

平成22年5月17日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014010

研究課題名（和文） チロシンホスファターゼとがん細胞の接着・運動制御

研究課題名（英文） Protein tyrosine phosphatases and regulation of cancer cell adhesion/migration

研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：80252782

研究成果の概要（和文）：

細胞の増殖と接着の制御機構における蛋白質チロシンリン酸化シグナルの生理的役割とがん化や転移の病態との関連につき研究を行い、新規の細胞間シグナル伝達系である CD47-SHPS-1 系と受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 が、がんの転移の分子機構に関与する可能性、あるいはがん発生の基盤となる炎症制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this grant project, we have investigated the physiological role of protein tyrosine phosphorylation as well as its relation to oncogenesis and metastasis. We have clarified that a novel cell-cell communication system “CD47-SHPS-1 system” or SAP-1, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, is important for regulation of cancer metastasis and of inflammation that is directly related to development of cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	14,300,000	0	14,300,000
2006年度	13,900,000	0	13,900,000
2007年度	13,900,000	0	13,900,000
2008年度	12,900,000	0	12,900,000
2009年度	12,900,000	0	12,900,000
総計	67,900,000	0	67,900,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：

キーワード：癌・酵素・シグナル伝達・生体分子

1. 研究開始当初の背景

生理的な細胞増殖と細胞接着のシグナル伝達機構の解明は、がんの生物学的特性である無制限な増殖能や浸潤・転移能を分子レベルで理解する上で必須であると考えられる。この

ような観点から、私共は細胞の増殖と接着の制御機構における蛋白質チロシンリン酸化シグナルの生理的役割とがん化や転移の病態との関連につき研究を行っていた。私共は、特に、細胞質型チロシンホスファターゼ SHP-2

の結合分子である膜蛋白質 SHPS-1 とそのリガンドである CD47 が相互作用して細胞間シグナル伝達系 (CD47-SHPS-1 系) を形成し、細胞の接着阻止などに関与することを明らかにしていた。SAP-1 は、ヒト胃癌や大腸がんにも高度に発現する受容体型チロシンホスファターゼとして研究代表者が発見した。しかし、SAP-1 の生理的な機能やがんにおける病態的な意義については明らかではなかった。

2. 研究の目的

がんの生物学的特性である無制限な増殖能や浸潤・転移能を分子レベルで理解するために、本研究ではチロシンホスファターゼとこれに関連する分子群の生理機能とがんにおける異常につき検討する。

3. 研究の方法

研究代表者が、すでに有していた SHPS-1 や CD47 の発現培養細胞、特異的抗体、あるいはそれら分子の遺伝子破壊マウスを投入し研究を行った。また、SAP-1 の遺伝子破壊マウスを新たに作製すると共に、大腸がんモデルや腸炎モデルマウスとの交配により、腫瘍形成や炎症制御における SAP-1 の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)すでに、CD47→SHPS-1 のシグナルが、がん細胞の運動を抑制的に制御していることを報告していたが、SHPS-1→CD47 のシグナルについては明らかでなかったためこれを解析した。小腸上皮や培養上皮細胞株 MTD-1A 細胞などでは、CD47 は E-cadherin や ZO-1 と共に細胞間接着部位に共局在し、この局在化には CD47 の5回膜貫通領域が必要であった。CD47を強制発現させると細胞の伸展と lamellipodia 形成が誘導され、さらに MDCK 細胞では HGF 刺激による細胞運動が亢進した。また、可溶性 SHPS-1-Fc 刺激により CD47 発現細胞では filopodia 形成が顕著となった。CD47 の突起伸長作用や細胞伸展作用は、Src キナーゼ阻害剤や Csk の強制発現で抑制されることから、Src キナーゼの関与が想定され、特にチロシンリン酸化で刺激される Rac/Cdc42 の GEF である FRG あるいは Vav2 が CD47 の機能に関与する可能性がある。以上の結果から、上皮細胞などにおいて CD47 は、Rac/Cdc42 系を介して細胞骨格を再構成することで細胞伸展・運動を正に制御していると考えられる。卵巣がんをはじめとする複数のがんでは CD47 の高発現が報告されており、CD47 の異常とがん細胞の浸潤・転移における役割が示唆された。

(2)膜型分子である CD47 がどのような機構で別の細胞に発現する CD47 のレセプターである SHPS-1 と trans に結合した後、乖離するかが不

明であったが、CD47 が別の細胞に発現する SHPS-1 と trans に結合した後、SHPS-1 発現細胞内に SHPS-1 と共に endocytosis されること (trans-endocytosis) を明らかにした (図 1)。この CD47 の trans-endocytosis には、クラスリンやダイナミンが重要であると共に、Rac, Cdc42 により制御を受けることも明らかにした。

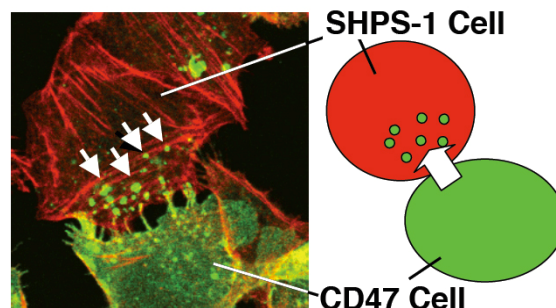


図 1. SHPS-1 と CD47 の trans-endocytosis

(3) SHPS-1 KO マウスでは、実験的自己免疫性脳脊髄炎やコラーゲン誘導性関節炎の発症が著しく抑制されることを見出した。これは、SHPS-1 KO マウス由来樹状細胞による CD4 陽性 T 細胞の Th17 あるいは Th1 への分化が障害されていることに起因している可能性が高いと考えられた。また、NKT 細胞によるがん転移抑制作用に対する SHPS-1 の機能につき検討した。メラノーマ細胞肺転移モデルを用い alpha-GalCer 刺激による NKT 細胞の転移抑制効果を検討したところ、SHPS-1 KO マウスにおいて有意に抗腫瘍効果の減弱が認められた。さらに、野生型マウスに KO マウス由来の alpha-GalCer 刺激後の樹状細胞を移植したところ、野生型に比べ KO マウス由来の樹状細胞を移植したマウスにおいて有意な抗腫瘍効果の減弱が認められた。従って、樹状細胞上に発現する SHPS-1 は NKT 細胞の活性化、がん転移抑制に重要な役割を果たしていると考えられた。

(4) 大腸がんの発症基盤として重要な炎症性腸疾患の発症における CD47-SHPS-1 系の機能を明らかにするために、SHPS-1 KO マウスと腸炎のモデルマウスとの交配を行った。その結果、SHPS-1 の欠損により腸炎の発症が有意に抑制された。この原因として、腸粘膜固有層に存在する樹状細胞あるいはマクロファージの機能異常が関与することを見出し、CD47-SHPS-1 系が腸管免疫を制御することが示唆された。

(5) 受容体型チロシンホスファターゼである SAP-1 が、消化管上皮細胞の微絨毛に特異的に発現することを見出した (図2)。さらに、SAP-1 の KO マウスを作製し解析したところ、小腸微絨毛の形態に異常を認めなかったものの、Apc min+マウスとの交配による腫瘍形成において腫瘍数の低下を認めた。以上より、SAP-1 が大腸がんの発症制御に関与する可能性が示された。

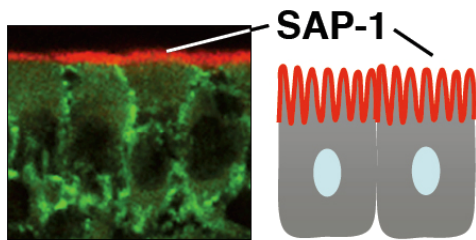


図 2. 小腸微絨毛における SAP-1 の発現

(6)SAP-1 の KO マウスを、腸炎のマウスモデルである IL-10 欠損マウスとの交配を行った結果、SAP-1 の欠損により腸炎の発症が有意に増強された。この結果から、腸上皮細胞による腸管免疫の新たな制御機構が示唆された。さらに、SAP-1 の KO マウスでリン酸化が亢進した SAP-1 の基質分子を複数同定した。

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 29 件)

