

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04296

研究課題名(和文) ヒト腫瘍におけるSrcの制御破綻と腫瘍進展

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of tumor progression induced by dysregulation of Src oncoprotein

研究代表者

岡田 雅人 (Okada, Masato)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10177058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：Srcチロシンキナーゼは最も初期に同定されたがん原遺伝子産物であり、様々ながんにおいて発現や活性の制御が破綻することによって浸潤・転移などがん進展に重要な役割を担うとされている。しかしながら、Srcのがん化に伴う制御破綻機構やがん進展における役割に関してはまだ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、がん化に伴うSrc遺伝子の発現制御機構、およびSrcに結合する活性化因子の解析を行うことにより、活性化Srcによるがん進展の新たな分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Src tyrosine kinase is the first-identified onco-protein, and plays a crucial role in promoting tumor malignancy, such as invasive and metastatic ability, when its function is upregulated during tumor progression. However, molecular mechanism underlying the dysregulation of Src expression/activity and its actual roles in tumor progression remain elusive. To address these issues, we analyzed the regulatory mechanism of SRC gene expression and the functions of scaffold proteins that activate Src. Based on these analyses, we proposed new models of the molecular mechanisms for Src-mediated tumor progression.

研究分野：生化学・腫瘍生物学

キーワード：がん進展 浸潤転移 Src チロシンキナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

Src チロシンキナーゼは、世界で最初に同定されたがん原遺伝子産物である。その発見以来、主に腫瘍ウイルス型 v-Src や活性化型変異体を用いた膨大な研究によって、Src に非常に強いがん化ポテンシャルがあることが示され、また、そのがん化およびがん進展の分子メカニズムが解析されてきた。ところが、実際のヒトがんにおいては Src 遺伝子に有意な変異がないことが確認され、Src ががん発生のドライバーとはならないことが明らかとなってきた。しかし、多様なヒトがんにおいて Src の活性亢進やタンパク質の発現上昇が認められ、その制御破綻した Src ががん進展、特に浸潤・転移能の獲得や血管新生などに重要な役割を担うことが認められている。また、薬剤耐性を獲得したがん細胞で Src が機能亢進することも見いだされ、Src ががん再発の治療標的となる可能性も指摘されている。このように、がんにおける Src の重要性が再認識されてきているが、では、なぜ Src に変異がないのか、どのように Src が制御破綻して腫瘍進展を促すのかなど、がんにおける Src の本質的な意義や機能に関しては未解決の課題がまだ多く残されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、がん遺伝子産物 Src チロシンキナーゼのがんにおける意義や機能を明らかにするために、(1)なぜヒトがんにおいて Src に変異がないのか、(2)どのように Src が制御破綻して腫瘍進展を促すのか、という二つの課題を解決することを目的とする。また、得られた知見から、Src シグナルを標的とした新たながん治療薬開発に向けた応用研究への道を拓く。

### 3. 研究の方法

(1)なぜヒトがんにおいて Src に変異がないのか

正常上皮細胞 (MDCK) およびがん細胞 (HT29) に、活性化変異型 Src を誘導的に発現する細胞を混ぜて培養し、Src 発現誘導後のその細胞の挙動を観察することにより Src 変異細胞の特性を明らかにする。また、その分子機序を明らかにするために、阻害剤スクリーニングを行い、現象に関わるシグナル経路を特定する。現象に関わる分子についてその機能を解析する。

(2)どのように Src が制御破綻して腫瘍進展を促すのか

正常細胞 (乳腺上皮細胞 MCF10A) に種々のがん関連遺伝子 (K-ras、HER2、p53 変異体など) を誘導的に発現する系を作製し、がん化に伴う Src の発現変動を解析する。また、TGFβ などがん微小環境に分泌されるサイトカインの影響も調べる。有意

な変動が見られた場合には、その分子機構を解析する。

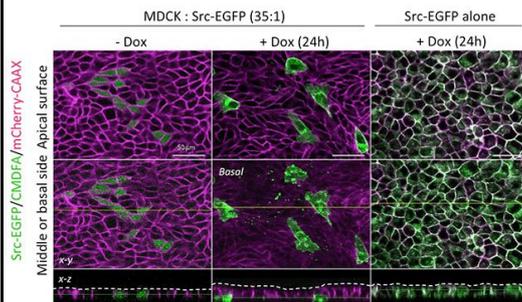
また、Src と結合することにより Src を活性化する因子の探索を、活性化 Src が集積する脂質ラフトに焦点をあて、質量分析などのプロテオミクスにより行う。候補分子が同定できたら、その Src の機能に対する作用を候補分子を KO した細胞を用いて解析する。さらに、Src の機能に関しては、高感度なリン酸化プロテオミクス解析により新たな基質を探索し、それらのがん進展における役割を解明する。

