

平成22年 3月31日現在

研究種目： 特定領域研究  
 研究期間： 2005～2009  
 課題番号： 17014086  
 研究課題名（和文） チロシンキナーゼシグナルとがん細胞の接着・運動制御

研究課題名（英文） Regulation of adhesion and migration of cancer cells by tyrosine kinase signaling

研究代表者  
 堺 隆一（SAKAI RYUICHI）  
 国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・研究所・細胞増殖因子研究部・部長  
 研究者番号： 40215603

## 研究成果の概要（和文）：

腫瘍の転移・浸潤など悪性形質獲得に伴いチロシンリン酸化を受ける蛋白質群を数多く同定し機能解析を行った。腫瘍の足場非依存性に関わる Src の基質 CDCP1 は、細胞運動能・マトリックス分解にも関わり、肺がん、膵がんにおいて CDCP1 高発現群は低発現群と比較して有意に予後が不良であることが統計学的に明らかになった。細胞間相互作用や浸潤能に関わる ephrin-B1 のシグナルを遮断するペプチドによりスキルス胃がんの腹膜播種が著明に抑制された。スキルス胃がんの腹膜播種部位からは、酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得するために必要な分子 Ossa が同定された。

## 研究成果の概要（英文）：

In this project, numbers of proteins which are tyrosine-phosphorylated during the malignant progression of cancers were identified and functional analysis was performed. CDCP1, which was identified as a molecule involved in anchorage independent growth of cancer cells, also regulates cell migration and matrix degradation. A subset of lung and pancreatic tumors which has high levels of CDCP1 expression showed statistically worse prognosis than that with low levels of CDCP1 expression in clinical samples. It was demonstrated that ephrin-B1 controls multiple factors associated with metastasis such as cell-cell interaction and migration, and peptides which block ephrin-B1 signaling suppressed the peritoneal dissemination of gastric cancers in vivo. A novel protein Ossa identified as a molecule tyrosine-phosphorylated during peritoneal dissemination was shown to be essential for acquiring resistance to the oxidative stress-induced apoptosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,400,000	0	8,400,000
2006年度	10,100,000	0	10,100,000
2007年度	10,100,000	0	10,100,000
2008年度	9,100,000	0	9,100,000
2009年度	9,100,000	0	9,100,000
総計	46,800,000	0	46,800,000

研究分野：がん特定

科研費の分科・細目：がん特性・B01 がん細胞の接着・運動

キーワード： (1) 転移・浸潤 (2) 足場非依存性 (3) Src ファミリーキナーゼ  
(4) CDCP1 (5) チロシンリン酸化 (6) Ossa (7) 酸化ストレス (8) スキルス胃がん

## 1. 研究開始当初の背景

当初から Src ファミリーをはじめとして多くのチロシンキナーゼが癌細胞の接着・運動に関わることがわかっていたが、その活性化機構や基質特異性などは明確になっていなかった。また Cas、パキシリン、コルタクチンなどのチロシンキナーゼ基質群がチロシンリン酸化した際に腫瘍細胞の接着・運動の制御に関わるシグナルを伝えることが我々及び他の研究者により見いだされたが、作用機序など未解明の部分が多くあった。チロシンリン酸化蛋白質の同定手法の限界から、腫瘍の悪性化に関わる未同定の基質も多く存在すると考えられた。癌の転移・浸潤の過程を正確に理解するためには、腫瘍の悪性形質に関係するチロシンリン酸化蛋白質群を同定し、それらの分子群による細胞接着・運動の制御メカニズムを解明することが重要だと考えられた。

## 2. 研究の目的

細胞の接着・運動は癌においては転移・浸潤や腹膜播種などに関わる重要な特性であり、その制御メカニズムの解明や、それに関わるシグナルのがんにおける異常を明らかにすることは、新規の分子標的を見出すためにも重要である。本研究はチロシンキナーゼ及びその基質蛋白質群に焦点を絞って、癌細胞の接着・運動に伴うこれら分子のチロシンリン酸化、細胞内局在、結合能や複合体構成の変化などを細胞生物学とプロテオームの手法を用いて解析し、がんの悪性化に関わるシグナルを伝える新規分子を同定し、分子生物学的手法により結合・局在などを人為的に変えた時の細胞の変化を観察することにより、癌細胞の接着・運動能の制御機構の解明を目指すものである。

