

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590326

研究課題名（和文）Ephrin-B1 の信号経路遮断による癌の組織浸潤の抑制

研究課題名（英文）Suppression of invasion of cancers by blocking ephrin-B1 mediated signaling

研究代表者

田中 正光 (TANAKA MASAMITSU)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号 20291396

研究成果の概要：

Ephrin-B1 の C 末を介したシグナル伝達により、Arf1 の活性化依存性にメタロプロテアーゼ (MMP-8) の細胞外分泌が促進されるメカニズムが同定できた。それを踏まえ、ephrin-B1 の C 末部分の合成ペプチドによって上記経路が遮断されること、およびヌードマウス腹腔内に同ペプチドを投与することでスキルス胃癌細胞の腹膜播種の抑制効果が確認された。Ephrin-B1 の細胞内シグナル伝達の遮断が、スキルス胃癌などの組織浸潤、播種の阻止に有効である結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ephrin、Eph、スキルス癌、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

B-type ephrin は、受容体型チロシンキナーゼ EphB ファミリーに対する細胞膜貫通型のリガンドで、その発現解析の結果から多くの腫瘍における高発現が報告されており、特に浸潤性の高い腫瘍細胞で発現レベルが亢進していることが、メラノーマ、神経膠芽腫、卵巣癌や胃癌などで指摘されていた。それまで神経の軸索誘導などにおける機能は知ら

れていたが、上皮細胞における ephrin-B の細胞内信号伝達はほとんど解析されていなかった。そこで申請者は特に癌細胞の組織浸潤や腹膜播種におよぼす作用について解析を進めてきた。例えば、膵臓癌由来で浸潤性の低い細胞株に ephrin-B1 を導入すると、明らかにヌードマウスにおいて腹膜播種が促進され、ephrin-B1 を導入したこれらの癌細胞では移動能・浸潤性が亢進していた。その

分子機序として、ephrin-B1 を介したシグナル経路により細胞間接着を負に制御するフィードバックが存在することやアダプター蛋白質 Dishevelled を介した rho ファミリーの活性化機構により細胞移動が制御されているなどの知見を得ていた。

これらの事から Ephrin-B1 の信号経路の遮断により癌の進展が阻止できないかと考えた。その基礎として、まず細胞内ドメイン全体を除いた ephrin-B1 変異体を過剰発現させ、対応する受容体の刺激などによる ephrin-B1 の細胞内信号をすべて遮断すると、同癌細胞の移動、浸潤性が低下した。また、ephrin-B1 の細胞内領域でリン酸化を受ける複数のチロシン残基をアミノ酸置換した変異体の導入によっても、いくつかのヒトスキルス型胃癌細胞株のマウスにおける腹膜浸潤が抑制された。こうした経緯を踏まえて、実際の腫瘍、とくに浸潤性の高いスキルス型癌の進展に対する分子標的治療の対象として ephrin-B1 に焦点を当て、その設計と評価を計画するに至った。

2. 研究の目的

癌のなかでもスキルス型癌は間質組織への浸潤性がきわめて高く、隣接した臓器、組織に播種する特徴を持つため、手術適応外となる事が多く、生存率が低い。これまでもスキルス型癌で高発現する遺伝子の解析などがおこなわれてきたが、依然難治性である。本申請の目的は、腹膜播種をきたす主に消化器由来のスキルス型癌で、その浸潤能と相関して活性化されている ephrin-B1 のシグナル経路をさらに解明するとともに、その経路の遮断をスキルス型癌の治療に応用することである。

Ephrin-B1 は大きく分類して細胞内ドメインのチロシンリン酸化を介した信号と、C 末を介した信号の二つの経路により癌の組織浸潤を促進した。このうち広汎な細胞に発現のみられるアダプター蛋白質である Dishevelled (Dvl) は、ephrin-B1 の C 末部位と直接に結合することで RhoA の活性化を誘導し、そのことが ephrin-B1 の刺激依存的な細胞移動にとって重要な役割を持っていた。この点を重視し、最初に ephrin-B1 の C 末を介した信号経路を遮断するツールを作製し、その効果をこれまでに行ったヌードマウスの腹膜播種のアッセイを主に用いて、スキルス型（高浸潤型）胃癌細胞株に対してスクリーニングする。

実際の治療にむけて、ephrin-B1 の細胞内ドメイン C 末部位に標的蛋白質が結合することを阻害する合成ペプチドを選別し、それが実際の癌の浸潤抑制に有効であるかを、期間内に評価する。このことにより、その後同ペ

プチドの構造と類似した化合物をスクリーニングするなどして、実際の治療に供することが可能になる。また、その結果を踏まえて ephrin-B1 のチロシンリン酸化を阻害するペプチドや化合物の設計、評価も同様の手法、手順で進めてゆく事が可能となる。

Eph / ephrin ファミリーのなかでは、EphA2 受容体が腫瘍血管新生作用をもつことなどから、その信号を遮断する実験が報告されている。基礎実験では、可溶化した ephrin-A の細胞外ドメインを細胞に添加することで、内在性の膜結合 ephrin-A リガンドによる受容体の活性化を競合阻害することが可能である。また、同様の機序で EphA2 受容体に対する抗体を細胞に添加することにより、受容体の活性化を競合阻害した報告などがある。こうした例も含めて、受容体/リガンドの結合を標的として阻害する方針は有効な場合もあるが、それらの分子に依存する細胞内信号経路をすべて遮断するため、多数のエフェクター蛋白質を介して多様な機能をもつ分子の場合、治療効果の期待に反する作用も生じる可能性がある。また EphB 受容体 / ephrin-B リガンドの特徴は、どちらも細胞内ドメインをもち、互いの刺激の結果、受容体側にもリガンド側にもそれぞれ双方向の細胞内信号が発生する点である。したがって、ephrin-B1 の受容体との結合を標的とするツールを使用した場合、EphB 受容体の下流に生じていた信号経路も阻害される影響を考慮すべきである。本申請で ephrin-B1 の細胞内の信号経路を標的とすることは、それぞれの癌に合わせて作用点の比重を変えたりする調整が将来可能である。

3. 研究の方法

最初に ephrin-B1 の C 末部分を欠失させた ephrin-B1 変異体を、ephrin-B1 を内在性に発現しているいくつかのスキルス型癌細胞に導入し、C 末を介したシグナルの遮断によりヌードマウスでの腹膜播種や組織浸潤が抑制できる細胞を選別する。次に ephrin-B1 の C 末部位をカバーするペプチドを複数設計し、そこへ細胞内に導入するために HIV などの細胞膜透過シグナルを付加した融合ペプチドを合成する。それらのペプチドを、上記 ephrin-B1 の C 末部位欠損変異体で浸潤抑制が認められた細胞に作用させ、ephrin-B1 の C 末部位への内在性蛋白質の結合を阻害する。その効果を判定するために、まず培養細胞への同ペプチドの導入効率と、その活性の持続時間を評価するため、細胞膜透過シグナルのみからなるペプチドを対照として免疫染色により、細胞内にとりこまれたペプチドの持続時間やその細胞内局在性を検討する。また、

Dishevelled と内在性 ephrin-B1 の細胞内結合が阻害されるか、その結果 RhoA の活性が阻害されるかをアッセイすることで、ペプチドが有効に ephrin-B1 の信号経路を遮断できたか検討する。その生物学的効果を見るために、ペプチドを導入した癌細胞の移動、浸潤能や増殖・アポトーシスに対する影響を *in vitro* で比較する。さらに、スキルス癌の *in vivo* での進展に対する効果を評価するため、ヌードマウス腹腔内に同ペプチドを注入することで、あらかじめ腹腔内に移植したスキルス癌細胞に効率よく導入できるか検討し、条件設定を行う。コントロールのペプチドと比較し、ephrin-B1 の C 末由来ペプチドの生体内投与でスキルス胃癌細胞の腹腔内播種が軽減されるか、また正常組織に対しての影響について観察する。

4. 研究成果

まず最初に Ephrin-B1 の癌細胞の浸潤制御に関わる信号経路として、ephrin-B1 の C 末に依存した信号経路が Arf1 の活性化を介して、マトロプロテアーゼ (MMP-8) の小胞輸送による細胞外分泌過程を促進するという新規機能を同定することができた。また、Ephrin-B1 の C 末を欠損させた変異体による同経路の遮断により、膵臓癌細胞やスキルス型胃癌のヌードマウスにおける組織浸潤、腹膜播種を抑制することが確認できた。

ephrin-B1 の C 末を介した信号経路が癌の浸潤性に対し大きく影響していたため、まずその経路を抑制するために ephrin-B1 の C 末の合成ペプチドを作製した。内在性の ephrin-B1 の C 末部位に結合する蛋白質を同ペプチドがトラップすることで、そのシグナル伝達を阻害することを期待した。HIV ウイルス由来の細胞膜透過性ドメイン (PTD) を付加した ephrin-B1 の C 末ペプチド (PTD-EFNB1-C) は、培地中への添加により、効率よくほぼすべての培養細胞内にとりこまれ、申請者らが見出した ephrin-B1 の C 末部位と Dishevelled アダプター蛋白質との結合をほぼ完全に競合阻害した。また同ペプチドはスキルス型胃癌細胞において、上記の ephrin-B1 の C 末を介した Arf1 の活性化経路を阻害し、その結果マトロプロテアーゼ (MMP-8) の分泌も抑制した。さらに、PTD-EFNB1-C で処理した癌細胞は、*in vitro* での I 型コラーゲンへの浸潤性が低下した。

ヌードマウスを用いて *in vivo* での PTD-EFNB1-C ペプチドの癌細胞へのとりこみを検討したところ、同ペプチドを腹腔内に投与することで、あらかじめ腹腔内に移植したスキルス癌細胞内部に効率よく取り込まれていた。そこで、腫瘍細胞のマウス腹腔内移

植後に同ペプチドを連続的に腹腔内に投与したところ、スキルス胃癌細胞の腹膜播種が抑制された。すなわち、腸間膜や壁側腹膜などに転移した腫瘍の数、大きさがコントロール群に比較し、有意に低下した。一方、この腹腔内へのペプチドの注入によって、癌細胞以外の正常組織に対する大きな影響は特に認められなかった。これらのことにより、ephrin-B1 の C 末を介したシグナルを遮断する PTD-EFNB1-C ペプチドが、実際のスキルス胃癌の進展を効果的に抑制する事が示され、今後、同ペプチドの構造と類似した低分子化合物などが、実際の治療に有用であると考えられる。

腹腔内腫瘍細胞移植後の播種状態の比較¹⁾

	腸間膜 の腫瘍数 ²⁾			大網部	壁側腹膜
	0-10	10-30	30-		
PBS	1	2	16	16	17
PTD	1	4	15	18	17
PTD- EFNB1-C	12	4	3	6	5

1) 播種した腫瘍結節を認めたマウス数で表示

2) 径 2mm 以上の腫瘍結節を認めたマウス数

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 4 件)

1. Tanaka M., Sasaki K., Kamata, R., Yanagihara K., and 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* 29, 402-413, 2009 査読有
2. Uekita T., Tanaka M., Takigahira M., Miyazawa Y., Kanai Y., Yanagihara K. Sakai R. CDCP1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *American Journal of Pathology* 172, 1729-1739, 2008 査読有
3. Tanaka M., Sasaki K., Kamata, R. and Sakai R. The C-terminus of ephrin-B1

regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells.

J. Cell Sci. 120, 2179-2189, 2007

査読有

4. Tanaka M., Kamata R., Takigahira M., Yanagihara K. and Sakai R. Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhous carcinoma. American Journal of Pathology 171, 68-78, 2007 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Tanaka M., Kamata R., Sasaki K., Sakai R. Identification of tyrosine phosphorylated proteins binding to Src family kinases in gastric scirrhous carcinoma 第67回 日本癌学会学術総会 2008年10月28日 名古屋国際会議場
2. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一 スキルス型癌の間質浸潤におけるリン酸化蛋白質の解析 第97回 日本病理学術総会 2008年5月16日 石川県立音楽堂
3. Tanaka M., and Sakai R. Ephrin-B1 as a therapeutic target of cancer invasion. Mechanisms and Models of cancer 2007年8月10日 Salk Institute, La Jolla, USA
4. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一 分子標的としての ephrin-B1 信号伝達 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月5日パシフィコ横浜
5. 上北尚正、田中正光、柳原五吉、堺隆一 CDCP1はスキルス胃癌の腹膜播種の制御に関与する因子である 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正光 (TANAKA MASAMITSU)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号 20291396

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者