

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590350

研究課題名（和文）がん細胞の足場非依存性増殖に関与する新規シグナル分子 CDCP1 の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel signal molecule CDCP1 which regulates anchorage-independent growth in cancer cells

研究代表者

上北 尚正（UEKITA TAKAMASA）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：50373402

研究成果の概要（和文）：

本研究により、3つのCDCP1機能に関する知見を得た。1つは、CDCP1の機能領域は明らかになっていなかったが、CDCP1細胞外ドメインのCUB2、CUB3とCDCP1細胞内ドメインのアミノ酸734番目のチロシンを含む領域が足場非依存性増殖の制御に関わる可能性が示された。もう一つは、CDCP1が細胞外基質分解酵素であるMMP-9の分泌やMT1-MMPの浸潤突起への輸送を制御することにより、癌の浸潤に寄与する事を明らかにした。最後は、Ras-ERKシグナルによってCDCP1の発現が制御されることを見出し、これまで報告してきたSrc型キナーゼによるCDCP1リン酸化と合わせ、RasとSrc型キナーゼを協調させるエフェクターとしてCDCP1が関与し、Rasを介した足場非依存性や細胞の浸潤・転移能に関わるという、がん細胞におけるCDCP1の機能モデルを提唱するに至った。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found the three functions of CDCP1 in cancer cells. First, CUB2 and CUB3 in the extracellular domain of CDCP1 and the region including Tyrosine734 in the intracellular domain of CDCP1 might contribute to regulate anchorage-independent growth in cancer cell. Second, CDCP1 regulates cancer invasion through regulation of MMP-9 secretion and membranous transportation of MT1-MMP to invadopodia. Finally, induction of CDCP1 expression by Ras along with tyrosine phosphorylation of CDCP1 by Src family kinases is required for Ras-mediated oncogenic phenotypes, such as anchorage-independent growth, invasion and metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：CDCP1、足場非依存性、細胞運動能、浸潤、MMP

1. 研究開始当初の背景

がん死の主要要因であるがん細胞の遠隔臓器への転移には、がん細胞が血管及び、リンパ管内に侵入し、細胞外基質と離れ、足場非存在下で生存し続ける過程が必須である。そのためにはアポトーシス耐性の足場非依存性増殖シグナルを有したがん細胞が選別されなければならない。これまで、がん細胞の接着を介したシグナル伝達機構の研究は進んでいたが、足場非依存性増殖におけるシグナル伝達機構に関しては、情報は極めて少なく、足場非依存性増殖シグナルの解析は重要性及び、発展性に富んだ注目すべき研究領域であった。

申請者は、肺がん細胞株において Src 型キナーゼが既存の生存及び、増殖シグナル (Akt 及び、 ERK シグナル) とは異なる新規のシグナル伝達経路により足場非依存性増殖を制御することを発見し、さらに足場の有無により、チロシンリン酸化が変動する Src 型キナーゼ結合リン酸化タンパク質 CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) の同定に成功した。CDCP1 は膜型タンパク質であり、様々な癌における発現上昇が報告されていたが、その機能に関しての知見は乏しかった。そこで CDCP1 の浸潤・転移に及ぼす影響について解析を進めてきた。例えば、CDCP1 を siRNA 等で抑制したがん細胞では、細胞の運動能が抑制される事、マウス転移モデルで *in vivo* における転移が抑制される事の知見を得ていた。

これらの事から、CDCP1 の発現抑制及び、CDCP1 シグナルの遮断による機能抑制が、癌の進展を阻止することが出来るのではないかと考え、まずその基盤的研究として、がん細胞における CDCP1 機能と CDCP1 機能の制御機構の解明に焦点を当て、研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

癌の特性とは、正常細胞には無い癌特有の性質の事であり、その特性を治療の標的にする事は、正常細胞への影響を最小限に抑えた新規の治療法を生み出す可能性を秘めている。癌の特性である足場非依存性増殖を制御する因子として同定した CDCP1 のがん細胞における発現、機能及び、その制御機構の解析をし、転移の抑制を標的とした分子標的治療法開発へ向けた基礎情報として、癌における CDCP1 の機能を明確にする事を今研究の主目的とした。