### 4. 研究成果

(1)なぜヒトがんにおいて Src に変異がないのか

正常上皮細胞層 (MDCK) の中に Src が異常に活性化した細胞が生じると、その細胞が基底側に浸潤して正常細胞層から逸脱することが観察された (図1)。また、がん細胞を用いた場合にも Src 活性化細胞ががん細胞層から逸脱することが認められた。これらのことから、Src が異常に活性化した変異細胞は組織環境に適応できずに排除されることが示唆された。また、その現象には、脂質ラフト、STAT3、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が関与することが明らかとなった。

図1. 変異Src発現細胞は基底側に浸潤する

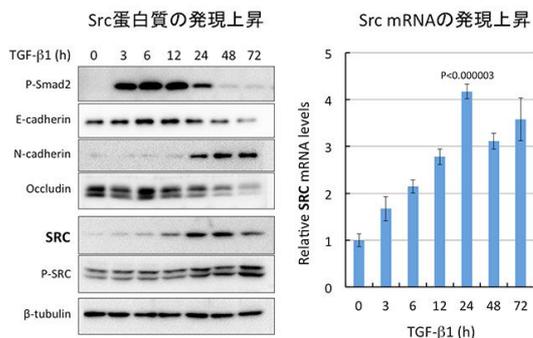


(2)どのように Src が制御破綻して腫瘍進展を促すのか

MCF10A 細胞に種々のがん関連遺伝子を導入してがん化した細胞を作製し、それらについて Src の発現や活性を検出したが、いずれの場合にも大きな変化は認められなかった。しかしながら、TGFβ で上皮間葉転換を誘導することにより、SRC 遺伝子の発現が著しく上昇することが認められた (図2)。その分子機序を解析した結果、TGFβ の下流の転写因子 Smad2/3-4 が直接 SRC 遺伝子上流のエンハンサーに結合することによって転写が促進されることが明らかとなった。また、その Src の発現上昇が細胞の浸潤能を高めることも確認された。さらに、Src 活性化にともなって ARHGEF5 という Rho GEF も発現上昇し、細胞骨格の再編を促すことも明らかとなった。これらのことから、がん細胞におい

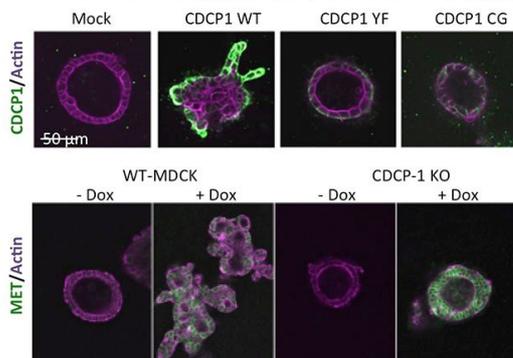
てもその微小環境におけるサイトカインによって Src が機能亢進してがん進展に寄与することが示唆された。

図2. MCF10AにおけるTGFβによるSrcの発現亢進



次に、活性化 Src が集積する脂質ラフトのプロテオミクス解析より、Src 結合因子として CDCP1 という膜糖タンパク質を同定した。3次元培養でシストを形成したMDCK細胞にCDCP1を発現誘導すると、Srcが活性化し、それに伴ってまた細胞集団が基底側に浸潤突起を形成することを発見した(図3)。

図3. 上: CDCP-1の発現による浸潤突起形成  
下: METの機能におけるCDCP-1の役割

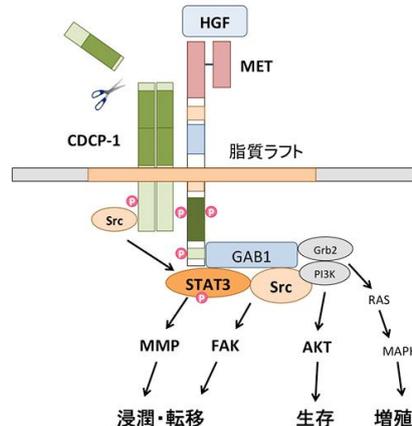


また、この反応にも、脂質ラフト、STAT3、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が関与することが明らかとなった。CDCP1の発現が様々ながんで亢進していることから、CDCP1の発現亢進および細胞外ドメインの切断による活性化にともなってSrcが機能亢進し、がんの主に集団的浸潤を促進することが示唆された。また、CDCP1が、多くのがんの浸潤転移に関わるとされるHGF受容体METの機能をサポートすることも明らかになり、MET-CDCP1-SRC経路のがん進展における重要性が示された(図4)。

さらに、機能亢進したSrcの新たな基質探索を高感度のリン酸化プロテオミクスで探索した結果、細胞極性を制御するPAR3やエクソソームの分泌に関わる膜融合タンパク質が同定された。PAR3がSrcによってリン酸化されることにより、細胞

極性が破綻すること、また、後者の分子がリン酸化されることにより活性化Srcの排出が促進することが示され、それぞれ、Srcによるがん進展の促進と、活性化Srcの制御において重要な役割を担うことが明らかとなった。