1. Mori, M., Murata, Y., Kotani, T., Kusakari, S., Ohnishi, H., Saito, Y., Okazawa, H., Ishizuka, T., Mori, M., and Matozaki, T. Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins. *J. Cell. Physiol.* (査読あり) 224:195-204, 2010.
2. Murata, Y., Mori, M., Kotani, T., Supriatna, Y., Okazawa, H., Kusakari, S., Saito, Y., Ohnishi, H., and Matozaki, T. Tyrosine phosphorylation of R3 subtype receptor-type protein tyrosine phosphatases and their complex formations with Grb2 or Fyn. *Genes Cells* (査読あり) 15:513-524, 2010.
3. Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends Cell Biol.* (査読あり) 19: 72-80, 2009.
4. Sadakata, H., Okazawa, H., Sato, T., Supriatna, Y., Ohnishi, H., Kusakari, S., Murata, Y., Ito, T., Nishiyama, U., Minegishi, T., Harada, A., and Matozaki, T. SAP-1 is a microvillus-specific protein tyrosine phosphatase that modulates intestinal tumorigenesis. *Genes Cells* (査読あり) 14: 295-308, 2009.
5. Matozaki, T., Murata, Y., Saito, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: A proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci.* (査読あり) 100, 1786-1793, 2009.
6. van Beek, E.M., de Vries, T.J., Mulder, L., Schoenmaker, T., Hoeben, K.A., Matozaki, T., Langenbach, G.E.J., Kraal, G., Everts, V., and van den Berg, T.K. Inhibitory regulation of osteoclast bone resorption by signal regulatory protein α . *FASEB J.* (査読あり) 23, 4081-4090, 2009.
7. Gaikwad, S., Larionov, Wang, Y., Dannenberg, H., Matozaki, T., Monsonego, A., Thal, D.R., and Neumann, H. Signal regulatory protein- β 1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* (査読あり) 175, 2528-2539, 2009.
8. Kusakari, S., Ohnishi, H., Jin, F.-J., Kaneko, Y., Murata, T., Murata, Y., Okazawa, H., and Matozaki, T. Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system. *J. Cell Sci.* (査読あり) 121: 1213-1223, 2008.
9. Miyake, A., Murata, Y., Okazawa, H., Ikeda, H., Niwayama, Y., Ohnishi, H., Hirata, Y., and Matozaki, T. Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes Cells* (査読あり) 3: 209-219, 2008.
10. Motegi, S., Okazawa, H., Murata, Y., Kanazawa, Y., Saito, Y., Kobayashi, H., Ohnishi, H., Oldenburg, P.-A., Ishikawa, O., and Matozaki, T. Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. *Immunol. Lett.* (査読あり) 121: 52-60, 2008.
11. Nakaishi, A., Hirose, M., Yoshimura, M., Oneyama, C., Saito, K., Kuki, N., Matsuda, M., Honma, N., Ohnishi, H., Matozaki, T., Okada, M., and Nakagawa, A. Structural insight into the specific interaction between murine SHPS-1/SIRP α and its ligand CD47. *J. Mol. Biol.*, (査読あり) 375: 650-660, 2008.
12. Kuroda, S., Nishio, M., Sasaki, T., Horie, Y., Kawahara, K., Sasaki, M., Natsui, M., Matozaki, T., Tezuka, H., Ohteki, T., Förster, I., Mak, T.W., Nakano, T., and Suzuki A. Effective clearance of intracellular Leishmania major in vivo requires Pten in macrophages. *Eur. J. Immunol.* (査読あり) 38: 1331-1340, 2008.