## 3. 研究の方法

(1) 肺がんの足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

肺がん細胞株からその転移・浸潤をもたらす特性の一つ、足場非依存能に関わる Src キナーゼ基質を精製と質量分析によって解析し、生物学的機能の解析を進めてきた。12種類の肺がん細胞株のうち、A549細胞などを含む足場非依存性が強いグループにおいて Src ファミリーに属する Fyn などと細胞内で結合して浮遊培養下で強くリン酸化される CDCP1 という機能不詳の膜蛋白質を最近同定した。CDCP1 の転移浸潤における役割を調べるとともに、その発現・チロシンリン酸化の臨床的意義についても解析を広げる。CDCP1 がどのように浮遊状態での細胞生存に関わるシグナルを媒介しているかを RNAi 法などによる機能解析により明らかにするとともに、この分子を介するシグナルのブロックにより転移・浸潤にどれだけの影響をもたらすかをマウスの転移・浸潤モデルを用いて解析する。

(2) ephrin-B1 のがん浸潤における役割

ephrin-B1 は細胞膜表面に発現するリガンドであり、同じく細胞膜表面に発現する EphB 受容体と細胞間接着によって出会うことでチロシンリン酸化され、がんの転移・浸潤に関わるシグナルを伝えることを示してきた。さらに、最近になって ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことがわかった。in vivo の睪がん、スキルス胃がんにおいて内在性の ephrin-B1 が実際に転移・浸潤に関わっているかどうかを、siRNA や欠損変異体を用いた ephrin-B1 のシグナルのブロックの系で解析し、実際の転移・浸潤の過程における ephrinB-1 の関与とそのメカニズムの詳細について解析を拡げる。

### (3) Ossa/c9orf10 の浸潤・腹膜播種における役割の解析

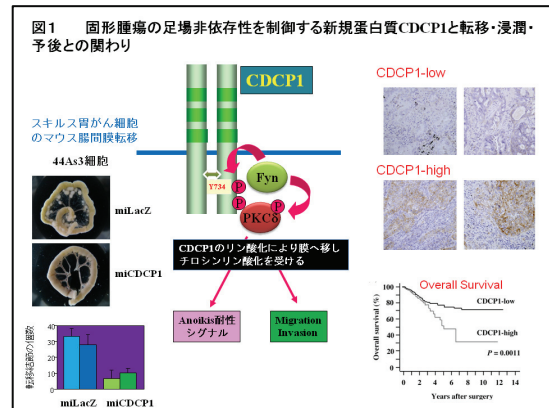
スキルス胃がんの腹膜浸潤部位で強くチロシンリン酸化されている蛋白質として機能不詳の c9orf10 蛋白質を同定した。c9orf10 は酸化ストレスによりチロシンリン酸化を受け Src と PI3 キナーゼの活性化を誘導することで、腫瘍細胞の酸化ストレス抵抗性に関わることが明らかになった。このことから、我々はこの分子に Ossa (Oxidative Stress-associated Src Activator) と名付けた。酸化ストレスに対する腫瘍細胞の抵抗性は、腫瘍の異常増殖や浸潤・転移さらには治療抵抗性について考える際に極めて重要であり、RNAi や発現ベクターを用いて、機能発揮のメカニズム、そのほかの生理機能の探索など解析を進める。

## 4. 研究成果

### (1) 肺がんの足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

足場非依存性の強い一群の肺がん細胞株において、浮遊培養下に顕著なチロシンリン酸化を受ける蛋白質として CDCP1 を同定した。CDCP1 は転移性がんの表面に発現する機能不詳の蛋白質であり、Src ファミリーの基質として正常幹細胞などにも限られた発現が見られる。CDCP1 の発現抑制により、肺がん細胞 A549 の浮遊状態におけるアポトーシス (anoikis と呼ばれる) が誘導され、ソフトアガーのコロニー形成能も抑えられた。逆に CDCP1 と Fyn を発現させることにより H322 細胞の anoikis が抑制されることから CDCP1 は anoikis の抑制を介して肺がん細胞の足場非依存性に関わることが示された。この過程にアポトーシス関連分子 PKC $\delta$  が関与することも明らかになった。CDCP1-PKC $\delta$  経路は、この他にも細胞運動能や細胞外マトリックスの分解といった転移・浸潤に変わる特性をコントロールしていることをこれまでを示すことができた。実際、CDCP1 の発現抑制は、マウス尾静脈注射の系で A549 肺がん細胞の転移能を著明に低下させ、CDCP1 が実際の腫瘍の転移の過程に関わる分子であることを示した。ヒトスキルス胃がんの系でも、CDCP1 の発現抑制が同所性に移植されたス

