

タイトル	抗がん剤存在下におけるがん細胞内の微小管および接着斑に対するダイナミクス計測
著者	水谷, 武臣; 田中, 良昌; Mizutani, Takeomi; Tanaka, Ryosuke
引用	工学研究: 北海学園大学大学院工学研究科紀要(25): 39-46
発行日	2025-09-30

研究論文

抗がん剤存在下におけるがん細胞内の微小管および 接着斑に対するダイナミクス計測

水谷 武臣*・田中 良昌**

Dynamical behavior of Microtubule and focal adhesion in cancer cells under
the treatment of chemical anticancer agents

Takeomi Mizutani* and Ryosuke Tanaka**

要 旨

がん細胞の浸潤において、細胞と細胞外基質をつなぐ細胞-基質間接着が新たに形成されることは重要である。例えば、がん化した上皮細胞は浸潤の最初のプロセスとして基底膜との間に接着を形成し、その後基底膜の分解と自身の運動により浸潤を進行させる。またこの接着形成には、微小管の影響を受けることも示唆されている。そこで本研究では細胞-基質間接着の形成過程に着目し、そこへの微小管の寄与を明らかにすることを目的とした。

新たに形成される細胞-基質間接着とその時間変化を定量的に評価するために、接着複合体タンパク質の一つである Focal Adhesion Kinase (FAK) に蛍光タンパク質を融合させたもの (Azami Green-FAK) を細胞に導入し、その細胞を浮遊状態にした後に基質へと接着する過程を蛍光顕微鏡で経時観察した。また、接着面での蛍光強度から、接着複合体が形成された量の時間変化を評価した。この手法により、斑状の接着複合体 (接着斑) として観察されない初期段階での定量を可能にした。さらに、微小管の存在が細胞-基質間接着に影響を与えるのかを明らかにするために、抗がん剤としても知られる微小管の脱重合剤 (ノコダゾール) で処理された細胞に対して接着複合体の形成量を測定した。微小管を脱重合させた細胞では接着複合体の形成が遅くなった。このことから、微小管の存在は細胞-基質間接着の形成を促進させると予想される。この仮説を裏付けるために、微小管を安定化させる薬剤 (タキソール; 抗がん剤の一種) で処理された細胞について同様の観察を行った。予想に反し、タキソール処理を施した細胞ではノコダゾールと同様に接着複合体の形成が遅くなった。これらの結果から、接着の形成は微小管の影響を受けるものの、微小管の存在のみでは接着形成への影響を説明できないことが明らかになった。

1. 序論

1.1 細胞-基質間接着とがん

がん細胞は原発巣から他の組織へと浸潤、転移し、移動した先で無秩序に増殖することで体中の臓器を機能不全へと追いやり、患者を死に至らしめる。細胞-基質間接着の形成はがん細胞の浸潤の過程においても重要であると言われている。例

えば、上皮細胞ががん化して浸潤を開始する際、がん細胞は始めに基底膜との間に接着を形成する。基底膜と接着した後に、がん細胞は基底膜の分解、細胞運動を進め浸潤を進行させる。さらに、間質へ到達した後も細胞は間質への接着、分解、運動の過程を繰り返し進行するため、この過程においても細胞-基質間接着が必要である。このように、細胞-基質間接着の形成はがん細胞の進行においても重要なプロセスである。

* 北海学園大学大学院工学研究科電子情報生命工学専攻

Graduate School of Engineering (Electronics, Information, and Life Science Eng.), Hokkai-Gakuen University