13. Tomizawa, T., Kaneko, Y., Kaneko, Y., Saito, Y., Ohnishi, H., Okajo, J., Okuzawa, C., Ishikawa-Sekigami, T., Murata, Y., Okazawa, H., Okamoto, K., Nojima, Y. and Matozaki, T. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in SHPS-1 mutant mice. *J. Immunol.*, (査読あり) 179: 869-877, 2007.
14. Okajo, J., Kaneko, Y., Murata, Y., Tomizawa, T., Okuzawa, C., Saito, Y., Kaneko, Y., Ishikawa-Sekigami, T., Okazawa, H., Ohnishi, H., Matozaki, T. and Nojima, Y. Regulation by Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 of α -galactosylceramide-induced antimetastatic activity and Th1 and Th2 responses of NKT cells. *J. Immunol.*, (査読あり) 178: 6164-6172, 2007.
15. Ishikawa-Sekigami, T., Kaneko, Y., Okazawa, H., Tomizawa, T., Okajo, J., Saito, Y., Okuzawa, C., Sugawara-Yokoo, M., Nishiyama, U., Ohnishi, H., Matozaki, T. and Nojima, Y. SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood*, (査読あり) 107: 341-348, 2006.
16. Ikeda, H., Okazawa, H., Ohnishi, H., Murata, Y., Oldenborg, P.-A. and Matozaki, T. Mutational analysis of the mechanism of negative regulation by SHPS-1 of phagocytosis in macrophages. *J. Immunol.*, (査読あり) 177: 3123-3132, 2006.
17. Shinohara, M., Ohyama, N., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Ishikawa, O. and Matozaki, T. CD47 regulation of epithelial cell spreading and migration, and its signal transduction. *Cancer Sci.*, (査読あり) 97: 889-895, 2006.
18. Okazawa, H., Motegi, S., Ohyama, N., Ohnishi, H., Tomizawa, T., Kaneko, Y., Oldenborg, P.-A., Ishikawa, O. and Matozaki, T. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J. Immunol.*, (査読あり) 174: 2004-2011, 2005.
- [学会発表] (計 108 件)
1. Murata, Y., Kotani, Supriatna, Y., Mori, M., Okazawa, H., Ohnishi, H., Saito, Y., and Matozaki, T. Tyrosine phosphorylation of SAP-1, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, and its association with Grb2. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009. 10. 1, パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. Mori, M., Murata, Y., Ohnishi, H., Okazawa, H., Kotani, T., Saito, Y., Mori, M. and Matozaki, T., Promotion by VE-PTP of lamellipodium formation in cooperation with Ras and integrin. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009. 10. 1, パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. Yana Supriatna, 岡澤秀樹、村田陽二、大西浩史、的崎尚、クラス 3 受容体型チロシンホスファターゼの機能と病態への関与、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 9, 神戸国際会議場 (兵庫県)
4. 的崎尚、岡澤秀樹、村田陽二、大西浩史、チロシンホスファターゼによるがん、炎症性腸炎の制御、第 67 回日本癌学会学術総会、2008. 10. 28, 名古屋国際会議場 (愛知県)
5. Sadakata, H., Okazawa, H., Supriatna, Y., Ohnishi, H., Murata, Y., Matozaki, T., SAP-1 is a microvillus-specific protein tyrosine phosphatase that regulates intestinal tumorigenesis. FASEB Summer Research Conferences, 2008. 7. 13, Snowmass, Colorado (USA)
6. Murata, T., Ohnishi, H., Kusakari, S., Murata, Y., Okazawa, H., Furuya, N., Matozaki, T., Regulation by CD47-SHPS-1 system of neurite development. Neurosciense 2007, 2007. 11. 3, San Diego Convention center (サンディエゴ)
7. 茂木精一郎、岡澤秀樹、小林久江、村田陽二、大西浩史、石川 治、的崎 尚、SHPS-1 による皮膚免疫とToll様受容体を介したサイトカイン産生の制御、第 66 回日本癌学会総会、2007. 10. 3, パシフィコ横浜 (神奈川県)
8. Kusakari, S., Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, T., Murata, Y., Matozaki, T., Trans-endocytosis of CD47-SHPS-1 system and its molecular mechanism. 第 66 回日本癌学会総会、2007. 10. 3, パシフィコ横浜 (神奈川県)
9. Murata, T., Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, Y., Kusakari, S., Hayashi, Y., Miyashita, M., Furuya, N., Matozaki, T., CD47 promotes neuronal development through Src-and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBBM Congress, 2006. 6. 18, 国立京都国際会館 (京都府)
10. 岡上準、金子和光、村田陽二、岡澤秀樹、大西浩史、野島美久、的崎 尚 他、NKT細胞の活性化と癌転移抑制におけるSHPS-1の役割、第 65 回日本癌学会学術総会、

- 2006.9.28, パシフィコ横浜 (神奈川県)
11. 的崎 尚、細胞間シグナル伝達システム CD47-SHPS-1 系とがんの浸潤・転移の制御、第64回日本癌学会学術総会、シンポジウム <浸潤・転移・血管新生研究の進歩> 2005.9.14, ロイトン札幌 (北海道)
 12. Ohnishi, H., Miyashita, M., Murata, T., Kaneko, Y., Okazawa, H., Matozaki, T., A Novel Intercellular Communication System, The CD47-SHPS-1 System, in Neuronal Network. ISN-ESN:20th Biennial Meeting International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry, 2005.8.25, Congress Innsbruck (Innsbruck, Austria)

[図書] (計1件)

的崎 尚、岡田雅人、他、シグナル伝達研究 2008- '09 Vol. 26 No. 15 羊土社

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計2件)

1. 名称：マクロファージ活性化剤並びにその製造方法及びスクリーニング方法

発明者：的崎尚、大西浩史

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：特許

番号：第4224586号

取得年月日：2008年12月5日

国内外の別：国内

2. 名称：Pharmaceutical Composition and Method for Activating Macrophage Using the Same (医薬組成物及びそれを用いたマクロファージの活性化方法)

発明者：的崎尚、大西浩史

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：米国特許

番号：第7,449,301号

取得年月日：2008年11月11日

国内外の別：外国

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/biosig/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：80252782

(2) 研究分担者

大西 浩史 (OHNISHI HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70334125

(平成17年～19年)

岡澤 秀樹 (OKAZAWA HIDEKI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：80334126

(平成17年～19年)

村田 陽二 (MURATA YOJI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：60400735

(平成17年～19年)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：