC) または Rab2A に対する siRNA を導入した mRab2A DCIS.com 細胞にドキシサイクリン (DOX) を付加し培養し固定後、ERGIC、TGN および cis Golgi に局在する表記のタンパク質に対する抗体で免疫染色を行った。

A. 緑 ; ERGIC53、赤 ; Rab2A、青 ; DAPI

B. 緑 ; Rab2A、緑 ; TGN46、青 ; DAPI

C. 緑 ; GM130、赤 ; Rab2A、青 ; DAPI

また、最近に入り homotypic fusion and vacuole protein sorting(HOPS)に含まれ
後期エンドソームに局在する vacuolar protein sorting (VPS) 39 が Rab2A の新規
エフェクターであることが報告された[95]。VPS39 は Rab7 の Guanine-nucleotide
exchange factor (GEF) であり、エンドソームに Rab7 をリクルートする作用を持
つことが知られている[96]。Gillingham らは、ショウジョウバエの細胞において

Rab2A の活性化型を過剰発現すると、VPS39 過剰発現時と同様に後期エンドソームが巨大化し Rab2A が後期エンドソームに局在する Rab7 と共局在すると報告した [95]。この VPS39 の siRNA を導入することによってもゼラチンの分解能は低下した (図 3-34)。

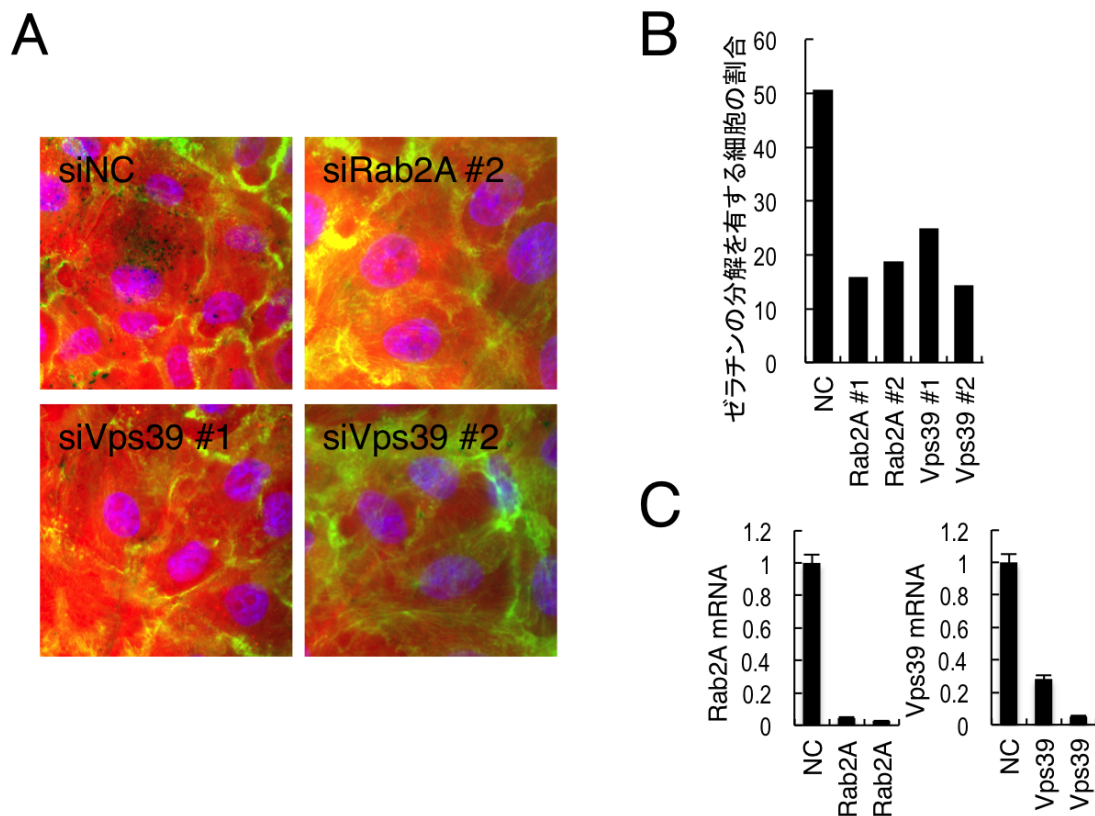


図 3-34. VPS39 の siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞のゼラチン分解能

蛍光ラベルしたゼラチンでカバースリップをコートし、その上でネガティブコントロール (NC)、Rab2A または VPS39 の siRNA を導入した MCF10.DCIS.com 細胞を培養し固定後染色した。