** 北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻

Graduate School of Life Science, Division of Life Science, Hokkaido University

1.2 細胞-基質間接着複合体

細胞は integrin を介して細胞-基質間接着複合体（以後「接着複合体」とする）を形成することで細胞外基質と接着する。integrin は α サブユニットと β サブユニットのヘテロダイマーを形成する膜貫通型タンパク質であり、脊椎動物ではこれまでに α サブユニットが 18 種類、 β サブユニットが 8 種類、ヘテロダイマーが 24 種類知られている¹⁾。サブユニットの組み合わせによって異なる基質タンパク質と結合し、様々な種類の細胞外基質と接着することができる。細胞外ドメインは基質繊維と結合し、細胞内のドメインは接着複合体を形成する足場となる。接着複合体は多くのタンパク質から構成され、その役割は様々である。例えば、Talin や Tensin, Vinculin のような接着複合体タンパク質は細胞骨格繊維の一つであるアクチン繊維と結合し、細胞-基質間接着をより強固なものにする。また、Focal Adhesion Kinase (FAK) や p130Cas はシグナル分子として働く。これらの接着複合体分子の多くは、接着複合体形成の際に同時に集積することが知られている²⁾。

1.3 微小管と細胞-基質接着の相互作用

これまでに、微小管と接着複合体が相互作用しているという報告がされている。Kaverina らによって接着斑に向かって微小管が伸張する様子や接着斑上で微小管が安定する様子が観察され、微小管と接着斑の間の相互作用が示唆された³⁾。それに続き、微小管阻害時の接着斑観察により、微小管が接着斑を脱重合させることに寄与していることも示唆されている⁴⁾。微小管と接着複合体をつなぐ要素としていくつかの候補が挙げられている。微小管結合タンパク質という観点からは、微小管のプラス端に局在するタンパク質である APC, MACF1/ACF7 などが、接着複合体が脱重合することに関与していることが知られている^{5,6)}。また、微小管の輸送という観点から、輸送の動力となるモータータンパク質の kinesin-1, エンドサイトーシスに関与する clathrin や dynamin などが接着複合体の脱重合を制御していることも知られている^{4,7,8)}。このように、微小管は微小管結合タンパク質や微小管上の輸送を介して、接着複合体と密接な関係を持っていることが示唆されてきている。

1.4 抗がん剤ターゲットとしての微小管

抗がん剤にはコルヒチン、ビンクリスチン、タキソールといった微小管をターゲットとしたものがある。微小管の機能を阻害することによるがんの抑制は、主に細胞分裂を抑制することを目的としているが、前述のように微小管は細胞内において細胞極性、細胞運動、細胞-基質間接着といったさまざまな機能と密接に関係しているため、分裂以外のがん細胞の性質にも影響を与えていると考えられる。従って、微小管阻害によるがん細胞の分裂以外への影響を知ることは、微小管阻害薬の抗がん剤としての効果を正確に知る上で重要な知見になると考えられる。特に、微小管と細胞-基質間接着の相互作用は、前述のようながん細胞の細胞外基質への接着を制御することでがんの浸潤プロセスに関与している可能性があり、重要であると考えられる。

1.5 本研究の目的

前述のように、接着複合体と微小管の間には密接な関係があることが示唆されてきた。しかし、これまでの微小管の細胞-基質接着に対する寄与を明らかにする研究は、基質に接着した細胞における接着複合体の脱重合という観点からの研究がほとんどであった。細胞運動のように接着の重合と脱重合を繰り返すことで進行する現象においては、脱重合を議論することは重要である。一方で、前述したがんの浸潤プロセスの最初の過程である基底膜への接着のような現象では、新しく接着が形成される過程が重要である。しかしながら、新たに細胞-基質間接着を形成する過程における微小管の寄与はこれまでにほとんど報告されていない。その要因として、接着複合体が形成される瞬間と微小管の局在を対応付けることが困難であること、また、これまで微小管の阻害によって接着斑の数が増加することが観察されてきたことが挙げられる。しかしながら、すでに基盤に張り付いている細胞の接着複合体の数は、重合と脱重合が釣り合っている際の接着複合体の量であり、直接重合や脱重合の速度を反映してはいない。実際に、微小管結合タンパク質である ACF7 のノックアウト細胞では接着複合体の脱重合速度だけでなく、重合速度も増加するという結果が得られている⁶⁾。そこで本研究では、接着複合体の形成が支

配的である，細胞が基質に接着する過程の観察を行い，微小管が接着複合体へ与える影響を明らかにすることを目的として研究を進めた．

2. 実験材料と手法

2.1 細胞培養

本研究では，ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いた．細胞は環境を 37℃，5 % CO₂，湿度 100% に調整したインキュベータ内で培養した．培養液は DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) の中に BIST-TEC (Bist-Tec Fetal Bovine Replacement, EQUITECH-BIO) と抗生物質 (Antibiotic-antimycotic, Sigma) をそれぞれ 10%，1 % の濃度になるよう加えたものを用いた．細胞密度が約 90 % 以上になった際には継代を行った．また，観察用のサンプル作製にも同様の手順を用いた．トリプシン (0.25 % Trypsin-EDTA (1X), Invitrogen) で処理することで，細胞を基盤からはがして浮遊状態にする．DMEM を加えチューブに移し，1000 rpm で 2 分間遠心処理を行った．上清を取り除き，DMEM を加えゆっくりと懸濁し，一部を細胞培養ディッシュもしくは観察用ガラスボトムディッシュに播種した．

2.2 プラスミド構築と遺伝子導入

蛍光ライブセルイメージングを行うために，目的のタンパク質に蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を細胞内に強制発現させた．まず，Azami Green もしくは Kusabira Orange が入ったプラスミドベクター (phAG-MNL/MCL もしくは phmKO2-MC/MN, MBL) を購入し，そこへ PCR で増幅させた目的遺伝子を導入した．構築したプラスミドベクターは以下のとおりである．

Azami Green-FAK (AG-FAK) : 接着点
Kusabira Orange-Lyn (KO-Lyn) : 細胞膜
Kusabira Orange-tubulin (KO-Tub) : 微小管
Azami Green-EB1 (AG-EB1) : 微小管のプラス端

作製したプラスミドベクターについては，リポフェクトアミン (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Invitrogen) を用いて細胞内に導入した．

2.3 顕微鏡観察

マトリゲル (Corning 社製) がコートされたガラスボトムディッシュ上に細胞を播種し，接着する過程を共焦点顕微鏡 (C1, Nikon) で観察した．観察時での培養液の蒸発を防ぐために，培養液の上にミネラルオイル (Mineral oil, Embryo tested; sterile-filtered, Sigma) を重層した．測定は 10 分おきに 2 時間行い，観察中は温度調整装置を用いて温度を 37℃ に保った．

微小管の機能を阻害するために，ノコダゾール (Nocodazole, Sigma) とタキソール (Paclitaxel, Sigma) を用いた．試薬は終濃度がそれぞれ 30 μM，200 nM になるよう投与した．試薬投与のコントロールには，ノコダゾールやタキソールを溶かしている溶媒の DMSO (Dimethyl sulfoxide) を用いた．試薬処理は播種前の懸濁状態の細胞に 30 分間行い，細胞播種後も同じ濃度で処理を続けた．

接着面に集積した接着複合体の輝度を測定するための工夫として，ガラス面を撮影し，それ以外のディフューズした接着複合体の輝度を測定するために細胞の頂端から接着面まで 2 μm 間隔で z スタック撮影を行った．接着面は反射干渉測定を行った際にガラスによる反射輝度が最も高くなった面として定義した．

2.4 画像解析

得られた画像から輝度の解析を行うために，アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発されたオープンソースの画像解析ソフトである ImageJ を用いた．

先行研究による接着複合体の定量は，ほとんどが斑状になった複合体を定義しその面積や輝度を定量している．しかし，この方法では接着形成初期のあいまいな接着の量を定量できないだけでなく，小さな接着複合体の情報が失われてしまう可能性もある．接着形成初期の接着複合体の量を正確に測定するために，接着面に集積した接着複合体の量を AG-FAK の輝度で評価した．しかし，単に接着面の輝度の総和をとるだけでは接着複合体の量を正確に評価することはできない．その理由は 2 つ考えられる．第一に AG-FAK の発現量が細胞によって異なること，第二に接着面で取得された輝度にはディフューズした AG-FAK の輝

