

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20591633
 研究課題名 (和文) NO による蛋白の翻訳後修飾を介した機能制御機構のプロテオーム解析と癌治療への応用
 研究課題名 (英文) Proteomic analysis of the regulation of proteins by NO-induced posttranslational modification and anti-cancer therapy
 研究代表者
 杉田 裕樹 (SUGITA HIROKI)
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
 研究者番号：30398218

研究成果の概要 (和文)：

各種癌細胞 (膵癌、大腸癌) において、NOはIGF-IR, EGFR, Aktのリン酸化、IRS-1蛋白発現を抑制する一方Ras/Erk pathwayは亢進させた。NOによるIRS-1蛋白のユビキチン化と蛋白分解はIRS-1C末が重要であると考えられた。NOは膵癌、大腸癌、乳癌細胞の増殖および浸潤を抑制した。NO供与体およびMEK inhibitorの併用はこれらの癌細胞に対し、より抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要 (英文)：

NO inhibits the phosphorylation of IGF-IR, EGFR, Akt and IRS-1 protein expression, but upregulates Ras/Erk pathway in cancer cells (pancreatic and colon cancer cells). C terminus is responsible site for NO-induced ubiquitination and degradation of IRS-1 protein. NO inhibits the proliferation and invasion of pancreatic, colon and breast cancer cells. Combination of NO-donor and MEK-inhibitor enhances anti-cancer activity in these cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：キーワード：insulin/IGF シグナル、癌、一酸化窒素 (NO)、ユビキチン化、IGF-I

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近になり NO による蛋白の翻訳後修飾 (post-translational modification)、つまり蛋白の活性中心に存在するシステイン残基のニトロシル化による蛋白活性の制御が明らかになってきた。これまで NO のいく

つかの細胞内シグナル伝達を担う分子に対する制御が明らかになった。それらに加え、NO は Insulin receptor substrate (IRS)-1 のユビキチン化による分解を促進させること、さらに Akt の活性中心のシステイン残基のニ

トロシル化により活性を制御することによって骨格筋細胞のインスリンシグナル (IR/IRS-1/PI3-k/Akt) を抑制することが我々を含めた研究チームにより明らかとなった。しかし NO による蛋白の翻訳後修飾については今もなお不明の点が多い。

(2) 一方 NO は癌抑制作用を有することが報告されている。

(3) insulin, IGF を含め growth factor によるシグナルは癌の増殖・浸潤に重要である。

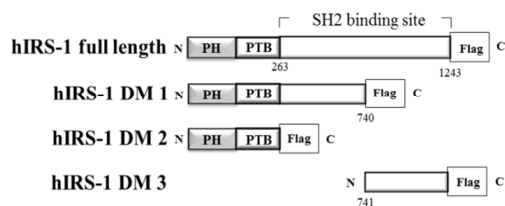
2. 研究の目的

癌細胞の増殖・アポトーシスに關与する蛋白の発現および活性制御の一部は NO による蛋白の翻訳後修飾により制御されていると考えられるが、そのメカニズムを解明し、新たな癌治療の開発へと結びつけることを目的とする。とくに膵癌細胞において NO (一酸化窒素) による insulin/IGF シグナル蛋白への修飾機構を解明するとともに、これを利用した癌治療法の実現を行うことを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) IRS-1 のユビキチン化の解析

IRS-1 DM1-DM4 の4種類の deletion mutant の construct を合成する。



これを pCMV Tag4 発現ベクターに sub-cloning した後、膵癌細胞に遺伝子導入、培養したものに NO 供与体を添加する。蛋白を可溶化し、Flag を immunoblotting 法にて検出することでユビキチン化に重要な部位の同定ができる、

(2) IRS-1 蛋白発現と NO による制御の意義

IRS-1 dominant negative 強発現癌細胞株、IRS-1 wild type 強発現癌細胞株を用いた IRS-1 の癌細胞増殖への役割と NO による insulin/IGF シグナル制御機構の解析を行う。pCMVTag4/IRS-1DM3 (IRS-1 の N 末端側 PH+PTB ドメインは細胞に導入発現させた場合 IRS-1 の dominant negative として作用するとの報告がある) 安定発現 MIAPaCa-2, pCMVTag4/IRS-1 WT 安定発現 MIAPaCa-2 を cloning し、これに NO 供与体(GSNO または SNAP)の添加し、コントロール (pCMVTag4 ベクターのみ) と細胞増殖、癌浸潤のスピード、アポトーシスおよび insulin/IGF シグナルについて比較検討する。これにより、NO による IRS-1 発現の制御が膵癌細胞の増殖抑制に寄与しているか否かが証明されると考えられる。

