

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871074

研究課題名(和文)アクチン細胞骨格制御を介したがん浸潤性獲得機構の分子基盤とその制御

研究課題名(英文)The molecular mechanisms and regulation of acquisition of tumor invasive abilities through actin cytoskeleton remodeling

研究代表者

大石 智一(OHISHI, Tomokazu)

公益財団法人微生物化学研究会・沼津支所・研究員

研究者番号：50442546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼのタンキラーゼ結合タンパク質TAB182の機能とその破綻がどのようにがんの細胞運動・浸潤能に寄与するか、またタンキラーゼによるTAB182の制御機構を明らかにすることを目的とした。1) TAB182の枯渇はいくつかのがんで亢進しているROCK-LIMK経路を亢進させた。またTAB182の枯渇がなくてもタンキラーゼの過剰発現がROCK-LIMK経路を亢進させ細胞運動・浸潤能につながることを見出した。2) 上記の現象が臨床がんでも観察できるかがん組織アレイを用いて検討したところ、膵がんの非浸潤部に比べて浸潤部でTAB182の有意な発現低下が認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the function of TAB182, which is a binding protein of poly(ADP-ribose)polymerase tankyrase, and the involvement of TAB182 dysfunction in the regulation of cancer cells migration and invasion. 1) TAB182 depletion activated the ROCK-LIMK pathway, which is overexpressed in various cancer cells, and enhanced cancer cell migration and invasion. Tankyrase overexpression also activated the ROCK-LIMK pathway without depletion of TAB182. 2) To investigate the involvement of TAB182 expression changes in the clinical cancer setting, we performed tissue microarray-based immunohistochemistry. Among various cancers, TAB182 expression was significantly lower in the area of invasion than that of non-invasion in pancreatic cancer.

研究分野：がん微小環境

キーワード：アクチン細胞骨格 細胞運動 浸潤 ポリ(ADP-リボシル)化

1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤における運動能亢進はがん悪性化に伴う形質転換の一種である。上皮細胞のがん化の過程において、がん細胞は細胞間接着を維持した上皮様の状態から線維芽細胞様の間葉の状態へ(EMT:上皮-間葉移行)、さらには間葉の状態からアメーバ様へ形態を変化させることによりマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)非依存的な浸潤能を獲得する(MAT:間葉-アメーバ様移行)(Sabeh et al., *J. Cell Biol.*, 2009)。このとき、アメーバ様に変化した細胞の駆動力はROCK(Rho-associated protein kinase)シグナルによって生み出されていることが知られている(Yamazaki et al., *Oncogene*, 2009)。近年行われたMMPを標的とした臨床試験が良好な結果を示さなかったのは、がん細胞のプロテアーゼ非依存的な浸潤能獲得が背景にあると考えられる。がん細胞は生体内においてがん微小環境の変化にともなって運動能を変化させており、これらの分子機構の解明はがんの浸潤・転移を標的とした治療の確立に不可欠である。

がんの運動能の変化にはアクチン細胞骨格の再構成が必須である。アクチン脱重合因子のCofilinはROCKシグナルの下流でアクチン再構成を制御する主要因子であり、リン酸化酵素のLIMキナーゼと脱リン酸化酵素のSlingshotによって厳密に制御されている。Cofilinのリン酸化と脱リン酸化、すなわちCofilinリン酸化サイクルの速度が、アクチン細胞骨格内のアクチンのターンオーバー速度を調節しており、このバランスによってアクチンの重合・脱重合を介したアクチン構造変化を引き起こすことが可能になる。これまで浸潤がんにおいてCofilin、LIMキナーゼ、Slingshotの発現変化が報告されており、Cofilinリン酸化サイクルの亢進ががんの浸潤に重要であると考えられている(Wang et al., *Nature Rev. Cancer*, 2007)。