キルス胃がんの漿膜側への浸潤や腹膜播種を抑制した。一方で、膵がんの系で、CDCP1 高発現群は低発現群と比較して、はっきりと予後が不良であることが統計学的に明らかになり、肺がんにおける他施設との共同研究とも併せて、CDCP1 が幅広い固形腫瘍の予後規定因子であることが示唆された (図 1)。

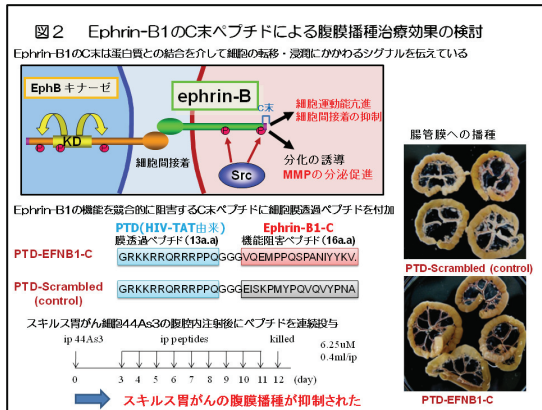


以上のことから CDCP1 は Src の活性化に応じて足場非依存性を含めた複数の悪性形質を固形腫瘍に付与することにより腫瘍の転移・浸潤に関わっており、膜蛋白質であることも併せて、転移・浸潤をターゲットとした分子標的の良好候補となりうることが示唆された。

### (2) ephrin-B1 のがん浸潤における役割

膜貫通型のリガンドである ephrin-B1 は、受容体 EphB と結合することにより Src ファミリーによりリン酸化されることが知られているが、これまでに細胞運動能や細胞間接着の制御に関わることを我々は見出してきた。さらに最近、ephrin-B1 を高発現する膵がん細胞で、EphB の刺激により ephrin-B1 の細胞外ドメインの切断が著明に誘導されることを認めた。これは活性化した ephrin-B1 がマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を誘導するという新たな機能を持つためであった。これらの作用に ephrin-B1 の C 末端が深く関わっており、実際、マウスにおけるヒト膵がんの腹膜播種のモデルでも、ephrin-B1 の C 末端の欠損変異体が in vivo で腹膜への浸潤を強く抑制した。また ephrin-B1 の細胞内シグナルを、膜移行ペプチドと融合した ephrin-B1 の C 末側のリン酸化部位を欠失する変異ペプチドで阻害すると、同所性に移植

したスキルス胃癌細胞の漿膜側への浸潤や腹膜播種を著明に抑制することが示された。(図2)。

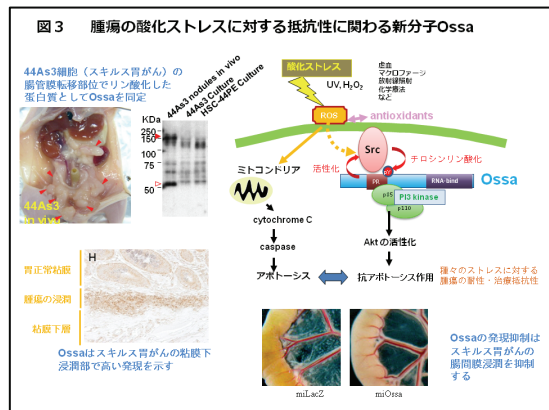


これまでの解析で ephrin-B1 を介するシグナルが、細胞の運動能や細胞間接着の制御により多面的に腫瘍の転移・浸潤に関わりうる事が明らかになり ephrin-B1 が腹膜播種の標的分子として有望であることが示唆された。