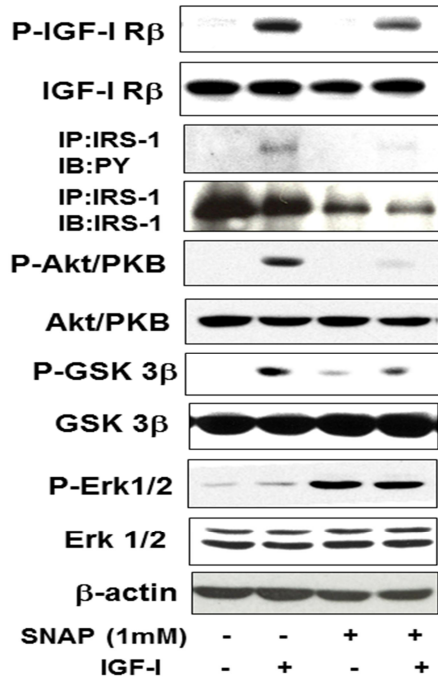
(3) 癌細胞において発現している iNOS の意義

癌細胞において発現している iNOS の意義はまだよく分かっていない。これまでの我々の研究にて iNOS は多くの癌細胞にて発現することが分かっているが、a)RNAi にて iNOS をサイレンシング、b)選択的 iNOS inhibitor (1400W) の使用下にて、細胞増殖、癌浸潤のスピード、アポトーシスの評価および insulin/IGF で刺激した際の IRS-1, Akt/PKB, GSK-3β のリン酸化の程度を評価することで iNOS 発現の意義を明らかにする。

4. 研究成果

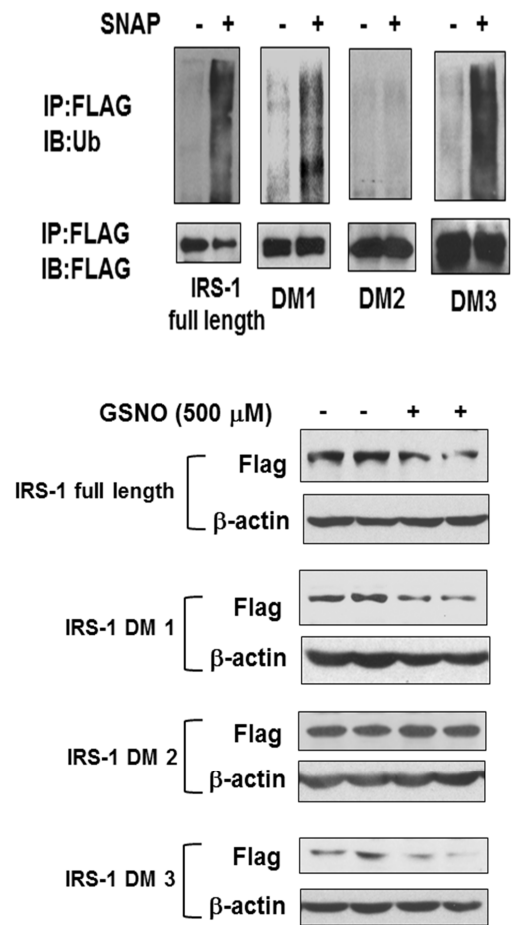
(1)MIAPaCa-2 細胞において IGF-I, insulin シグナルにおける NO の制御について検討した。NO は IGF-IR, insulin receptor, IRS-1, Akt, GSK3 のリン酸化を抑制する、一方 Erk1/2 のリン酸化は亢進させた。また、NO

は亢進 IES-1 蛋白発現を抑制した。IGF-IR, Akt, GSK-3, Erk の蛋白発現に影響はなかった (下図参照)。

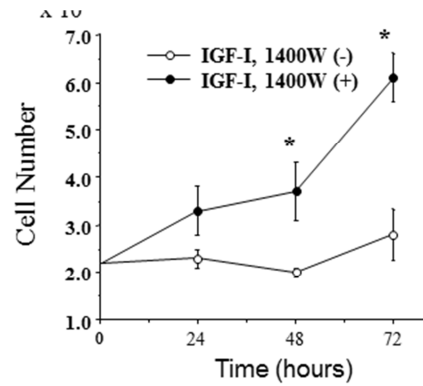
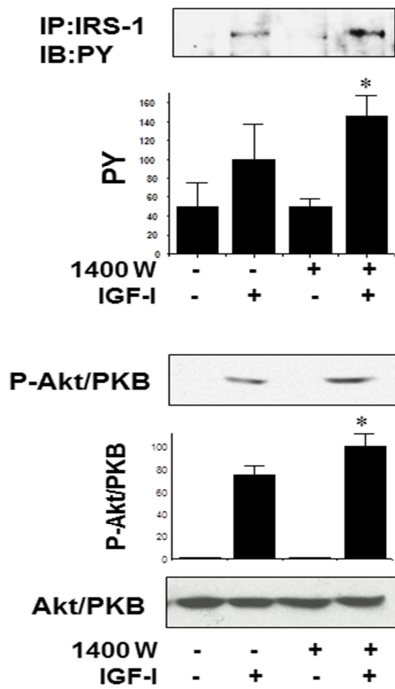