我々はこれまでに、ポリ(ADP-リボシル)化酵素(PARP)ファミリーの一員でありテロメア伸長因子であるタンキラーゼに着目して実験を行い(Ohishi et al., *Cancer Res.*, 2010)、タンキラーゼの阻害ががんの治療に有用であることを示してきた(Seimiya, Ohishi et al., *Cancer Cell*, 2005, McCabe, Ohishi et al., *Oncogene*, 2009)。この実験の過程で我々は、タンキラーゼ結合蛋白質として我々の研究室で同定した新規蛋白質TAB182を枯渇させた細胞が、ROCKシグナルを活性化させ、細胞の運動・浸潤能の亢進につながるのに対し、TAB182を過剰発現させた細胞が細胞の運動・浸潤能を低下させるという、これまでの知見からは予期しえない新しい事実を見出した。さらに代表的な浸潤がんの一種である膵がんにおいてTAB182の発現を検討したところ、非浸潤部に比べて浸潤部で有意にTAB182の発現低下が認められた。これらの結果から、TAB182はアクチン細胞骨格の再構成を介して細胞の運動・浸潤能を制御する因子であることが示唆された(論文投稿中)。これまでTAB182は、細胞辺縁部でF-アクチンと共局在すること、さらに試験管内でタンキラーゼによってポリ(ADP-リボシル)化されることが報告されているが

(Seimiya et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)その機能やタンキラーゼによる修飾の意義は明らかにされていない。

そこで申請者は、タンキラーゼとTAB182の機能的関与を検討した結果、タンキラーゼを過剰発現した細胞が、TAB182を枯渇させた細胞と同様に、Cofilinリン酸化サイクルを介した細胞の運動・浸潤能を亢進することを見出した。我々の見出した知見は、がんにおけるTAB182の発現低下またはタンキラーゼの機能上昇ROCKシグナル亢進Cofilinリン酸化サイクル亢進細胞運動・浸潤亢進という新しいスキームの可能性を示唆している。

2. 研究の目的

がんの浸潤・転移は生命を脅かす存在であり、その分子機構の解明はがん研究の極めて重要な課題である。本研究課題では、我々のグループが同定・命名した新規蛋白質TAB182の解析を中心に行うことにより、浸潤・転移能獲得の分子機構を解明すると共に、同経路を人為的に修飾し制御する手法の確立を目指す。がんの転移・浸潤において、がん細胞の運動能の亢進には細胞内のアクチン骨格の再構成が必須である。我々はTAB182の枯渇がROCKシグナルを活性化しアクチン脱重合因子Cofilinの機能を制御することにより細胞運動能の亢進につながることを見いだした。本研究においてTAB182を介したアクチン骨格の再構成の制御の解明を行う。これにより、新たながん転移抑制法の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

【研究の方法の概要】

本研究は、以下を柱として進めていく。

(1) TAB182によるROCKシグナル制御の分子機構

予備検討によって同定したTAB182結合蛋白質の解析を進めることにより、TAB182が関わるROCKシグナル伝達経路への影響を明らかにする。

(2) TAB182による細胞浸潤能制御に対するタンキラーゼの機能的関与

タンキラーゼのポリ(ADP-リボシル)化によるROCKシグナル伝達経路制御の詳細を明らかにする。さらに、タンキラーゼ阻害剤によるがんの細胞運動や浸潤に対する効果を明らかにする。

(3) がん細胞の浸潤におけるTAB182の発現変動の意義

臨床検体を用いて、がんの病態や予後とTAB182の発現変動の関連を明らかにする。

【研究の方法の詳細】

(1) TAB182によるROCKシグナル制御の分子機構

ヒト線維芽肉腫HT1080細胞および子宮頸部癌HeLa細胞を用いた予備検討により、

TAB182 の枯渇が細胞の運動能および浸潤能を亢進すること、さらにこの分子機構として ROCK シグナルの活性化による Cofilin のリン酸化を見出している。この時 ROCK の特異的阻害剤 Y-27632 を処理することで、Cofilin のリン酸化および細胞運動能、浸潤能を抑制できる。以上から、TAB182 の枯渇は ROCK LIM キナーゼ Cofilin のシグナル経路を活性化することが考えられる。予備検討で数種類の TAB182 結合蛋白質を同定しているため、これらの蛋白質について低分子干渉 RNA (siRNA) で修飾した時の表現系を検討する。

TAB182 と直接相互作用し ROCK シグナル経路に参与する因子の相互作用機構の詳細をさらに検討する。

(2) TAB182 による細胞浸潤能制御に対するタンキラーゼの機能的関与

予備検討により、タンキラーゼを安定に過剰発現する HeLa 細胞は、TAB182 を枯渇させた時と同様の表現型を示す。この表現型にはタンキラーゼの酵素活性が必要であり、TAB182 の蛋白質質量自体には影響を及ぼさない。このことから、タンキラーゼによる TAB182 のポリ (ADP-リボシル) 化が、TAB182 の Cofilin 経路に対する機能を制御している可能性が考えられる。そこでまず、タンキラーゼが直接 TAB182 をポリ (ADP-リボシル) 化し、その機能を制御しているかどうか、検討を行う。また、タンキラーゼによる TAB182 のポリ (ADP-リボシル) 化がアクチン細胞骨格の制御に参与しているかを検討する。