図4. MET-CDCP1-Src経路によるがん進展機構



以上の結果より、1) Srcが変異によって異常に活性化した細胞は、正常およびがん組織から排除されるために、ヒトがん検体においてSrc変異細胞が認められないことが示唆された。また、2) がん微小環境下においてはTGFβなどのサイトカインによってSrcの発現誘導が起こりその活性ががん進展に寄与する。また、Srcの活性化因子としてCDCP1が機能し、METの機能と協調してがんのさらなる悪性化に寄与することが明らかとなった。これらの知見は、がん特異的なSrc関連因子、例えば活性化型CDCP1などを標的としたがん治療薬の開発に向けた応用研究に有用と思われる。

## 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7件)全て査読あり

- Hao F, Kondo K, Itoh T, Ikari S, Nada S, Okada M, Noda T. Rheb localized on the Golgi membrane activates lysosome-localized mTORC1 at the Golgi-lysosome contact site. *J Cell Sci.* 131, 2018, 208017, doi: 10.1242/jcs.208017.
- Yonehara R, Nada S, Nakai T, Nakai M, Kitamura A, Ogawa A, Nakatsumi H, Nakayama KI, Li S, Standley DM, Yamashita E, Nakagawa A, Okada M. Structural basis for the assembly of the Regulator-Rag GTPase complex. *Nat Commun.* 8, 2017, 1625, doi: 10.1038/s41467-017-01762-3.
- Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S,

- Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J Cell Biol*, 213, 2016, 81-95, doi: 10.1083/jcb.201510002.
4. Komiya Y, Onodera Y, Kuroiwa M, Nomimura S, Kubo Y, Nam JM, Kajiwara K, Nada S, Oneyama C, Sabe H, Okada M. The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis* 5, 2016, e258, doi: 10.1038/oncis.2016.59.
  5. Matsuyama R, Okuzaki D, Okada M, Oneyama C. MicroRNA-27b suppresses tumor progression by regulating ARFGEF1 and focal adhesion signaling. *Cancer Sci.* 107, 2016, 28-35, doi: 10.1111/cas.12834.
  6. Oneyama C, Yoshikawa Y, Ninomiya Y, Iino T, Tsukita S, Okada M. Fer tyrosine kinase oligomer mediates and amplifies Src-induced tumor progression. *Oncogene*, 34, 2016, 501-512, doi: 10.1038/onc.2015.110.
  7. Oneyama C, Okada M. MicroRNAs as the fine-tuners of Src oncogenic signalling. *J Biochem*, 157, 2015, 431-438, doi: 10.1093/jb/mvv036.
7. 大倉寛也、梶原健太郎、岡田雅人、がん細胞集団内における Src 活性化細胞の解析、第 40 回日本分子生物学会、2017 年、神戸
  8. 大倉寛也、梶原健太郎、石谷太、藤田恭之、岡田雅人、Analysis of Src activated cells within the cancer cell population. 第 39 回日本分子生物学会、2016 年、横浜
  9. Shuchismita Basu, 梶原健太郎、阿部雄一、朝長毅、岡田雅人、Identification of new target proteins involved in Src-mediated tumor progression. 第 39 回日本分子生物学会、2016 年、横浜
  10. 田中健太郎、梶原健太郎、名田茂之、岡田雅人、ユビキチン化を介する Src がん遺伝子産物の選別機構、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年、神戸
  11. 大倉寛也、梶原健太郎、石谷太、藤田恭之、岡田雅人、Analysis of Src-induced cell competition in cancer cells、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年、神戸
  12. 久保祐貴、小宮優、梶原健太郎、岡田雅人、TGF- $\beta$  依存的な上皮間葉転換に伴う Src の発現誘導、第 38 回日本分子生物学会年、2015 年、神戸
  13. 北野圭介、名田茂之、岡田雅人、Src によって誘導される細胞競合の in vivo 解析、38 回日本分子生物学会年会、2015 年、神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/laboratories/detail/11>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 雅人 (Masato Okada)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10177058

### (2) 研究分担者

小根山 千歳 (Chitose Oneyama)

愛知県がんセンター (研究所)・感染腫瘍学部・部長

研究者番号：90373208

## 〔学会発表〕(計 13 件)

1. 梶原健太郎、岡田雅人、上皮細胞の形態形成における活性化 Src の時空間的制御、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年、仙台
2. 梶原健太郎、大倉寛也、河瀬直之、Ping-Kuan Chen、岡田雅人、Src 活性化による細胞競合現象、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年、神戸
3. 梶原健太郎、松本邦夫、岡田雅人、上皮形態形成における活性化 Src の時空間的制御、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年、神戸
4. Shuchismita Basu, 梶原健太郎、阿部雄一、朝長毅、岡田雅人、Identification of new target proteins involved in Src-mediated tumor progression. 第 40 回日本分子生物学会、2017 年、神戸
5. 田中健太郎、阿部雄一、梶原健太郎、名田茂之、岡田雅人、小胞膜輸送を介したがん原遺伝子産物 Src の制御機構、第 40 回日本分子生物学会、2017 年、神戸
6. 杉原充哉、梶原健太郎、松本邦夫、岡田雅人、がん進展における Src 局在化タンパク質と c-Met の機能解析、第 40 回日本分子生物学会、2017 年、神戸