### (3) Ossa/c9orf10 の浸潤・腹膜播種における役割の解析

スキルス胃癌 44As3 細胞をマウス腹腔内に注射すると腸管膜転移を起こすが、この腸管膜転移部位で通常培養時に比べ強くチロシンリン酸化された蛋白質として新規蛋白質 c9orf10 (Ossa) が質量分析により同定された。ヒトの組織染色では Ossa は粘膜下に浸潤したスキルス胃癌組織で周囲の正常粘膜に比べ強い発現があることが確認された。Ossa は正常組織でも消化管系を中心に広い発現が認められることから、その生理作用について幅広い解析を行った。解析の結果 Ossa は紫外線や過酸化水素などの酸化ストレス刺激によって細胞内で Src ファミリーキナーゼによってチロシンリン酸化を受け、リン酸化依存的に PI3 キナーゼと会合し PI3 キナーゼ-AKT シグナルを活性化することが分かった。また Ossa は C 末側に RNA 結合ドメインを持ち、この領域を介して IGF-II などの発現を調節していることが明らかになった。この結果として Ossa を高発現する細胞は酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得していると考えられ、スキルス胃癌細胞の

Ossa の発現を RNAi により抑制するとそのマウスモデルでの腸管膜浸潤が抑えられた(図3)。



Ossa による酸化ストレスに対する抵抗性は固形腫瘍の化学療法や放射線療法に対する耐性獲得にも関わる可能性があり、マウスを用いた治療モデルの構築などを行っていく。

### 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 25 件)

- 1 Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Hoshino, Y., Yanagihara, K. & Sakai, R. A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10 regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2009 **29**; 402-413,2009
- 2 Uekita, T., Tanaka, M., Takigahira, M., Miyazawa, Y., Nakanishi, Y., Kanai, Y., Yanagihara, K. & Sakai, R. CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhou carcinoma. *Am. J. Pathol.* **172**: 1729-1739, 2008
- 3 Jia, L., Uekita, T. & Sakai, R. Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of p130Cas. *Mol. Cancer Res.* **6**: 654-662, 2008
- 4 Uekita, T., Jia, L., Narisawa-Saito, M., Yokota, J., Kiyono, T. & Sakai, R. CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma *Mol. Cell. Biol.*

27:7649-7660, 2007

- 5 Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R. & Sakai, R. Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J. Cell Sci.*, **120** :2179-2189, 2007
- 6 Tanaka, M., Kamata, R., Takigahira, M., Yanagihara, K. & Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am. J. Pathol.* **171**:68-78, 2007
- 7 Sawada, Y., Tamada, M., Dubrin-Thaler, B., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka S. & Sheetz M.P. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, **127**:1015-1026, 2006
- 8 Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contract formation. *EMBO J.* **24**: 3700-3711, 2005.

[学会発表] (計 41 件)

堺隆一 : シグナルドッキング分子と癌 (2006.2.23) 第 15 回広島大学・広島がんセミナー学術講演会 (広島)

堺隆一 : 神経細胞の分化増殖異常と癌 (2006.7.19-21) 第 29 回日本神経科学大会 (京都)

Sakai, R. & Miyake, I. "Analysis of domain functions of ShcC protein in neuroblastoma" (2006.5.17-20) 12th conference of Advances in Neuroblastoma Research, Los Angeles, USA, 2006

Sakai R & Uekita T.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma Mechanisms & Models of Cancer Meeting, San Diego, USA(2007.8.8-12)

堺隆一 : 肺癌細胞の足場非依存性と転移能を制御する新規蛋白質 CDCP1 の解析 (2008.7.24-25) 第 17 回日本がん転移学会学術集会・総会 (鹿児島)

Sakai R., Ohira, M., Nakagawara, A. & Miyake, I.: ShcC protein controls differentiation of neuroblastoma cells. (2008.5.21-24) Advances in Neuroblastoma Research 2008, Chiba, Japan

Sakai R. Roles of phosphotyrosine-containing molecules in tumor progression. (2008.11.12) Kyoto Prize 2008 Memorial Workshop, Kyoto, Japan

Sakai R., Uekita T. & Miyazawa Y.: Analysis of domain function of CDCP1 in anoikis resistance of cancer cells. (2008.8.13-17) Mechanisms & Models of Cancer Meeting, Cold Spring Harbor, USA

堺隆一、田中正光 : スキルス胃がんの酸化ストレス抵抗性に関わる分子 Ossa の機能解析 (2009.7.23-24) 第 18 回日本がん転移学会学術集会・総会 (旭川)

Sakai R.: A novel phosphoprotein, Ossa/C9orf10 protects cancer cells from oxidative stress-induced apoptosis (2010.2.5-9) Japanese-German Cancer Workshop, Hamburg, Germany.

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/07grow/07grow.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堺隆一 (SAKAI RYUICHI)  
研究者番号 : 40215603

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし