

令和元年5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14998

研究課題名(和文) 悪性腫瘍細胞におけるTrop-2の発現誘導、リン酸化機構及び生物学的意義の解析

研究課題名(英文) Cancer progression through Trop-2 phosphorylation

研究代表者

森 勇伍 (MORI, Yugo)

京都産業大学・総合生命科学部・講師

研究者番号：00780785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Trop-2は、発現量と予後の相関関係が報告されている癌悪性化因子であるが、細胞間接着の保持への関与など、癌悪性化抑制因子としての機能も報告されており、評価が定まっていない。本研究では、Trop-2の量的な変化だけではなく質的な変化に注目し、同分子のリン酸化制御機構及び癌悪性化機構への影響を検討した。その結果、Trop-2はPKC / によってリン酸化され、また同分子の阻害剤は、癌細胞の移動能を低下させることを見出した。これは、Trop-2による癌悪性化が質的な変化によって誘導される可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Trop-2の量的な変化に伴う癌悪性化との関連性の解析は、今までも多くの研究がなされているが、本研究は、Trop-2の量的な変化だけではなく、質的な変化が、癌の悪性化機構に関与していることを示唆する初めての報告となる。これは今後、癌におけるTrop-2の機能を解析していく上で有用な知見になり得ると考えられ、またTrop-2のリン酸化レベルの測定は、癌の悪性化を評価する新たな指標となり得る可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Trophoblast cell surface antigen 2 (Trop-2) is highly expressed in a variety of epithelial cancer cells, and its increased expression in tumor tissues is correlated with biological aggressiveness and poor survival of patients with various cancer types. However, Trop-2 is known to be widely expressed in normal tissues and involved in function of tight junction through its interaction with tight junction component claudin-7. Thus, the function of Trop-2 remains obscure. Here, we focused on not only quantitative but also qualitative change, i.e., phosphorylation of Trop-2. We revealed that Trop-2 was phosphorylated by PKC / , and that chemical inhibitor of PKC / reduced cell motility. Our results suggest that Trop-2 phosphorylation leads to the dysfunction of cell-cell adhesion.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 細胞移動・転移 細胞間接着 発現制御機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Trop-2 は癌悪性化因子として報告されており、癌細胞では正常細胞と比較して発現量が亢進し、また臨床研究において、その発現量と予後には相関関係が示されている (Biochim. Biophys. Acta, 1796, 309-314, 2009)。しかしながら、癌悪性化抑制因子としての働きも報告されており、発現量の減少が癌細胞の悪性化亢進に寄与すると示唆されている (Mol. Cancer Res., 9, 1686-1695, 2011; Cell Death Dis, 5, e1133, 2014)。実際、Trop-2 は正常細胞において細胞間接着に関与することが報告されており、タイトジャンクション構成分子の1つである claudin-7 との相互作用を介した細胞間接着の保持が示唆されている (Am. J. Pathol., 177, 1344-1355, 2010)。このことから、Trop-2 は正常細胞の恒常性維持において必要な分子であり、Trop-2 の量的な変化のみに着目して癌の悪性化を評価することが、必ずしも適当ではない可能性を示している。

2. 研究の目的

I型膜貫通タンパク質である Trop-2 (図1) の細胞質内領域には、2つのセリン残基 (S303 及び S322) が存在し、それぞれリン酸化される可能性を有することが報告されている (Int. J. Cancer, 62, 472-479, 1995; Cell, 127, 635-648, 2006; Cell Rep, 8, 1583-1594, 2014)。このことから、Trop-2 の質的な変化である同部位のリン酸化が、細胞間接着の維持や癌悪性化機構に関与している可能性が考えられた。我々が行った先行研究において、(1) Trop-2 の S303 はリン酸化されず、S322 がリン酸化される、(2) S322 をグルタミン酸に置換し (S322E)、リン酸化を模倣することによって、claudin-7 との相互作用が減少する、といった結果が得られたことから、Trop-2 のリン酸化が、癌悪性化、とりわけ細胞間接着に関与している可能性が強く示唆された。一方、Trop-2 の質的な変化だけではなく、量的

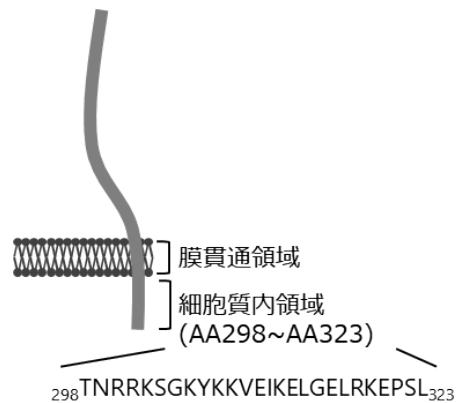


図1. Trop-2の構造模式図

な変化も、癌細胞における同分子の機能を説明する上で重要な要因の1つとなり得るが、癌において発現量の亢進が報告されている他の分子である、MUC1 や galectin-3 によって、Trop-2 の発現が転写レベルで制御されている可能性が、我々の先行研究により示された。このことから、癌化によって Trop-2 の発現量が亢進し、その Trop-2 がリン酸化されることで、より癌の悪性化が亢進している可能性が考えられ、これら一連の機構を明らかにするために、本研究に着手した。