A. 赤 ; ゼラチン、緑 ; F-actin、青 ; DAPI

B. 計測した全細胞中のゼラチンの分解を有する細胞の割合

C. siRNA の標的因子の mRNA の変化

III-IV. 考察

がん化した上皮細胞において形態を制御することは、浸潤を進行させる鍵となっている。低分子量 G タンパク質のうち小胞輸送を司る Rab ファミリーはその作用から浸潤に影響を与える可能性が示唆されるが、全 Rab ファミリーについて浸潤に対する影響を網羅的に検討した報告はない。本研究では、全 Rab ファミリーに対する siRNA ライブラリーを用い、乳がん由来の MDA-MB-231 細胞において細胞外基質であるゼラチン分解能の変化を指標にスクリーニングを行った。加えて、異なる乳がん細胞である MCF10.DCIS.com 細胞におけるゼラチン分解能への影響と、3 次元方向への細胞外基質への浸潤への影響ならびに臨床検体での発現の増加を検討し、Rab2A を乳がんの浸潤に関わる因子として同定した。Rab2A の過剰発現は乳がん細胞のゼラチン分解能を亢進し、また Rab2A の発現低下によるゼラチン分解能の低下を救済したことから Rab2A の発現は *in vitro* の系において乳がん細胞の浸潤に重要であると考えられた。より生体内に近い細胞培養条件である 3 次元スフェロイドにおいても Rab2A の発現低下は周囲への浸潤を低下させ、Rab2A が 3 次元でも浸潤に重要であることが示された。また Rab2A の発現低下ならびに過剰発現によってゴルジ体の局在は変化し、Rab2A のエフェクターである GRASP55 および VPS39 の発現低下によっても細胞のゼラチン分解能は低下することが分かった。

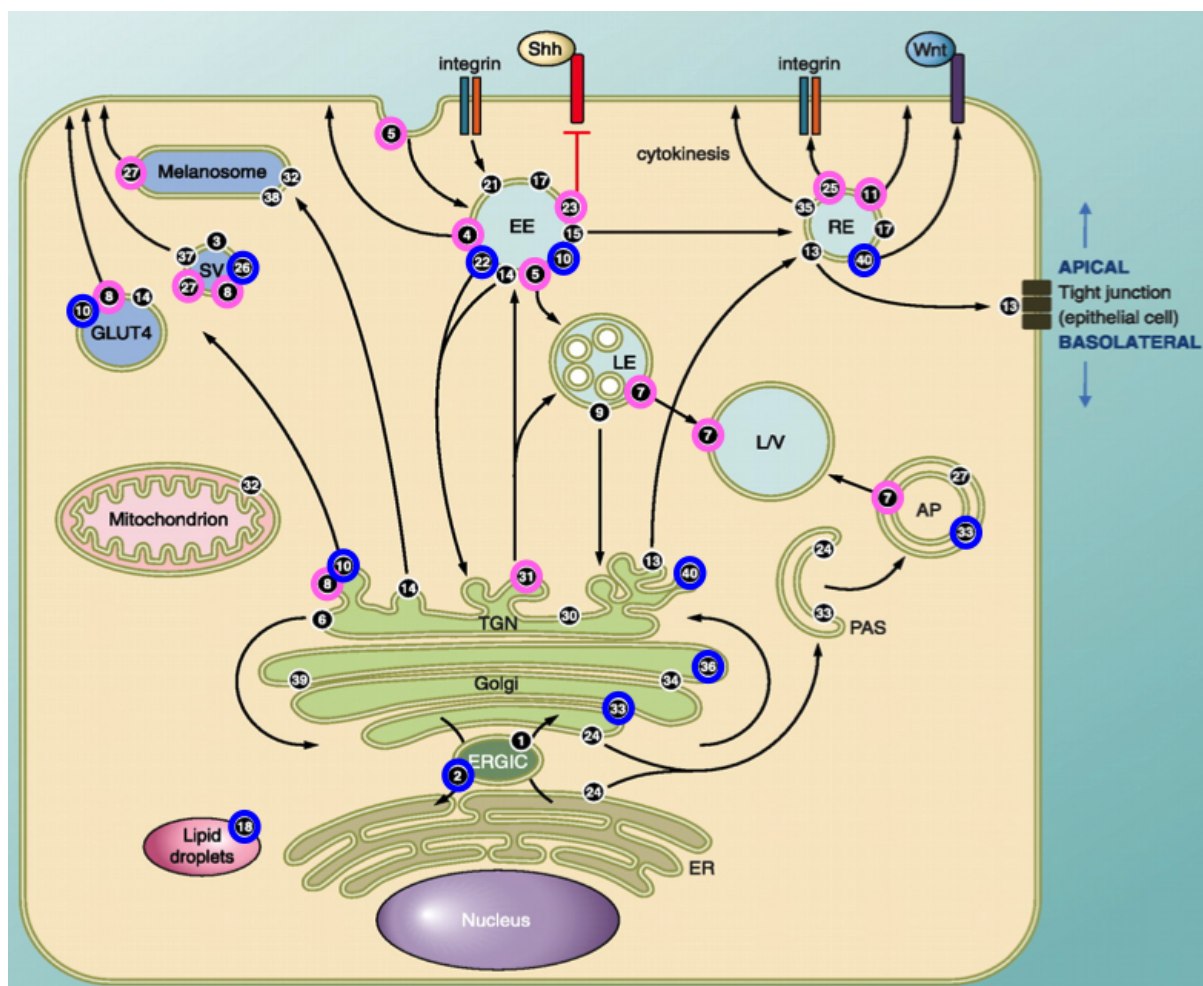


図 3-35. MDA-MB-231 細胞を用いた 1 次および 2 次スクリーニングにおいて、乳がんへの関与の可能性が指摘された Rab の局在の模式図

本スクリーニングで新規に選出した Rab を青色の丸で、過去にがんの浸潤への既報のある Rab を桃色の丸で示した。

Rab ファミリーのがんの浸潤における役割については未解明な点が多いが、今回 Rab ファミリーにおいて既報のない多数の因子がゼラチンの分解能を制御している可能性が新たに示唆され、小胞輸送とがんの浸潤に深い関連があることが改めて示された。2 次スクリーニングを通過し MDA-MB-231 細胞において浸潤に関与すると考えられる Rab を図 3-35 ([72]より一部改変) に示した。スクリーニングによって同

定された **Rab** の浸潤への作用機序については、それぞれの細胞内局在ならびに主要な機能が異なることから個々の制御システムを持つ可能性がある。ただ、以下の 2 点の場合は機序に共通性があると想定される。一つ目は、細胞外基質分解に必須である物質が、複数の **Rab** によって細胞内のオルガネラから形質膜まで輸送される場合である。例えば代表的メタロプロテアーゼである **MT1-MMP** は、まず形質膜から初期エンドソームまで運ばれ、リサイクリングエンドソームや後期エンドソームなどを経由して再び膜へ運ばれると推測されている[81]が、必須な因子が同定されているのみでその全体像は明らかとなっていない。さらに小胞体で生合成された **MT1-MMP** の膜への輸送経路も未解明であり、これらに複数の **Rab** が関与している可能性は充分に考えられる。また、二つ目は **Rab** がカスケードを形成する場合である。特定の **Rab** 間においては、活性化型の **RabX** がエフェクターとして次の **RabY** の **GAP** や **GEF** にあたる物質を結合し、**RabY** の活性化型を変化させる一連の機構（**Rab** カスケード、図 3-36、[97]より引用）

を有し非常に密接な関連を保持しており、その **Rab** カスケードは小胞輸送のみならず細胞内器官の成熟にも関与している可能性が示さ

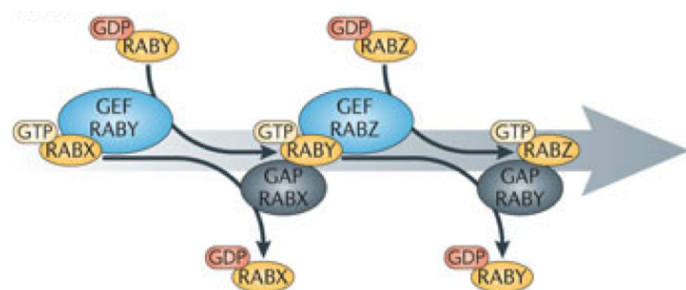


図 3-36. **Rab** カスケードの模式図

れている[98]。この場合は、単一の Rab の障害が他の Rab の障害を惹起している可能性がある。今後 MT1-MMP の輸送経路の解明や各 Rab の新規 GAP および GEF の発見は、Rab ファミリーによる浸潤制御システムの解明の手がかりとなるかもしれない。

そして今回 Rab2A が乳がん細胞の浸潤に重要な分子であることが示された。

Rab2A は小胞体からゴルジ体の間に局在する Rab ファミリーで、小胞体からゴルジ体への小胞輸送を制御すると考えられている[99-101]。Rab2A と乳がんの関連については、2015 年に入り、当初 Nourashrafeddin らが浸潤性の乳がんにおいて Rab2A の mRNA 量が低下していると報告したが[102]、その後 Luo らはリン酸化タンパク質に結合し構造を異性化させる Pin1[103]のノックアウトマウスのゲノムのプロファイリングから Rab2A に着目し、Rab2A が乳がん幹細胞において発がんを促進すること、さらに公開されたデータベースを用いて、Rab2A の mRNA の発現の増加が乳がんの転移と相関があることを示した[104]。本研究の結果とも併せると Rab2A は乳がんの発がんから浸潤が進行して転移に至る一連の過程に深く関与していると考えられる。転移をきたすには浸潤の過程が必須であり、浸潤における Rab2A の関与について検討した報告は過去になく、本研究の結果は非常に意義深いと考える。

Rab2A の発現低下により乳がん細胞の浸潤が抑制される機序については、本研究

からは以下の可能性が考えられる。一つ目に、浸潤突起の形成または成熟が阻害されている場合がある。この場合には、Rab2A が Rho ファミリーと協調しアクチン骨格の再形成に関与する可能性、あるいは浸潤突起は必ずゴルジ体に隣接して存在するため[105]、Rab2A の発現低下によりゴルジ体の形状の変化が浸潤突起の局在を変化させ正常な形成が阻害された可能性が考えられる。二つ目は、メタロプロテアーゼの小胞輸送障害が挙げられる。代表的メタロプロテアーゼである MT1-MMP の細胞全体の mRNA 量は Rab2A の発現低下によっても減少しないことを確認したが、MT1-MMP の浸潤突起部位における低下があれば、浸潤突起が細胞外基質の分解を行えないと推測される。代表的メタロプロテアーゼである MT1-MMP の現在までに解明されている細胞内輸送経路を図 3-37 に示した。この中でも、濃い緑で示した矢

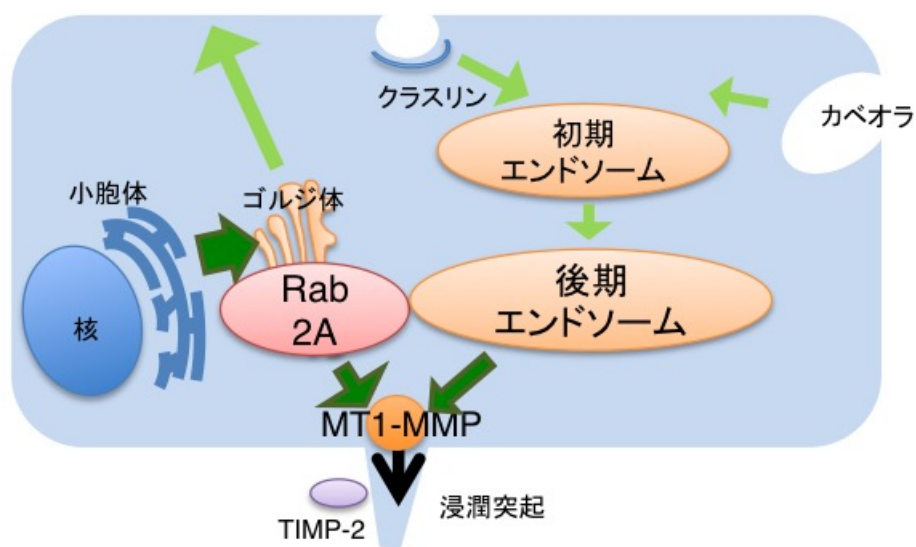


図 3-37. MT1-MMP の現在までに解明されている細胞内輸送経路の模式図
Rab2A が関与する可能性のある経路を濃い緑の矢印で示した。

印については **Rab2A** が関与する可能性がある。この中には、通常 **Rab2A** が関与するゴルジ周囲の小胞輸送だけでなく、活性型 **Rab2A** の過剰発現により後期エンドソームが巨大化し、**Rab2A** がエフェクター **VPS39** の局在する後期エンドソームと関連することから[95]、後期エンドソームに関わる経路も含まれる。**MT1-MMP** が細胞内では主に後期エンドソームに局在すること、さらに **MT1-MMP** は形質膜へ運ばれると **TIMP2** という分子と速やかに複合体を形成してそのメタロプロテアーゼ活性が不活性化されることから[106]、**MT1-MMP** の後期エンドソームから形質膜へ供給される作用が酵素活性に重要である事が示唆される。三つ目に、**Rab2A** のエフェクターである **GRASP55** の機能低下を介した **MT1-MMP** の活性化の阻害が挙げられる。ゴルジ体に多く局在する **furin** は **MT1-MMP** を活性化する酵素であり[81, 89]、**GRASP55**、**furin** および **MT1-MMP** の3者は複合体を形成し、**GRASP55** は **furin** と **MT1-MMP** の結合を強固にする作用を持つため、この複合体の形成不全は **MT1-MMP** の活性化を阻害する[90] (図 3-38)。また、**GRASP55** は種々のタンパク質の糖鎖修飾に関与し[88]、**MT1-MMP** は細胞内で O 型糖鎖修飾の障害により活性

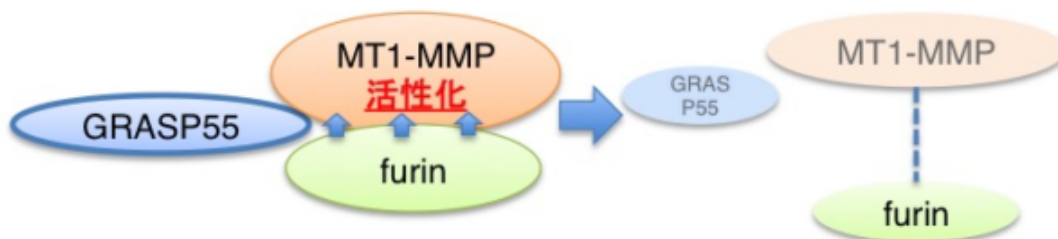


図 3-38. GRASP55、furin および MT1-MMP の複合体の形成不全は MT1-MMP の活性化を障害する

が低下する[91, 92]。本研究において Rab2A と GRASP55 の発現低下は同様の作用を示すことから、Rab2A の発現低下が GRASP55-furin-MT1-MMP 複合体の形成阻害または O 型糖鎖修飾の阻害に伴って、MT1-MMP の活性化を阻害する可能性がある。

今後は、Rab2A が浸潤に関与する機序の解明のために、先に述べた可能性を踏まえ、Rab2A の発現低下細胞において浸潤突起に特異的なマーカーを用いた浸潤突起の 2 次元および 3 次元形態の観察、細胞表面の観察が可能な全反射照明蛍光顕微鏡を用いた浸潤突起部位の MT1-MMP の観察、GRASP55 と Rab2A の関係性の解明や MT1-MMP の細胞内輸送のライブイメージングなどが必要になるだろう。また、スクリーニングで浸潤への関与の可能性が示唆された他の Rab についても、今後その関与の有無について詳細な検討が課題となるだろう。この機序を解明することは、乳がんの理解の一端が深まることに加えて、Rab2A の増幅を来した乳がん症例において、浸潤を予防する治療の開発につながる可能性があると考えられる。

