

論文内容の要旨

Essential Roles of WAVE2, an actin cytoskeleton regulator,
in invasion and metastasis of cancer cells

(アクチン細胞骨格調節因子 WAVE2 による、がん細胞の浸潤・転移の制御機構の解析)

栗 栖 修 作

【はじめに】

がん細胞は浸潤能や転移能を獲得する過程で細胞遊走能を亢進させる。細胞遊走時には遊走の先端端でアクチン細胞骨格が再編され、アクチン線維の伸長が細胞膜を突出させる原動力となる。そして、多くのアクチン細胞骨格調節タンパク質が協調的に働き細胞遊走を制御している。一方がん細胞においては、悪性化に伴いアクチン細胞骨格の動態を司る分子システムに異常が生じ、高い遊走能を獲得すると考えられている。近年、先端端におけるアクチン重合を促進する因子として Arp2/3 複合体が発見され、細胞の辺縁部における突起構造の形成に必須の因子であることが分かってきた。しかし、Arp2/3 複合体の活性変化ががん細胞の悪性化に関与するかについては不明であった。

本研究では Arp2/3 複合体の活性化因子である WASP ファミリータンパク質 (N-WASP, WAVE1-3) ががんの悪性化過程に如何に関与するか解析を行い、がん細胞の異常な遊走能に WAVE2 が深く関与することを発見した。

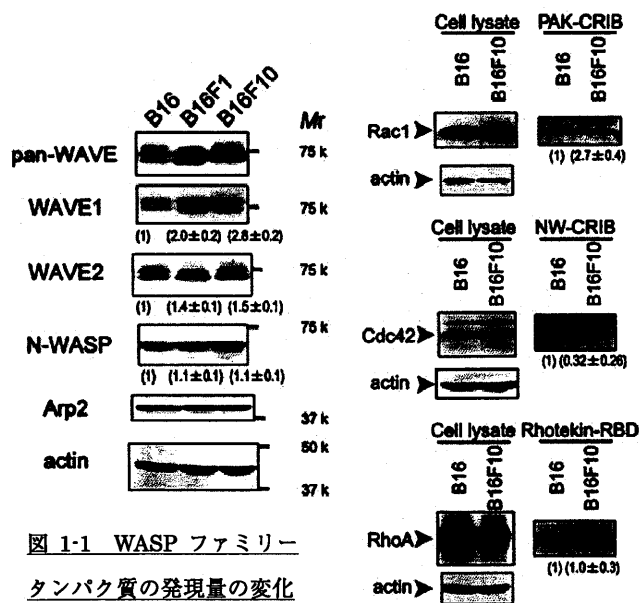


図 1-1 WASP ファミリータンパク質の発現量の変化

図 1-2 Rho ファミリーの活性変化

【方法と結果】

1. B16 マウス・メラノーマ転移モデルにおける WAVE の活性上昇

B16 モデルは非転移性の B16F0 マウス・メラノーマ細胞株と、B16F0 細胞から単離された B16F1 (低転移性)、B16F10 (高転移性) 細胞より成る。このモデルにおいて WASP ファミリーの発現量 (図 1-1)、および上流シグナルである Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性 (図 1-2) を調べたところ、転移能の亢進に伴い、Rac の活性上昇と、Rac の下流に位置する WAVE1、および WAVE2 のタンパク質量の増加が認められた。このことは転移性の獲得に伴い Rac-WAVE シグナルが亢進することを示唆していた。

2. WAVE2 の活性は浸潤・転移能を制御する

次に、Rac-WAVE シグナルが浸潤・転移に関与するか検討した。RNA interference (RNAi) 法で内在性の WAVE1 および WAVE2 の発現を抑制した場合、WAVE2 RNAi により B16F10 細胞の浸潤能が著しく低下した (図 2-1)。加えて、本来浸潤能の低い B16 細胞に Rac の恒常的活性化体 (RacCA) を発現すると浸潤能が亢進し、そこに WAVE2 を過剰発現すると、さらに浸潤能が上昇した (図 2-2)。

したがって、B16 モデルの転移能獲得過程で見られた Rac の活性化と WAVE2 の発現増加は、がん細胞の浸潤に積極的に関与すると考えられる。WAVE2 の発現抑制は実験的肺転移で形成される転移巣の数を減少させることから、WAVE2 はがん細胞の転移巣形成における浸潤的拡散に関与することが示唆される。基底膜モデルであるマトリゲル中で B16F10 細胞を経時観察したところ、WAVE2 RNAi により顕著な遊走抑制が確認され、遊走阻害が浸潤・転移の抑制に寄与していることが示唆された。