(2) NO による EGF シグナルへの制御についても検討したところ、NO により EGFR, Akt のリン酸化は抑制された。一方 Erk1/2 のリン酸化は亢進した。NO により IRS-1 蛋白発現低下は proteasome inhibitor により抑制されることより、ユビキチン化とそれによるタンパク分解が原因と考えられた。IRS-1 の deletion mutant を強発現させた MIAPaCa-2 細胞に NO を添加すると下図に示す如く、IRS-1 full length, IRS-1DM1, IRS-1DM3 においてユビキチン化と蛋白分解が確認されたが、IRS-1DM2 においてはこれが認められないためユビキチン化には C-terminus が重要で

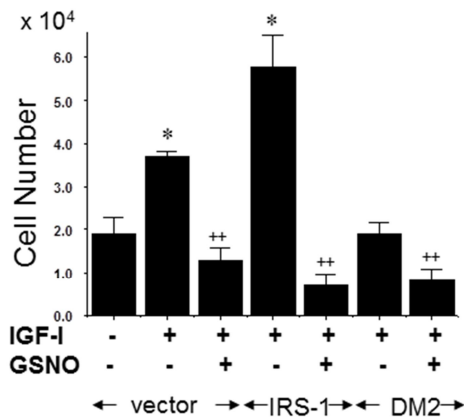
あると考えられた。



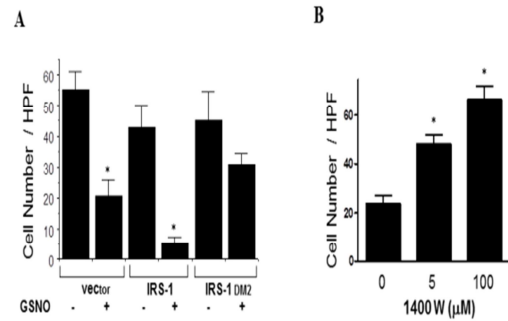
(3) 癌細胞における内因性の iNOS, NO の意義を明らかにするため Panc-1 細胞において iNOS inhibitor である 1400W を添加すると、1400W により IRS-1, Akt のリン酸化は亢進し、Erk1/2 のリン酸化は変わらなかった。また、Panc-1 細胞において iNOS の発現が認められたこれらのことにより内因性の NO により Panc-1 細胞の増殖シグナルは抑制されているといえる。



(5)、Panc-1 に対し、1400W を添加し、IGF-I とともに培養すると 1400W なしでは細胞増殖は見られないが、1400W 添加にて細胞増殖が確認された (上図参照)。血清添加培地にて培養した場合 1400W を添加した場合、細胞増殖が亢進した。



(4) Vector, IRS-1 Wt, IRS-1 DM2 (dominant negative) を M I A P a C a - 2 に遺伝子導入し、強発現する安定株を樹立し、これに NO を作用させて、増殖アッセイを行ったところ、IRS-1Wt 発現株は、コントロールに比べ増殖スピードが速く、IRS-1DM2 発現株は増殖が遅い。NO は各細胞に対し増殖抑制作用が見られた。NO は IRS-1WT 強発現株に対し感受性が強く、IRS-1DM2 発現株に対する感受性は低い (上図参照)。



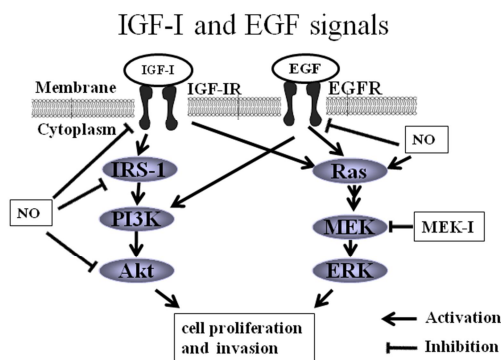
(6) NO による癌浸潤能に対する制御について invasion assay にて検討した。NO は Vector および IRS-1WT 発現株 (MIAPaCa-2 細胞) において浸潤を抑制したが、IRS-1DM2 (DN) 発現株においては浸潤を抑制しなかった。Panc-1 細胞においては 1400W によってその浸潤が亢進した。これらの結果から内因性および外因性の NO は癌の浸潤能を抑制することがわかる (上図参照)。

(7) NO は S-NO となることにより Ras を活性化する作用を有しているため、NO に加え Ras の下流に位置する

MEK-inhibitor (MEK-I) を併用することにより、癌抑制作用を示すと予想される。MIAPaCa-2 細胞、HCT116 細胞、MCF-7 細胞、Panc-1 細胞において NO 供与体+MEK-I は NO 供与体または MEK-I 単剤に比べ癌増殖抑制効果を示した。[現在論文投稿中]

考察；

NO は癌増殖および浸潤抑制作用を有するが、これは growth signal (insulin, IGF, EGF) を抑制する作用によるのかもしれない。特にこれら receptor Aktリン酸化をおよび IRS-1 蛋白発現を抑制することによると思われる。IRS-1 を遺伝子導入した細胞株において NO の感受性が高くなっており、逆に IRS-1DN 高発現株は感受性が低いことが確認されたが、これは細胞増殖および浸潤は IRS-1 の NO による感受性に一部依存しているためかもしれない (下図参照)。また、今回の in vitro における増殖アッセイおよび浸潤アッセイから NO ドナーおよび MEK inhibitor の併用療法は、癌の治療に有効である可能性が示唆された。



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 7 件)

1. Sugita H, Masao K aneki, Masahiko Hirota, Satoshi Furuhashi, Hiroshi Takamori, and Hideo Baba- Nitric oxide inhibits proliferation and invasion activity of pancreatic cancer cells through degradation of insulin receptor substrate-1 protein **Mol Cancer Res.** 2010 8:1152-1163; Epub 2010 Jul 27. (査読有)
2. Hirota M, Kanemitsu K, Takamori H, Chikamoto A, Tanaka H, Sugita H, Sand J, Nordback I, Baba H. Pancreatoduodenectomy using a no-touch isolation technique. **Am J Surg.** 2010 May;199(5):e65-8. Epub 2008 Dec 18. (査読有)
3. Hayashi H, Beppu T, Sugita H, Masuda T, Okabe H, Takamori H, Baba H. Serum HGF and TGF-beta1 levels after right portal vein embolization **Hepatol Res.** 2010 Mar 1;40(3):311-7 (査読有)
4. Hayashi H, Beppu T, Sugita H, Horino K, Komori H, Masuda T, Okabe H, Takamori H, Baba H. Increase in the serum bile acid level predicts the effective hypertrophy of the nonembolized hepatic lobe after right portal vein embolization. **World J Surg** 2009 Sep;33(9):1933-40. (査読有)
5. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma.

Clin Cancer Res. 2009 Mar
15;15(6):1915-22. Epub 2009 Mar 10.
(査読有)

6. Hirota M, Kanemitsu K, Takamori H, Chikamoto A, Tanaka H, Sugita H, Sand J, Nordback I, Baba H. Pancreatoduodenectomy using a no-touch isolation technique. **Am J Surg.** 2008 Dec 16 (査読有)
7. Hirota M, Kanemitsu K, Takamori H, Chikamoto A, Tanaka H, Sugita H, Sand J, Nordback I, Baba H. Pancreatoduodenectomy using a no-touch isolation technique. **Am J Surg.** 2008 Dec 16 (査読有)

[学会発表] (計 4件)

(1) Sugita H, Furuhashi S, Baba H. The role of nitric oxide in growth factor signaling of cancer cells. World DNA and Genome Day 2011. 4. 28. Dalian EXPO Center, Dalian, China

(2) 杉田 裕樹、古橋 聡、高森 啓史、馬場秀夫： 膵癌細胞におけるNO (一酸化窒素) によるPI3-K/Akt pathway制御機構の検討
日本外科学会総会、 2010年4月9日
名古屋国際会議場、名古屋

(3) 古橋 聡、 杉田 裕樹、 阿部 真也、中原 修、 井田 智、 尾崎 宣之、 田中洋、堀野 敬、高森 啓史、 別府 透、 馬場 秀夫： 膵癌細胞株におけるNO donor およびMEK inhibitor の併用による抗腫瘍効果の検討、

日本外科学会総会 2010年4月9日、
名古屋国際会議場、名古屋

(4) 杉田裕樹、廣田昌彦、市原敦史、馬場秀夫 膵癌細胞において発現する iNOS による insulin/IGF シグナルの制御 日本外科学会総会 2008年5月15日、長崎ブリックホール、長崎

[その他]

ホームページ等

熊本大学消化器外科ホームページ：

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/shoukaikega/html/kenkyu/kenkyu02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 裕樹 (SUGITA HIROKI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療
医師

研究者番号：30398218

(2) 研究分担者

高森 啓史 (TAKAMORI HIROSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：90363514

広田 昌彦 (HIROTA MASAHIKO)

熊本大学大・医学部附属病院・非常勤診
療医師

研究者番号：80284769

蒲原 英信 (KAMOHARA HIDENOBU)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90398222