IV章. 考察 –二つの研究を通して–

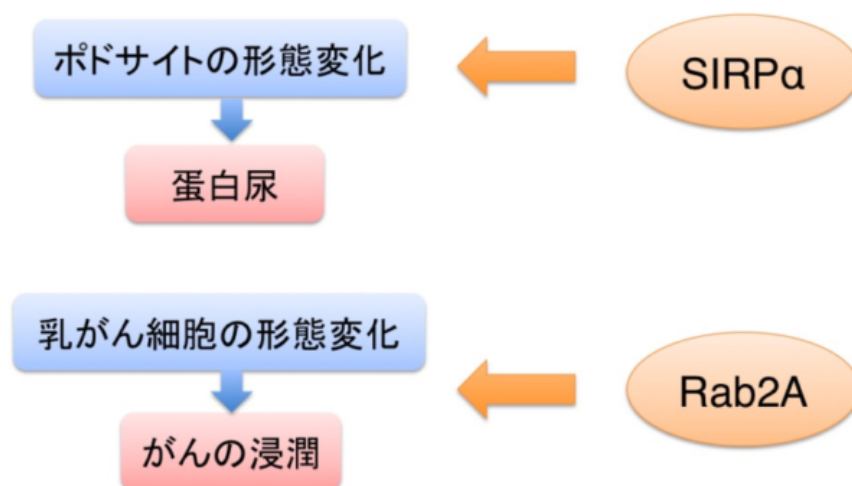


図 4. 本研究の概要の模式図

本研究によって、ポドサイトの形態変化をきたす蛋白尿の発症に SIRP α が関わること、および乳がん細胞の形態変化をきたすがんの浸潤に Rab2A に関わることが分かった（図 4）。個々の上皮細胞はその部位に応じ独自の形態を擁している。細胞の形態変化により属する組織の機能が低下し病態と関連することから、個々の細胞の固有の形態は、体内において担う役割に対し至適化したものであると推測される。そのため形態の保持は細胞にとって非常に重要な課題であり、種々の分子が協調して精緻な制御システムを構築しているのだと考えられる。

今回乳がんの浸潤に重要であると同定した Rab2 は、上皮細胞の極性維持に重要な atypical protein kinase C (aPKC) λ/μ と結合することが知られている[107]。ポドサイトにおいて aPKC はスリット膜において Nephrin および Nephl と複合体を形成し

[108]、ポドサイトにおける α PKC λ の欠損マウスは足突起が癒合し蛋白尿を呈する [109, 110]。公開されている組織図譜である THE HUMAN PROTEIN ATLAS (<http://www.proteinatlas.org>) では、糸球体において Rab2A の存在が確認されている。これらから、Rab2 ががん細胞以外の上皮細胞においても形態制御に関わる可能性を有することが推測される。また、SIRP α は CD47 との相互作用を通じてがんの進行および転移に関与することが指摘されている[111]ことから、本研究で解析を行った分子がそれぞれの疾患における役割にとどまらない広範な側面を有し、様々な病態に関連している可能性が推測される。そのため、個々の病態に応じた解析が必要である。

上皮細胞は頂端膜と基底膜で発現するタンパク質、脂質、糖鎖修飾などを特化させることで極性を保ち、異なる外界との物質の交換を維持している。今後は同定した因子がどのように正常な上皮細胞で極性維持を支え、個々の細胞が最適とする固有の形態を保持させているのかについてさらに研究を進めたい。

引用文献

1. Kierszenbaum AL: HISTOLOGY and CELL BIOLOGY. *An Introduction to Pathology*. 2nd Ed., Mosby ELSEVIER, 2007
2. Molecular Biology of THE CELL. Fifth Edition Ed., NEWTON PRESS, 2008
3. Gonzalez DM, Medici D: Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7: re8, 2014
4. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139: 871-890, 2009
5. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J: Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354: 1387-1401, 2006
6. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P: Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 17: 428-437, 2007
7. Patrakka J, Tryggvason K: New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nat Rev Nephrol*, 5: 463-468, 2009
8. Deegens JK, Dijkman HB, Borm GF, Steenbergen EJ, van den Berg JG, Weening JJ, Wetzels JF: Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 74: 1568-1576, 2008
9. Patrakka J, Kestilä M, Wartiovaara J, Ruotsalainen V, Tissari P, Lenkkeri U, Männikkö M, Visapää I, Holmberg C, Rapola J, Tryggvason K, Jalanko H: Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int*, 58: 972-980, 2000
10. Grahammer F, Schell C, Huber TB: The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*, 9: 587-598, 2013
11. Robson AM, Giangiacomo J, Kienstra RA, Naqvi ST, Ingelfinger JR: Normal glomerular permeability and its modification by minimal change nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 54: 1190-1199, 1974
12. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ: Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*, 365: 2398-2411, 2011
13. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1: 575-582, 1998
14. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H,

- Holmberg C, Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7962-7967, 1999
15. Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K: The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet*, 10: 1-8, 2001
 16. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G: Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*, 14: 918-926, 2003
 17. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*, 108: 1621-1629, 2001
 18. Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol*, 159: 2303-2308, 2001
 19. Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG, Hasselbacher K, Ruf RG, Schultheiss M, Hangan D, Hoskins BE, Everding AS, Bogdanovic R, Seeman T, Hoppe B, Hildebrandt F, Group MotAS: Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res*, 59: 325-331, 2006
 20. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG: Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest*, 108: 289-301, 2001
 21. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M, Kilic BD, Balat A, Iatropoulos P, Asan E, Akarsu NA, Schaefer F, Yilmaz E, Bakkaloglu A, Consortium P: Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 89: 139-147, 2011
 22. Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, Wiggins RC, Killen P, Holzman LB: Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem*, 278: 20716-20723, 2003
 23. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB: Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest*, 116: 1346-1359, 2006
 24. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, Huang H, Larose L, Li SS, Takano T, Quaggin SE, Pawson T: Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*, 440: 818-823, 2006
 25. Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB: Nephl cooperates with

- nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol*, 27: 8698-8712, 2007
26. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Hattori S: Nephrin, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine-phosphorylated by the Src family tyrosine kinase and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J Biol Chem*, 283: 9177-9186, 2008
 27. Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S: Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- γ 1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell*, 22: 1824-1835, 2011
 28. Yu CC, Yen TS, Lowell CA, DeFranco AL: Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Curr Biol*, 11: 34-38, 2001
 29. Kurihara H, Harita Y, Ichimura K, Hattori S, Sakai T: SIRP- α -CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299: F517-527, 2010
 30. Barclay AN, Brown MH: The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 6: 457-464, 2006
 31. van den Berg TK, van der Schoot CE: Innate immune 'self' recognition: a role for CD47-SIRP α interactions in hematopoietic stem cell transplantation. *Trends Immunol*, 29: 203-206, 2008
 32. Barclay AN, Van den Berg TK: The interaction between signal regulatory protein α (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*, 32: 25-50, 2014
 33. Fujioka Y, Matozaki T, Noguchi T, Iwamatsu A, Yamao T, Takahashi N, Tsuda M, Takada T, Kasuga M: A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol*, 16: 6887-6899, 1996
 34. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S: Phosphorylation of Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling by Recruitment and Activation of Phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem*, 284: 8951-8962, 2009
 35. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG: The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol*, 111: 1255-1263, 1990
 36. Fukusumi Y, Miyauchi N, Hashimoto T, Saito A, Kawachi H: Therapeutic target for nephrotic syndrome: Identification of novel slit diaphragm associated molecules. *World J Nephrol*, 3: 77-84, 2014

37. Hulkko J, Patrakka J, Lal M, Tryggvason K, Hultenby K, Wernerson A: Neph1 is reduced in primary focal segmental glomerulosclerosis, minimal change nephrotic syndrome, and corresponding experimental animal models of adriamycin-induced nephropathy and puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron Extra*, 4: 146-154, 2014
38. Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, Kerjaschki D, Holthöfer H: Nephrin in experimental glomerular disease. *Kidney Int*, 58: 1461-1468, 2000
39. Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, Kok RJ, Goldschmeding R: Targeting podocyte-associated diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, 62: 1325-1336, 2010
40. Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Tryggvason K: Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest*, 114: 1475-1483, 2004
41. Arif E, Rathore YS, Kumari B, Ashish F, Wong HN, Holzman LB, Nihalani D: Slit diaphragm protein Neph1 and its signaling: a novel therapeutic target for protection of podocytes against glomerular injury. *J Biol Chem*, 289: 9502-9518, 2014
42. Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y: SIRP α signaling regulates podocyte structure and function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305: F861-870, 2013
43. Lee VW, Harris DC: Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*, 16: 30-38, 2011
44. Kawachi H, Suzuki K, Miyauchi N, Hashimoto T, Otaki Y, Shimizu F: Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol*, 13: 275-280, 2009
45. Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, Foster KA, Frankel RZ, Pavlidis P, Barasch J, D'Agati VD, Gharavi AG: A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2502-2507, 2005
46. Kodama A, Matozaki T, Fukuhara A, Kikyo M, Ichihashi M, Takai Y: Involvement of an SHP-2-Rho small G protein pathway in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell scattering. *Mol Biol Cell*, 11: 2565-2575, 2000
47. Motegi S, Okazawa H, Ohnishi H, Sato R, Kaneko Y, Kobayashi H, Tomizawa K, Ito T, Honma N, Bühring HJ, Ishikawa O, Matozaki T: Role of the CD47-SHPS-1 system in regulation of cell migration. *EMBO J*, 22: 2634-2644, 2003

48. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629-635, 2002
49. Mouawad F, Tsui H, Takano T: Role of Rho-GTPases and their regulatory proteins in glomerular podocyte function. *Can J Physiol Pharmacol*, 91: 773-782, 2013
50. Tsai RK, Discher DE: Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol*, 180: 989-1003, 2008
51. Alenghat FJ, Baca QJ, Rubin NT, Pao LI, Matozaki T, Lowell CA, Golan DE, Neel BG, Swanson KD: Macrophages require Skap2 and Sirp α for integrin-stimulated cytoskeletal rearrangement. *J Cell Sci*, 125: 5535-5545, 2012
52. Reiser J, Pixley FJ, Hug A, Kriz W, Smoyer WE, Stanley ER, Mundel P: Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases rapid communication. *Kidney Int*, 57: 2035-2042, 2000
53. Aoudjit L, Jiang R, Lee TH, New LA, Jones N, Takano T: Podocyte Protein, Nephlin, Is a Substrate of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *J Signal Transduct*, 2011: 376543, 2011
54. Denhez B, Lizotte F, Guimond MO, Jones N, Takano T, Geraldine P: Increased SHP-1 protein expression by high glucose levels reduces nephrin phosphorylation in podocytes. *J Biol Chem*, 290: 350-358, 2015
55. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH: Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 14: 1234-1237, 1999
56. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G: Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol*, 158: 1723-1731, 2001
57. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, Bruijn JA: Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*, 14: 2063-2071, 2003
58. Johansen ML, Brown EJ: Dual regulation of SIRP α phosphorylation by integrins and CD47. *J Biol Chem*, 282: 24219-24230, 2007
59. Brown EJ, Frazier WA: Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 11: 130-135, 2001
60. Maile LA, Allen LB, Hanzaker CF, Gollahon KA, Dunbar P, Clemmons DR: Glucose regulation of thrombospondin and its role in the modulation of smooth muscle cell proliferation. *Exp Diabetes Res*, 2010, 2010
61. Yao M, Rogers NM, Csányi G, Rodriguez AI, Ross MA, St Croix C, Knupp H, Novelli