3. 研究の方法

(1) Trop-2 の質的变化 (リン酸化) に関する研究

Trop-2 のリン酸化を担うキナーゼの同定

我々が樹立した FLAG-tag 付き Trop-2 発現細胞を、PMA により処理することで、Trop-2 の S322 がリン酸化されることを既に見出していたため、それを基に、Trop-2 のリン酸化を担うキナーゼの同定を以下の方法により検討した。

市販されている種々のセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤により上述の細胞を事前に処理した後、PMA により同細胞を更に処理し、処理後の細胞よりサンプルを調製した。SDS-PAGE 後、S322 がリン酸化された Trop-2 を特異的に認識する抗体 (研究室で作製) を用いたウエスタンブロッティングにより、リン酸化に関与するキナーゼの同定を試みた。更に、同定されたキナーゼによる Trop-2 のリン酸化への関与をより明確にするために、siRNA によるノックダウン実験を行い、同様の方法により検討した。

Trop-2 のリン酸化に伴う細胞移動能への影響の検討

各 PKC 阻害剤処理における細胞移動能の変化を、トランスウェルアッセイを用いて検討した。

(2) Trop-2 の量的変化に関する研究

Trop-2 の発現は、転写因子の1つである Sp1 により制御されている可能性が、我々の先行研究及びいくつかのグループによって示唆されている。加えて、MUC1 と galectin-3 による Trop-2 の発現制御は、両分子の結合に伴う制御機構に関与している可能性が考えられたことから、以下の方法により、Trop-2 発現制御における MUC1、galectin-3、Sp1 の関与を検討した。

Sp1 による Trop-2 発現制御の検討

Sp1 の発現を siRNA によりノックダウンした後、Trop-2 の発現量を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにより検討した。

MUC1 と galectin-3 の結合に伴う、Trop-2 発現への影響の検討
MUC1 発現細胞を galectin-3 により処理後、Trop-2 の発現への影響を、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにより検討した。

4. 研究成果

(1) Trop-2 の質的变化 (リン酸化) に関する研究

Trop-2 のリン酸化を担うキナーゼの同定

様々なセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤処理による Trop-2 のリン酸化への影響を検討した結果、PKC 阻害剤である BIM-I 処理によってのみ、Trop-2 のリン酸化は顕著に抑制された (図 2)。このことから、Trop-2 のリン酸化における PKC の関与が示唆されたが、PKC は種々のアイソフォームが存在することから、どの PKC アイソフォームが Trop-2 のリン酸化に関与するかを更に検討した。本実験に用いた細胞において、それぞれの PKC アイソフォームの発現をあらかじめ DNA マイクロアレイにより検出し、発現が認められた PKC アイソフォーム ($\alpha/\delta/\epsilon/\zeta/\eta/\iota$) をターゲットとして、それらの PKC 阻害剤を用いて、Trop-2 のリン酸化への影響を検討した。その結果、BIM-I 及び Gö6983 処理により Trop-2 のリン酸化が抑制された (図 3)。これらの阻害剤が共通して抑制する PKC アイソフォームは PKC α/δ であることから、Trop-2 のリン酸化はこのどちらかの PKC によって制御されている可能性が示唆された。

次いで、PKC α/δ をノックダウンすることによる Trop-2 のリン酸化への影響を検討した。その結果、PKC α/δ をそれぞれ単独でノックダウンした場合は、Trop-2 のリン酸化は維持されたが、両方を同時にノックダウンすることで、リン酸化は顕著に抑制された (図 4)。このことから、PKC α/δ が協調して Trop-2 のリン酸化を制御していることが示された。

Trop-2 のリン酸化に伴う細胞移動能への影響の検討

各 PKC 阻害剤処理による細胞移動能への影響を検討した結果、Trop-2 のリン酸化を抑制した 2 種類の PKC 阻害剤 (BIM-I 及び Gö6983) 処理により、細胞移動能は抑制された。一方、同分子のリン酸化が抑制されなかった PKC 阻害剤 (Gö6976) 処理においては、細胞移動能は変化しなかった (図 5)。このことは、Trop-2 のリン酸化が細胞移動能の制御に関与することを強く示唆している。

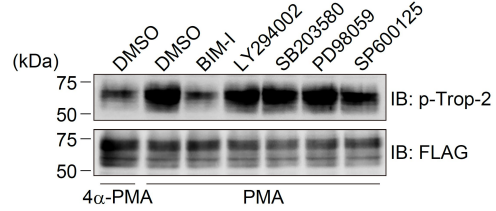


図 2. 様々なセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤処理による Trop-2 のリン酸化への影響

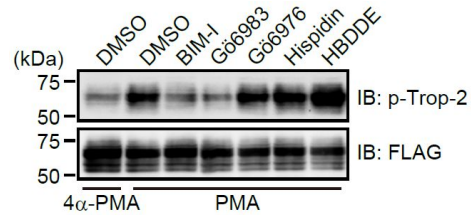


図 3. 様々な PKC 阻害剤処理による Trop-2 のリン酸化への影響

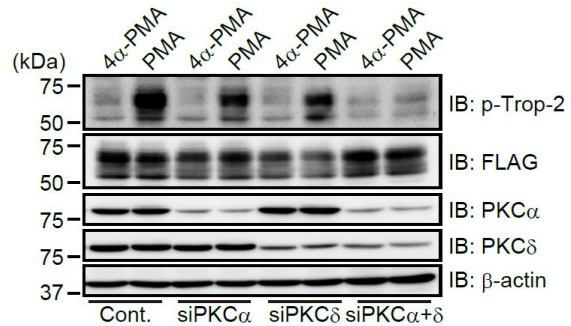
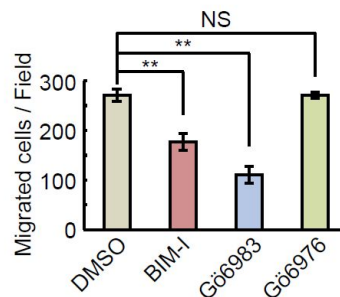
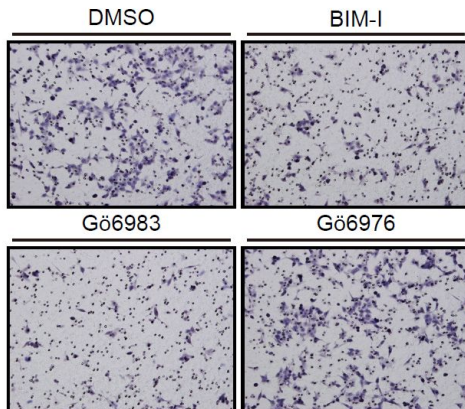


図 4. PKC α/δ siRNA 処理による Trop-2 のリン酸化への影響



(means±S.E., n=3, ** p<0.01; NS, not significant)

図 5. 各 PKC 阻害剤処理による細胞移動能への影響

(2) Trop-2 の量的変化に関する研究

Sp1 による Trop-2 発現制御の検討

Sp1 の発現を抑制することで、Trop-2 の発現量は減少した (図 6)。このことから、Trop-2 の発現は Sp1 によって制御されている可能性が示された。

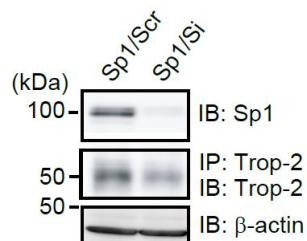


図 6. Sp1 siRNA 処理による Trop-2 の発現への影響

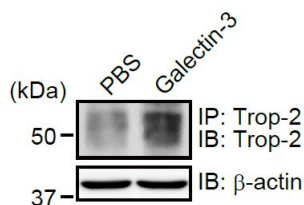


図 7. Galectin-3 処理による MUC1 発現細胞の Trop-2 発現への影響

MUC1 と galectin-3 の結合に伴う、Trop-2 発現への影響の検討

Galectin-3 処理により、MUC1 発現細胞の Trop-2 は増加した (図 7)。このことから、MUC1 への galectin-3 の結合が、Trop-2 の発現に関与している可能性が示唆された。

以上、Trop-2 は PKC α/δ の協調によってリン酸化され、加えて同分子のリン酸化は、細胞移動能を亢進させ、癌をより悪性化させることが示唆された。これは、Trop-2 による癌悪性化が、量的な変化だけでなく、質的な変化によって誘導される可能性を示す初めての結果であり、本研究における大きな成果であると考えている。また、MUC1、galectin-3、Sp1 の協調によって、Trop-2 の発現が誘導されている可能性が示唆され、Trop-2 の発現誘導機構の一端が明らかとなった。一方で、Trop-2 の発現誘導からリン酸化に至るまでの一連の機構については、まだ未解明な部分も多く、今後解明していく必要がある。近年、癌の診断や治療には、様々な手法及び標的分子が用いられているが、Trop-2 のリン酸化レベルの測定は、癌の悪性化を評価する新たな指標となり得る可能性を示すものである。また、Trop-2 のリン酸化阻害剤は、新規抗癌剤としての可能性を示すものである。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

森 勇伍、秋田 薫、中田 博、Trop-2 のリン酸化に伴う腫瘍悪性化機構、第 91 回日本生化学会大会、2018 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：癌転移抑制剤、及び癌転移抑制剤候補物質の選抜方法

発明者：中田 博、森 勇伍、尾島 和樹、岩本 駿吾

権利者：学校法人京都産業大学

種類：特許

番号：特願 2019-20832

出願年：2018 年

国内外の別：国内

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。