度も影響するため、接着面に FAK が集積していなくても接着面積に比例した輝度の増加が測定結果に反映されてしまうことである。そこで、以下の式に当てはめて輝度解析を行うことにより、この問題を以下の数式によって解決を試みた。

$$I_{complex} = \frac{I_{bottom} - kSI_{diffuse}}{I_{diffuse}}$$

$I_{diffuse}$ はディフューズ輝度を面積で割ったもの、 S は接着面積、 I_{bottom} は接着面の総輝度である（図 1）。輝度の総和から $SI_{diffuse}$ を引くことによりディフューズ成分を差し引き、 $I_{diffuse}$ で割ることで AG-FAK の発現量の差によって生じるシグナルの大小をノーマライズした。細胞上部で測定されたディフューズ輝度と接着面で測定されるディフューズ輝度の間には比例関係があると想定することができ、 k はその比例定数である。

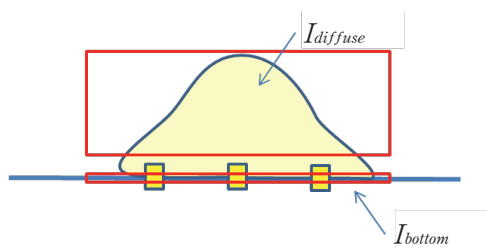


図 1 FAK による蛍光シグナルの解析

FAK は細胞質をディフューズしているか ($I_{diffuse}$)、基質との接着面に存在しているか (I_{bottom})、のいずれかの局在をとる。細胞質には核がありそこには FAK は侵入することは出来ない。細胞質をディフューズしている成分 ($I_{diffuse}$) を評価するためには、核を避けた箇所での計測が必要となる。そこで、KO-Lyn を共発現させることで細胞膜の位置を定義し、核が存在しない細胞膜より $2\mu\text{m}$ 内側の輝度を測定することにより、 $I_{diffuse}$ を求めた。詳細な手順は以下のとおりである。

- ①KO-Lyn の画像を開く
- ②KO-Lyn の画像を Gaussian Blur によってぼかす
- ③Threshold で二値化して細胞の外形を定義する
- ④Wand ツールで外形を選択する
- ⑤Band ツールで外形の外側に細い ($0.5\mu\text{m}$) バンドの領域を作り、Measure でバンド領域の輝

度の平均値をとる。Extend ツールで外形の領域を 1 ピクセルずつ狭め、同様の処理を繰り返す。輝度の平均値が最も高い領域を膜の位置とする

- ⑥AG-FAK の画像を開く

- ⑦Restore Selection ツールで膜の位置の選択領域を AG-FAK の画像上に表示する

- ⑧Extend ツールで領域を $2\mu\text{m}$ 狭め、Band ツールで $2\mu\text{m}$ の領域のバンド領域を取得する。Measure で輝度平均をとる。

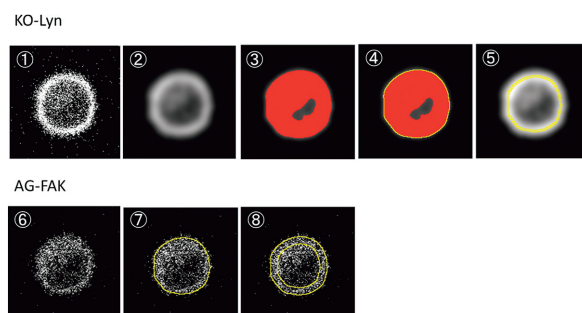


図 2 $I_{diffuse}$ の抽出

2.5 接着複合体定量法の妥当性検証

本研究で用いた輝度による接着複合体の定量法が正しく機能しているかを確認するために、すでに接着を形成している細胞に対して接着構造を減少させることが知られているアクチン繊維の阻害⁹⁾を行い、従来の接着斑面積を測定する手法と比較することでその妥当性を検証した。FAK-AG, KO-Lyn 共発現細胞をラミニンコート基盤上に播種し、12時間以上が経過した細胞に対してアクチン重合の阻害剤であるラトランキュリン処理を行い、10分ごとに2時間経時観察を行った。接着斑の面積変化と輝度による定量の両方の解析方法を同じ結果に対して行ったところ、どちらも同様に接着複合体の減少をとらえることができていた（図3）。このことから、接着面の輝度の変化を追跡することにより従来の手法と同様に接着複合体の量を定量することができることが確認された。

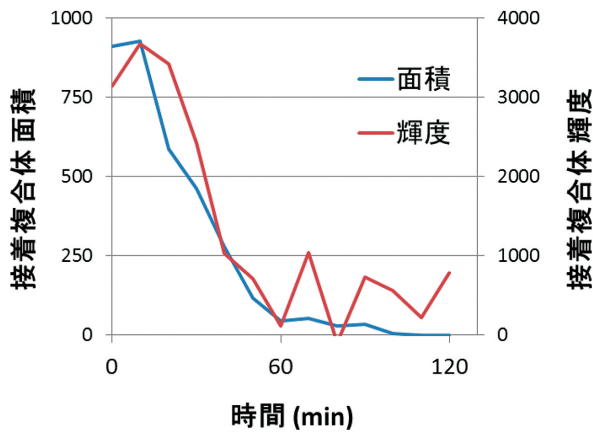


図3 アクチン阻害時の接着複合体変化の評価

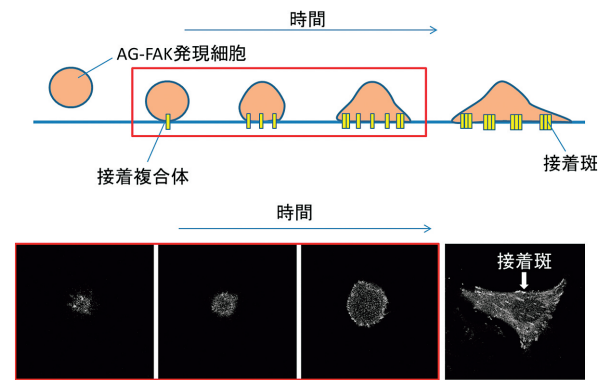


図4 細胞の接着形成のイメージ図と接着複合体形成の顕微鏡像

2.6 有意差検定

試薬処理による接着複合体の形成量の差の優位性を統計的に判定するために、 t 検定を用いた。検定はExcelを用いて行った。始めに、 F 検定により比較する二つの標本の分散に有意差があるかの検定を行った。有意水準を5%とし、 F 値が5%以上である場合等分散、それ以下の場合不等分散とした。次に、 t 検定を用いて比較する二つの標本の平均値の差が有意であるかの判定を行った。 F 検定の結果に応じて、等分散の t 検定または不等分散の t 検定を行った。 t 値が95%の信頼区間の外側に来る確率を P とした。

3. 結果と考察

3.1 微小管脱重合剤処理下における接着複合体形成

微小管の存在が接着に与える影響を明らかにするために、浮遊状態の細胞に微小管の脱重合剤であるノコダゾール処理で処理を行った後に、接着複合体形成量の時間変化を撮影した（図4）。その結果、ノコダゾール処理された細胞は、DMSOコントロールよりも接着複合体の形成速度が遅くなる様子が観察された（図5）。このことから、微小管は接着複合体の形成速度に影響を与えることがわかった。

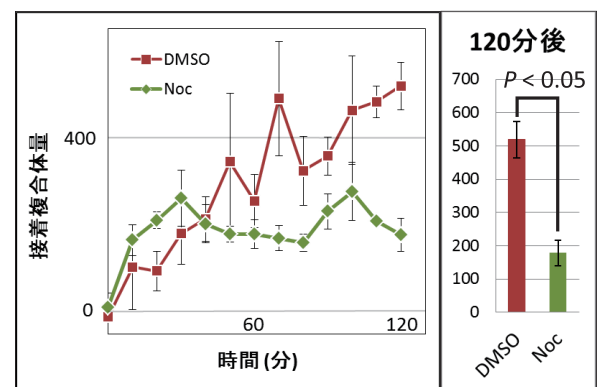


図5 ノコダゾール投与下における接着複合体形成量の時間変化

3.2 微小管安定化剤処理下における接着複合体形成

3.1の結果より、微小管の存在が接着複合体の形成を促進しているという仮説が浮かび上がった。それを検証するために、微小管の安定化剤であるタキソールを投与した際の接着複合体形成量の時間変化を追跡した。この仮説に基づくと、微小管の安定化剤は微小管の存在には影響を与えないため、接着複合体の形成は変化しないと予想される。しかし、結果は予想に反し、ノコダゾール処理をされた細胞と同様に接着複合体形成速度がコントロールよりも遅くなる様子が観察された（図6）。この結果から、微小管の有無だけではなく何らかの微小管の機能が接着複合体の形成に関与しており、タキソール処理によってそれが阻害されたと考えられる。

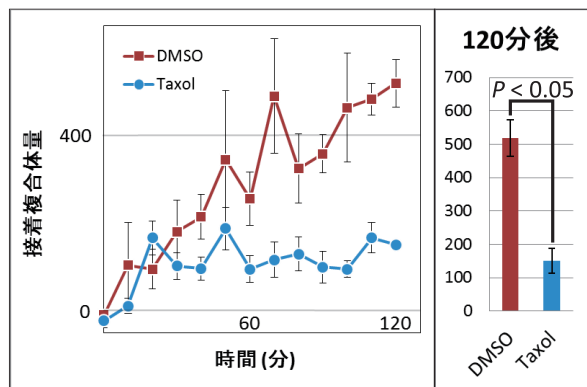


図 6 タキソール投与下における接着複合体形成量の時間変化

3.3 微小管安定化剤の EB1 局在への寄与

タキソール処理が微小管に対して与える影響を調べるために、細胞内に発現させた KO-Tub と AG-EB1 によって微小管先端に結合するタンパク質である EB1 とチューブリンを異なる色で蛍光標識し、タキソール処理によってそれらがどのように変化するかを観察した。微小管の局在は、タキソール処理によって、大きな変化は見られなかった（図 7 (a), (b)）。一般的なタキソールの効果である微小管の安定化は微小管の構造を変化さ

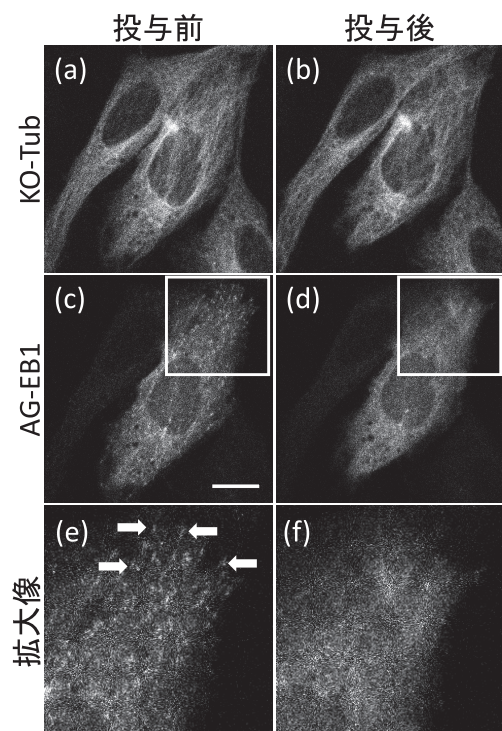


図 7 タキソール投与下における細胞内微小管と EB1 の局在の変化

せないため、この結果は妥当であるといえる。一方で、微小管の先端に局在していた EB1 の局在がなくなる様子が観察された（図 7 (c), (d), (e), (f)）。このことから、タキソール処理は微小管の構造に変化を与えない一方で、微小管結合タンパク質の微小管上の局在に影響を与えることがわかった。

3.4 ノコダゾール処理とタキソール処理による接着形成速度変化の考察

微小管を脱重合させた細胞と安定化させた細胞では、どちらも接着複合体の形成速度が遅くなった。微小管の脱重合が接着複合体の形成を遅くすることは微小管が接着複合体の形成に寄与していることを示している。しかし、微小管の繊維構造を変化させることがないタキソール処理も接着複合体の形成を抑制していることから、接着複合体の形成には単に微小管が存在することだけではなく、タキソールによって変化させられた何らかの微小管の機能が関与していると考えられる。本研究では、その機能の一つとして微小管結合タンパク質に対する作用に着目した。タキソールは微小管に結合することによって微小管を安定化させる薬剤であるため、微小管結合タンパク質と競合することによって微小管結合タンパク質が微小管に結合するのを阻害していると考えられる。本研究でノックアウトによる接着複合体形成への影響を検証した微小管結合タンパク質は微小管の先端に局在する 3 種類のみであったが、実際にタキソールが影響を与えている要素はほかにも多く存在すると考えられる。第一に、微小管結合タンパク質は EB1 や APC のほかにも MAPs など多くが知られており、実際にはタキソール処理は多くの微小管結合タンパク質の微小管上の局在に影響を与えていると考えられる。第二に、タキソール処理による微小管ダイナミクスの抑制も細胞に何らかの影響を与えている可能性がある。例えば、微小管の脱重合は RhoA の活性化を引き起こし¹⁰⁾、RhoA によるアクチン重合の制御が接着複合体のダイナミクスを制御する一つの要因になっていると考えられている。しかしながら、本研究で観察されたように、EB1 や APC のノックアウトは接着複合体の形成速度に大きな変化を与えており、タキソールによる接着複合体形成の速度変化はこれらのタンパク質が阻害された影響によるものが

大きいことを示しているのではないかと考えられる。

3.5 EB1 や APC を介した微小管の接着複合体への寄与モデル

APC はがん抑制遺伝子の産物として知られており、微小管との相互作用が多く議論されている¹⁰⁾。APC は微小管上を移動して、微小管先端に集積する様子が観察されている。また、微小管の存在に依存して細胞の縁に局在しており、微小管が阻害されると細胞の中心付近へ局在が変化する（図 4.1(a)）。APC は浮遊細胞が接着する際に細胞の縁に局在することや、*vitro* の系ではアクチンの核形成に役立っているという報告もされている¹¹⁾。このことから Arp2/3 がアクチンの核形成を介して接着複合体形成と関わっているように、APC も接着複合体形成に関与している可能性がある。微小管を介して細胞の縁に局在した APC によって、細胞の縁のアクチン核化が促され、接着複合体の形成を促進していると考えられる。

EB1 は微小管のプラス端に局在するタンパク質であり、細胞膜が微小管の先端と相互作用するのに必要であるといわれている。例えば Hela 細胞では、EB1 を欠損させることで細胞表層の微小管が少なくなることが報告されている。従って、EB1 をノックアウトすることは、細胞膜と微小管との相互作用を弱めることにつながると考えられる。本研究で観察された EB1 ノックアウトによる接着複合体形成速度の減少は、細胞膜と微小管先端の相互作用が弱まることにより、細胞膜と APC のような微小管先端に局在するタンパク質との相互作用や、小胞による細胞膜への接着複合体タンパク質の輸送が阻害されたためであると考えられる。