我々はこれまで、PARP 阻害剤によってタンキラーゼの活性を抑制することが制がん効果につながることを示してきた (Seimiya, Ohishi et al., *Cancer Cell*, 2005)。近年、タンキラーゼ選択的阻害剤が開発されたことから (Huang, et al. *Nature*, 2009)、タンキラーゼを安定に過剰発現して細胞運動能を亢進している HeLa 細胞へタンキラーゼ阻害剤を処理し、細胞浸潤能への影響を検討する。

既述のタンキラーゼによる TAB182 の修飾がアクチン細胞骨格を制御していることが認められた場合、タンキラーゼが TAB182 に対して支配的であると考えられる。そこで、タンキラーゼ阻害剤を用いてタンキラーゼの酵素活性機能を低下させた細胞について、ROCK シグナル、Cofilin のリン酸化、TAB182 のポリ (ADP-リボシル) 化の変動を検討する。

(3) がん細胞の浸潤における TAB182 の発現変動の意義

上皮由来のがん細胞に TGF- β を用いて EMT を誘導した時、TAB182 の発現変動を検討する。

我々の予備検討では、膵がんや腎臓がんが正常組織に比べ TAB182 の発現低下が観察されている。これらの発現量を臨床病理学的データと照らし合わせ、がんの臨床病態や予後との関連を検討する。また、臨床検体から

蛋白質を抽出し、TAB182 の発現量の確認を行う。収量の問題で蛋白質抽出を行うのが困難な場合は、RNA を抽出しリアルタイム PCR により発現量を測定する。

4. 研究成果

(1) TAB182 による ROCK シグナル制御の分子機構

TAB182 と同結合タンパク質 CapZ の枯渇は ROCK LIM キナーゼ Cofilin のシグナル経路を活性化することにより細胞浸潤能を亢進することを見出した。

TAB182 の C 末領域 (aa1543-1635) を介して CapZ と結合することを見出した。

(2) TAB182 による細胞浸潤能制御に対するタンキラーゼの機能的関与

タンキラーゼは GST-TAB182 をポリ (ADP-リボシル) 化することを見出した。

タンキラーゼの過剰発現は TAB182 の発現量に変化を与えず、ROCK LIM キナーゼ Cofilin のシグナル経路を活性化するのに対し、タンキラーゼ阻害剤は同シグナル経路を抑制した。このことからタンキラーゼのポリ (ADP-リボシル) 化活性が ROCK LIM キナーゼ Cofilin シグナル経路の活性化に必要であることが示唆された。

既述のように、タンキラーゼ阻害剤の処理はタンキラーゼ過剰発現細胞の浸潤能を抑制するが、この時、TAB182 のタンパク質量にほとんど影響を与えなかった。また、TAB182 の枯渇も同様に CapZ のタンパク質量にほとんど影響を与えなかった。

(3) がん細胞の浸潤における TAB182 の発現変動の意義

いくつかのがん細胞に TGF- β を用いて EMT を誘導した時、TAB182 の発現量に変化はなかった。

TAB182 の発現変動が臨床がんでも観察できるかがん組織アレイを用いて検討したところ、膵がんの非浸潤部に比べて浸潤部で TAB182 の有意な発現低下が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Bladder Cancer Stem-Like Cells: Their Origin and Therapeutic Perspectives
Ohishi T, Koga F, Migita T *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 43, 2016. DOI:10.3390/ijms17010043.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 膀胱がんにおける上皮間葉移行を介した幹細胞性の獲得(第74回日本癌学会学術総会、2015年、10月8日、松山全日空ホテル、松山)
2. タンキラーゼ結合タンパク質 TAB182 はアクチン細胞骨格の再構成を介してがん細胞の浸潤を調節する(第74回日本癌学会学術総会、2015年、10月9日、松山全日空ホテル、松山)
3. タンキラーゼ結合蛋白質 TAB182 による細胞浸潤能の制御(第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015年、6月11日、名古屋国際会議場、名古屋)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大石 智一 (OHISHI Tomokazu)

公益財団法人 微生物化学研究会 微生物
化学研究所 沼津支所 研究員

研究者番号：50442546