

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ
「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, Solo-type, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 上皮間葉転換における細胞膜脂質の変化とその意義の解明

(英語) Elucidation of roles of membrane lipids during epithelial-mesenchymal transition

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学 大学院理学研究院 教授 池ノ内 順一

所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University Faculty of Science Professor Junichi Ikenouchi

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

（和文）

本研究課題は、癌細胞が浸潤性を獲得する上で重要な過程となる上皮間葉転換現象に着目し、上皮間葉転換における細胞膜脂質組成の変化の意義を明らかにすることを目的としている。

研究代表者は先行研究に於いて、細胞膜をコロイド状シリカ粒子を用いて単離する手法を確立し、質量分析によって細胞膜を構成する脂質分子種を同定する方法を確立した (Ikenouchi et al. J Biol Chem 2012)。この方法論を用いて、上皮細胞と間葉細胞の細胞膜脂質の比較を行った。具体的には、間葉細胞（マウス乳腺由来培養上皮細胞 EpH4 細胞を転写因子 Snail によって間葉細胞に転換した細胞）と上皮細胞（Eph4 細胞）の細胞膜脂質を質量分析により解析した結果、上皮細胞に限定して認められる脂質分子種を同定した。

次に、これらの脂質分子種の細胞機能を明らかにする目的で、これらの上皮細胞特異的な脂質分子種の生合成に関わる脂質代謝酵素の同定およびその抗体作成を進めた。現在、作成した抗体の評価および、脂質代謝酵素を CRISPR-Cas9 システムで遺伝子破壊した細胞株の樹立を進めている。

さらに、この脂質分子種の機能解析を行う上で、細胞内における局在の観察が重要になると考え、蛍光色素標識した脂質アナログの作成を開始した。現在予備的に、同様の蛍光色素標識した脂質アナログを用いた細胞観察法技術の確立を進めている。

上皮間葉転換に依らない癌細胞の浸潤性の獲得機構として、細胞膜 Bleb による細胞運動が挙げられる。細胞膜 Bleb は細胞膜を裏打ちするアクチン細胞骨格から細胞膜が解離して形成される細胞膜の突出構造であり、細胞運動に関わることが知られている。今年度、細胞膜 Bleb に関する英文総説を 2 報出版した。引き続き、細胞膜 Bleb の形成における細胞膜脂質の関与について検討を進めている。

（英文）

The purpose of this study is to reveal the roles of membrane lipids in the epithelial mesenchymal transition (EMT), which is an important process for cancer cells to acquire invasiveness, and to clarify the significance of changes in the lipid composition of cell membrane during EMT.

In previous studies, our group established a method to isolate cell surface membranes (plasma membrane) using colloidal silica particles and established a methodology to identify molecular species of lipids constituting cell membranes by mass spectrometry (Ikenouchi et al. J Biol Chem 2012). Using this method, we compared the cell membrane lipids of epithelial cells and mesenchymal cells. Specifically, lipid profiles of cultured epithelial cells (Eph4 cells, an epithelial cell line derived from the mouse mammary gland) and mesenchymal cells (Eph4-Snail cells, in which Eph4 cells were transformed into mesenchymal cells by the over-expression of transcription factor Snail) were analyzed by mass spectrometry at the resolution of individual lipid species. As a result, we succeeded

in identifying lipid species which were found to be restricted in epithelial cells.

Next, to clarify the cellular functions of these epithelial-cell specific lipid species, we aimed to identify lipid metabolizing enzymes involved in the biosynthesis of these lipid species. We identified candidate enzymes responsible for biosynthesis of epithelial-cell specific lipids and we raised antibodies against these enzymes. Currently, evaluation of the raised antibodies and establishment of an epithelial cell line in which genes for the candidate enzymes are disrupted by using the CRISPR-Cas9 system are under way.

Furthermore, in order to analyze the subcellular distribution of these epithelial-cell specific lipid species, we started to prepare a fluorescent dye-labeled lipid analog. Currently, we are establishing of imaging methods to observe the fluorescent dye-labeled lipid analog.

In addition to EMT, cell migration using membrane blebs are considered to be a mechanism for acquiring invasiveness of cancer cells. The membrane bleb is a protrusion of the cell membrane formed by detachment of the cell membrane from the actin cytoskeleton underlying the cell membrane. This year, our group published two review articles on membrane bleb. Currently, we are investigating the involvement of membrane lipids in the formation of membrane bleb.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 3件）

1. Ikenouchi J, Aoki K. Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases. *Small GTPases*. 2016, 17, 1-5
2. Ikenouchi J. How do cells sense actin cortex-free membrane? *Cell Cycle*. 2016, 15, 2687-8.
3. Nishimura T, Ito S, Saito H, Hiver S, Shigetomi K, Ikenouchi J, Takeichi M. DAAM1 stabilizes epithelial junctions by restraining WAVE complex-dependent lateral membrane motility. *J Cell Biol*. 2016, 215, 559-573
4. 池ノ内順一, 細胞膜における脂質の動的な振る舞い, 「生物の科学 遺伝」2017, 71, 20-25

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Dynamic interplay between plasma membrane and actin cytoskeleton, ポスター、Aoki K, Ikenouchi J. ASCB 2016 annual meeting, San Francisco, 2016/12/5、国外.
2. 上皮細胞の細胞膜構造形成における細胞膜脂質の役割, 口頭, 池ノ内順一, 第89回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内
3. タイトジャンクション形成における細胞膜脂質の関与, 口頭, 重富健太, 池ノ内順一 第68回日本細胞生物学会大会, 2016/6/17, 国内

4. Local reassembly of the actin cortex in membrane blebbing, 口頭, 青木佳南, 前田史世, 長迫智也, 望月優輝, 内田誠一, 池ノ内順一, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016/6/17, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し