本実験の結果と上記の考察をふまえた、EB1 が接着複合体の形成へ寄与するモデルを図 8 に示す。EB1 によって細胞膜へとつなぎ止められた微小管の先端に向かって APC が移動・集積し、アクチンの核形成をすることにより接着複合体の形成を促進する。EB1 が微小管上に局在してしないと微小管の先端が接着面から離れ、微小管先端と接着面の相互作用が弱くなるために接着複合体の形成が抑制されると予想する。

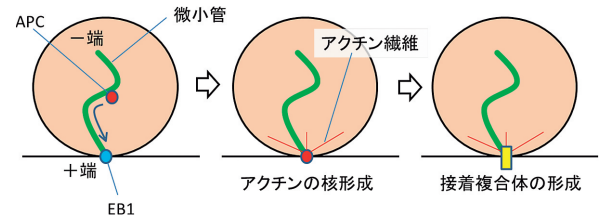


図 8 EB1 と APC を介した微小管による接着複合体形成促進モデル

4. あとがき

細胞-基質間接着の形成過程に着目し、そこへの微小管の寄与を明らかにすることを目的とし、微小管を安定化させる薬剤（タキソール；抗がん剤の一種）で処理された細胞について同様の観察を行った。予想に反し、タキソール処理を施した細胞ではノコダゾールと同様に接着複合体の形成が遅くなった。これらの結果から、接着の形成は微小管の影響を受けるものの、微小管の存在のみでは接着形成への影響を説明できないことが明らかになった。

本研究で得られた実験結果からモデルを提案したが、微小管が接着を形成する際に接着付近でどのように局在しているか、または EB1 や APC をノックアウトした際に具体的に微小管がどのように変化しているかは明らかになっていないため、今後実験を行っていく必要がある。例えば、ライブセルイメージングによる接着形成時の接着付近での微小管の局在またはダイナミクスの観察や、EB1 や APC ノックアウト時の浮遊細胞の微小管局在などの観察を行う。このような実験により微小管が接着形成時に空間的にどのように働いているかを明らかにすることによって、微小管が接着形成に影響を与えるメカニズムにさらに迫りたいと考えている。

参考文献

- 1) Luo BH, Carman CV, Springer TA: Structural basis of integrin regulation and signaling, *Annu Rev Immunol.*, 25, pp.619-647, 2007.
- 2) Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR: Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner, *Nat Cell Biol.*, 10, (9), pp.1039-1050, 2008.
- 3) Kaverina I, Rottner K, Small JV: Targeting, capture,

- and stabilization of microtubules at early focal adhesions, *J Cell Biol.*, 142, (1), pp.181-190, 1998.
- 4) Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG: Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase, *Nat Cell Biol.*, 7, (6), pp.581-590, 2005.
 - 5) Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A: Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells, *EMBO J.*, 29, (7), pp.1192-1204, 2010.
 - 6) Wu X, Kodama A, Fuchs E: ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity, *Cell*, 135, (1), pp.137-148, 2008.
 - 7) Krylyshkina O, Kaverina I, Kranewitter W, Steffen W, Alonso MC, Cross RA, Small JV: Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1, *J Cell Biol.*, 156, (2), pp.349-359, 2002.
 - 8) Ezratty EJ, Bertaux C, Marcantonio EE, Gundersen GG: Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells, *J Cell Biol.*, 187, (5), pp.733-747, 2009.
 - 9) Hu YL, Haga JH, Miao H, Wang Y, Li YS, Chien S: Roles of microfilaments and microtubules in paxillin dynamics, *Biochem Biophys Res Commun.*, 348, (4), pp. 1463-1471, 2006.
 - 10) Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA: Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton, *EMBO J.*, 18, (3), pp.578-585, 1999.
 - 11) Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S: Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells, *J Cell Biol.*, 148, (3), pp.505-518, 2000.