3. 様々ながん細胞における細胞遊走形態の多様性

B16 モデルにおいて WAVE2 は浸潤に必須の因子であったが、他のがん細胞ではどうであろうか？最近の研究から、がん細胞が細胞外基質中を遊走するための分子機構は、いくつか存在することが提唱されている。実際、U87MG ヒト膠芽腫細胞をコラーゲンゲル中で経時観察すると、遊走方向に突起を伸展しながら遊走する (間葉性遊走)。それに対し、SW480 ヒト大腸癌

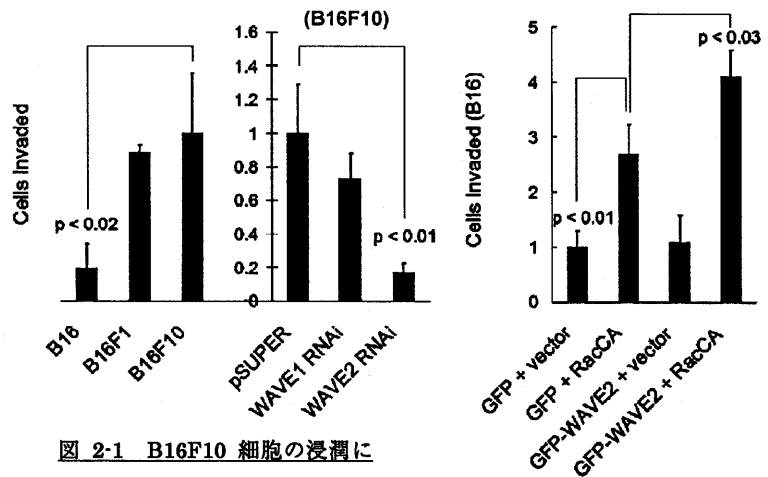


図 2-1 B16F10 細胞の浸潤に対する WAVE RNAi の効果

図 2-2 B16F0 細胞における RacCA、および WAVE2 の発現による浸潤能の亢進

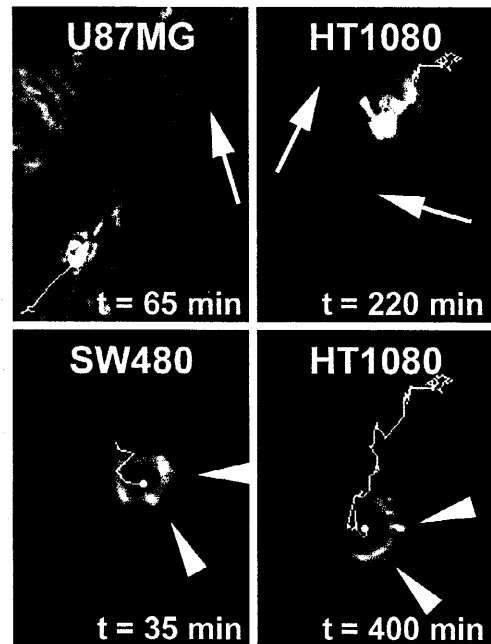


図 3 コラーゲンゲル中での細胞遊走形態 (矢頭: 膜プレビング、矢印: 突起構造)

細胞は激しい膜ブレベイングを伴いながら遊走する（ブレベイング遊走）。一方、HT1080 ヒト線維肉腫細胞では前述の二つの性質を併せ持つ遊走様式（中間性遊走）を示した（図 3）。U87MG 細胞で見られる突起構造は actin に富み、先端部に WAVE2 が濃縮するが、膜ブレベイングは形成初期に actin の集積が少なく、WAVE2 も濃縮しない。従って、両者は相異なる分子機序によって制御され、WAVE2 の寄与も大きく異なる可能性が考えられた。

4. 間葉性遊走は WAVE2 シグナルに依存し、ブレベイング遊走は ROCK シグナルに依存する

膜ブレベイングは収縮時にアクトミオシン収縮を利用する。Rho の下流で活性化されるプロテインキナーゼである ROCK (Rho kinase) はミオシン軽鎖をリン酸化しアクトミオシン系の収縮を促すため、膜ブレベイング形成に関与する。そのため、ROCK の阻害薬である Y-27632 は膜ブレベイングを抑制する。前述の U87MG、SW480、HT1080 細胞をこの薬剤で処理した場合、SW480 細胞の遊走は阻害されるが、U87MG 細胞や HT1080 細胞の遊走は阻害されなかった。一方、WAVE2 を RNAi により発現抑制すると（図 4A）U87MG 細胞の突起形成が阻害され遊走能は減少するが、SW480 細胞の遊走は抑制されなかった（図 4C）。Rac の活性は U87MG 細胞で高く、RhoA の活性は SW480 細胞で高いことも、U87MG 細胞では WAVE2 が活性化され、WAVE2 依存性の遊走を示すことを支持する（図 4B）。この観察から、WAVE2 は葉状仮足を推進力とする間葉性遊走を司り、Rho/ROCK はアクトミオシン系を介してブレベイング遊走を司ることが示唆された。

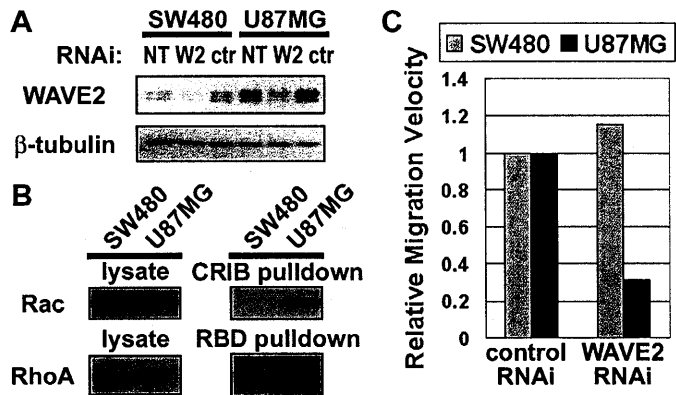


図 4 間葉性遊走とブレベイング遊走の WAVE2 への依存性の違い

この薬剤で処理した場合、SW480 細胞の遊走は阻害されるが、U87MG 細胞や HT1080 細胞の遊走は阻害されなかった。一方、WAVE2 を RNAi により発現抑制すると（図 4A）U87MG 細胞の突起形成が阻害され遊走能は減少するが、SW480 細胞の遊走は抑制されなかった（図 4C）。Rac の活性は U87MG 細胞で高く、RhoA の活性は SW480 細胞で高いことも、U87MG 細胞では WAVE2 が活性化され、WAVE2 依存性の遊走を示すことを支持する（図 4B）。この観察から、WAVE2 は葉状仮足を推進力とする間葉性遊走を司り、Rho/ROCK はアクトミオシン系を介してブレベイング遊走を司ることが示唆された。

5. WAVE2 依存性遊走と ROCK 依存性遊走の間の可塑性

中間性の HT1080 細胞のコラーゲンゲル中への浸潤を逆位浸潤アッセイ（図 5B）により定量したところ、HT1080 細胞の浸潤は WAVE2 シグナル、あるいは ROCK シグナルを単独で阻害しただけでは抑制されなかった。しかし、この二つのシグナルを同時に遮断すると浸潤が著しく阻害された（図 5C, D）。この結果は、中間性遊走においては、ROCK 依存性遊走、つまりブレベイング遊走が起きない条件では WAVE2 依存性遊走が支配的となることを示唆する。逆に、WAVE2 依存性遊走、すなわち間葉性遊走がおきない条件では、ROCK 依存性遊走が支配的となる。従って、ある種のがん細胞の浸潤では WAVE2 依存性遊走と ROCK 依存性遊走、これら二つの独立した機構により遊走が制御され、この二者間には可塑性が存在することが予想された。

【考察】

本研究で、がん細胞の浸潤様式の一つである間葉性遊走は Arp2/3 複合体によるアクチン重合が遊走の推進力となり、Rac/WAVE2 シグナルによって制御されることを示した。さらに B16 モデルから、浸潤・転移能の亢進に Rac/WAVE2 シグナルの増強が関与することを明らかにした。これは WASP ファミリータンパク質が積極的にがんの悪性化に寄与することを示したはじめての例である。

B16F10 細胞の浸潤・転移は強く WAVE2 に依存し、マトリゲル中で葉状仮足様の突起を伸展することから、遊走様式としては間葉性遊走が支配的であると考えられる。一方、別の様式であるプレビング遊走はアクトミオシン収縮が牽引力となり、Rho/ROCK シグナルによって制御されることを示した。HT1080 細胞のように両者の特徴を併せ持つ遊走もあることは、間葉性遊走とプレビング遊走ははっきり区別つくものではないことを示唆している。おそらく、がん細胞の遊走では、Rac/WAVE2 シグナル

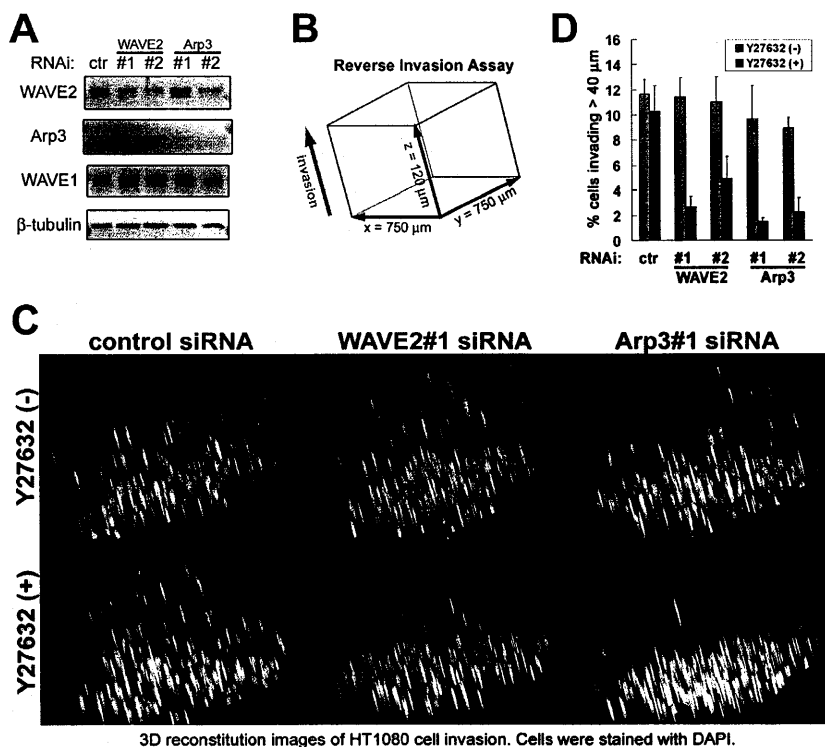


図5 中間性遊走では WAVE2 シグナルと ROCK シグナルが相補的に浸潤を促す

と Rho/ROCK シグナルの両者のバランスが形態を決定するのであろう。

WAVE は3つのアイソフォームから成るが、B16 モデルにおいては WAVE3 の発現は検出されず、WAVE1 および WAVE2 は同程度の発現レベルであった。WAVE1 および WAVE2 はどちらも Arp2/3 複合体を活性化し、類似の細胞内局在を示すにもかかわらず、B16F10 細胞の浸潤・転移は WAVE1 にあまり依存しない。現在分かっている WAVE2 特異的な唯一の結合タンパク質は IRSp53 であり、WAVE2 による Arp2/3 活性化を Rac 活性依存的に促進する作用を持つ。したがって、B16F10 細胞で遊走が WAVE2 に強く依存する一つの理由として、Rac のシグナルを IRSp53 が WAVE2 に伝達している可能性が考えられる。

がんの浸潤・転移を抑制する薬剤の開発という観点から見ると、本研究はある種の悪性がん細胞で細胞遊走が Rac/WAVE2 シグナルに強く依存することを明らかにし、WAVE2 が浸潤・転移抑制のターゲットとなり得ることを示している。さらに、間葉性遊走では Rac が活性化され、遊走が WAVE2 によって制御されること、即ち、WAVE2 は Rac が異常活性化しているがん中で特に有効な分子標的となり得ることを示したという点で、本研究は将来、新たな薬剤の開発に役立つ知見となることが期待される。

【参考文献】

- (1) Kurisu S., Suetsugu S., Yamazaki D., Yamaguchi H. and Takenawa T. "Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells." *Oncogene* (2005), 24, 1309-1319.
- (2) Yamazaki D., Kurisu S. and Takenawa T. "Regulation of cancer cell motility through actin reorganization." *Cancer Science* (2005), 96, 379-386.