- EM, Thomson AW, Pagano PJ, Isenberg JS: Thrombospondin-1 activation of signal-regulatory protein- α stimulates reactive oxygen species production and promotes renal ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 25: 1171-1186, 2014
62. Veillette A, Thibault E, Latour S: High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *J Biol Chem*, 273: 22719-22728, 1998
63. Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J: Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Rep*, 3: 603-610, 2015
64. Friedl P, Wolf K: Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, 188: 11-19, 2010
65. Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM: Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol*, 189: 541-556, 2010
66. Spuul P, Ciufici P, Veillat V, Leclercq A, Daubon T, Kramer IJ, Génot E: Importance of RhoGTPases in formation, characteristics, and functions of invadosomes. *Small GTPases*, 5: e28195, 2014
67. Murphy DA, Courtneidge SA: The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 413-426, 2011
68. Sit ST, Manser E: Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 124: 679-683, 2011
69. Nakahara H, Otani T, Sasaki T, Miura Y, Takai Y, Kogo M: Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells. *Genes Cells*, 8: 1019-1027, 2003
70. Palamidessi A, Frittoli E, Garré M, Faretta M, Mione M, Testa I, Diaspro A, Lanzetti L, Scita G, Di Fiore PP: Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*, 134: 135-147, 2008
71. Klöpper TH, Kienle N, Fasshauer D, Munro S: Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol*, 10: 71, 2012
72. Hutagalung AH, Novick PJ: Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91: 119-149, 2011
73. Zerial M, McBride H: Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 107-117, 2001
74. Porther N, Barbieri MA: The role of endocytic Rab GTPases in regulation of growth factor signaling and the migration and invasion of tumor cells. *Small GTPases*, 6:

135-144, 2015

75. Linder S, Scita G: RABGTPases in MT1-MMP trafficking and cell invasion: Physiology versus pathology. *Small GTPases*, 6: 145-152, 2015
76. Frittoli E, Palamidessi A, Marighetti P, Confalonieri S, Bianchi F, Malinverno C, Mazzarol G, Viale G, Martin-Padura I, Garré M, Parazzoli D, Mattei V, Cortellino S, Bertalot G, Di Fiore PP, Scita G: A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. *J Cell Biol*, 206: 307-328, 2014
77. Miller FR, Santner SJ, Tait L, Dawson PJ: MCF10DCIS.com xenograft model of human comedo ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1185-1186, 2000
78. Shin KJ, Wall EA, Zavzavadjian JR, Santat LA, Liu J, Hwang JI, Rebres R, Roach T, Seaman W, Simon MI, Fraser ID: A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13759-13764, 2006
79. Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, Fukami K: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase Ialpha are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. *Cancer Sci*, 101: 1632-1638, 2010
80. Courtneidge SA: Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochem Soc Trans*, 40: 129-132, 2012
81. Frittoli E, Palamidessi A, Disanza A, Scita G: Secretory and endo/exocytic trafficking in invadopodia formation: the MT1-MMP paradigm. *Eur J Cell Biol*, 90: 108-114, 2011
82. Poincloux R, Lizárraga F, Chavrier P: Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci*, 122: 3015-3024, 2009
83. Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, Grindlay J, van den Berghe PV, von Thun A, Morton JP, Gourley C, Timpson P, Nixon C, McKay CJ, Carter R, Strachan D, Anderson K, Sansom OJ, Caswell PT, Norman JC: Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev Cell*, 22: 131-145, 2012
84. Yamada KM, Cukierman E: Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 130: 601-610, 2007
85. Rolland Y, Marighetti P, Malinverno C, Confalonieri S, Luise C, Ducano N, Palamidessi A, Bisi S, Kajiho H, Troglio F, Shcherbakova OG, Dunn AR, Oldani A, Lanzetti L, Di Fiore PP, Disanza A, Scita G: The CDC42-interacting protein 4 controls epithelial cell cohesion and tumor dissemination. *Dev Cell*, 30: 553-568, 2014

86. Macpherson IR, Rainero E, Mitchell LE, van den Berghe PV, Speirs C, Dozynkiewicz MA, Chaudhary S, Kalna G, Edwards J, Timpson P, Norman JC: CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer. *J Cell Sci*, 127: 3893-3901, 2014
87. Short B, Preisinger C, Körner R, Kopajtich R, Byron O, Barr FA: A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J Cell Biol*, 155: 877-883, 2001
88. Xiang Y, Zhang X, Nix DB, Katoh T, Aoki K, Tiemeyer M, Wang Y: Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nat Commun*, 4: 1659, 2013
89. Remacle AG, Rozanov DV, Fugere M, Day R, Strongin AY: Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP. *Oncogene*, 25: 5648-5655, 2006
90. Roghi C, Jones L, Gratian M, English WR, Murphy G: Golgi reassembly stacking protein 55 interacts with membrane-type (MT) 1-matrix metalloprotease (MMP) and furin and plays a role in the activation of the MT1-MMP zymogen. *FEBS J*, 277: 3158-3175, 2010
91. Remacle AG, Chekanov AV, Golubkov VS, Savinov AY, Rozanov DV, Strongin AY: O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Biol Chem*, 281: 16897-16905, 2006
92. Shuo T, Koshikawa N, Hoshino D, Minegishi T, Ao-Kondo H, Oyama M, Sekiya S, Iwamoto S, Tanaka K, Seiki M: Detection of the heterogeneous O-glycosylation profile of MT1-MMP expressed in cancer cells by a simple MALDI-MS method. *PLoS One*, 7: e43751, 2012
93. Feinstein TN, Linstedt AD: GRASP55 regulates Golgi ribbon formation. *Mol Biol Cell*, 19: 2696-2707, 2008
94. Kienzle C, von Blume J: Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol*, 24: 584-593, 2014
95. Gillingham AK, Sinka R, Torres IL, Lilley KS, Munro S: Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell*, 31: 358-373, 2014
96. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M: Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122: 735-749, 2005
97. Jean S, Kiger AA: Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 463-470, 2012
98. Suda Y, Kurokawa K, Hirata R, Nakano A: Rab GAP cascade regulates dynamics of

- Ypt6 in the Golgi traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 18976-18981, 2013
99. Sugawara T, Kano F, Murata M: Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. *Sci Rep*, 4: 6952, 2014
 100. Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ, Balch WE: GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol*, 119: 749-761, 1992
 101. Tisdale EJ: A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates. *Mol Biol Cell*, 10: 1837-1849, 1999
 102. Nourashrafeddin S, Aarabi M, Modarressi MH, Rahmati M, Nouri M: The Evaluation of WBP2NL-Related Genes Expression in Breast Cancer. *Pathol Oncol Res*, 21: 293-300, 2015
 103. Yeh ES, Means AR: PIN1, the cell cycle and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 381-388, 2007
 104. Luo ML, Gong C, Chen CH, Hu H, Huang P, Zheng M, Yao Y, Wei S, Wulf G, Lieberman J, Zhou XZ, Song E, Lu KP: The Rab2A GTPase promotes breast cancer stem cells and tumorigenesis via Erk signaling activation. *Cell Rep*, 11: 111-124, 2015
 105. 山口 英樹: がん細胞による浸潤突起形成の分子機構. *生化学*, 84: 35-38, 2012.01
 106. Watanabe A, Hoshino D, Hosino D, Koshikawa N, Seiki M, Suzuki T, Ichikawa K: Critical role of transient activity of MT1-MMP for ECM degradation in invadopodia. *PLoS Comput Biol*, 9: e1003086, 2013
 107. Tisdale EJ: Rab2 interacts directly with atypical protein kinase C (aPKC) iota/lambda and inhibits aPKC ι /lambda-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphorylation. *J Biol Chem*, 278: 52524-52530, 2003
 108. Hartleben B, Schweizer H, Lübben P, Bartram MP, Möller CC, Herr R, Wei C, Neumann-Haefelin E, Schermer B, Zentgraf H, Kerjaschki D, Reiser J, Walz G, Benzing T, Huber TB: NepH-Nephrin proteins bind the Par3-Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex to regulate podocyte cell polarity. *J Biol Chem*, 283: 23033-23038, 2008
 109. Huber TB, Hartleben B, Winkelmann K, Schneider L, Becker JU, Leitges M, Walz G, Haller H, Schiffer M: Loss of podocyte aPKC λ /iota causes polarity defects and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 20: 798-806, 2009
 110. Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, Yamashita A, Ohno S: aPKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem*, 156: 115-128, 2014
 111. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, Wang J,

Contreras-Trujillo H, Martin R, Cohen JD, Lovelace P, Scheeren FA, Chao MP, Weiskopf K, Tang C, Volkmer AK, Naik TJ, Storm TA, Mosley AR, Edris B, Schmid SM, Sun CK, Chua MS, Murillo O, Rajendran P, Cha AC, Chin RK, Kim D, Adorno M, Raveh T, Tseng D, Jaiswal S, Enger P, Steinberg GK, Li G, So SK, Majeti R, Harsh GR, van de Rijn M, Teng NN, Sunwoo JB, Alizadeh AA, Clarke MF, Weissman IL: The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 6662-6667, 2012

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導賜りました東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座 岡明教授、五十嵐隆名誉教授、北里大学薬学部生化学教室 服部成介教授、The FIRC Institute of Molecular Oncology (IFOM) Giorgio Scita 博士に深甚なる感謝の意を表します。そして実験の細部に渡り終始ご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児科学講座 張田豊講師、IFOM Hiroaki Kajiho 博士に心より感謝申し上げます。東京女子医科大学腎臓小児科 服部元史教授には貴重な臨床検体をご提供いただき、順天堂大学医学部解剖学・構造科学講座 栗原秀剛先任准教授には実験資料のご提供およびご助言をいただきました。深謝申し上げます。また qPCR を実施して頂いた Cogentech、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡使用についてご助言をいただいた IFOM Imaging Support Group に感謝申し上げます。東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児科学講座および IFOM の研究室の方々には、様々な場面でご助言をいただきました。心より御礼申し上げます。

また、本博士課程の2年次より学術振興会の特別研究員 (DC1) に採用いただき、学術振興会に研究をご支援いただきました。厚く御礼申し上げます。

最後に、博士課程での研究生活を支えてくれた家族と3人の子供達に心より感謝い

たします。