CDCP1 は膜型タンパク質であり、細胞内領域に関しては、申請者の研究から CDCP1 のリン酸化が機能に重要である事が示唆されていた。しかし、CDCP1 のリン酸化の制御に関

しては明らかではなかった。一方、細胞外領域に関しては 3 つの CUB ドメインを有している事が示されていたが、機能は分かっておらず、他の CUB ドメイン保有タンパク質の報告から細胞間や細胞外基質との結合に関与する可能性が示唆されるのみであった。そこで、CDCP1 細胞内・外の 2 つの領域に対して CDCP1 のリン酸化制御領域、足場非依存性関与領域の同定をおこなう事により、癌における CDCP1 の機能制御領域を特定する事とした。その結果を踏まえて今後、CDCP1 機能阻害系の設計及び、評価法の開発を進めていくことが可能となる。

また、申請者は CDCP1 が細胞運動能に寄与することを見出した事から、足場非依存性以外にも CDCP1 が癌の浸潤・転移に積極的に関与すると仮定した。それを立証するため、CDCP1 が浸潤・転移においてどのような役割を担っているのかを明らかにすべく、CDCP1 の有無による細胞外基質分解能の測定、細胞外基質分解酵素の制御等について検証をおこなう。CDCP1 の浸潤・転移機構への関わりが示されれば、癌における CDCP1 機能の重要性が明らかとなり、今後の CDCP1 を介した治療効果測定の開発にも役立てられる。

さらに、CDCP1 の機能を制御する上で CDCP1 の発現制御の解明は、重要な事項の一つである。CDCP1 の発現が癌で高発現している事は、申請者を含め多くのグループにより報告があるが、その発現制御機構は明らかではなかった。これを明らかにし、CDCP1 のリン酸化修飾を介した細胞死抑制シグナル及び、浸潤制御シグナルの解析と CDCP1 の機能との相関性等、CDCP1 機能の制御機構としていまだ解明されていない基礎的な問題を解決する。

これらにより、臨床応用へと展開する研究基盤を確立し、CDCP1 を介した足場非依存性及び、運動能・浸潤能の抑制によるがん転移の分子標的治療への応用が将来可能である。

3. 研究の方法

細胞外ドメイン及び、細胞内ドメインの機能解析をおこなうために、RNAi 法と CDCP1 の細胞外領域の様々な欠失変異体を用いて細胞内外領域の欠失変異体のみを発現する系を構築し、CDCP1 の足場非依存性等に関与する領域とリン酸化シグナルに関わる領域を特定する。さらに、免疫沈降により、CDCP1 の 2~多量体形成の有無を確認する。

がん細胞の浸潤に関わる機能 (浸潤突起形成等) の検証をおこない、CDCP1 が浸潤能のどの機能に関わるかを検証する。そのために、RNAi 法を用いた CDCP1 タンパク質発現の抑制

による膵がん細胞株での細胞運動能・浸潤能を Transwell assay で検討する。浸潤に関わる細胞外基質分解酵素の検定の為に細胞上清における基質分解能を Gelatin zymogram でおこなう。さらに、浸潤突起における CDCP1 機能を検討するために、乳がん細胞株を用いて、同様に CDCP1 発現抑制系での浸潤突起形成や分解能の測定を蛍光ゼラチン分解活性等で確認する。浸潤突起における基質分解に重要な役割を果たす膜型細胞外基質分解酵素 MT1-MMP との結合を免疫沈降で確認し、CDCP1 と MT1-MMP の細胞内での局在を蛍光蛋白質標識及び、抗体染色を用いて検討し、CDCP1 と MT1-MMP がどの膜輸送系に関与し、CDCP1 が MT1-MMP 機能にどう影響を与えているかを確認する。

ヒト肺癌組織における Ras 変異の有無による CDCP1 の発現量を定量する。肺癌細胞株に Ras と Ras 活性型変異体を遺伝子導入し、CDCP1 のタンパク質発現が上昇するかを確認する。さらに、Ras 及び、Ras 下流シグナルの阻害を行い、CDCP1 発現に関わるシグナル経路を特定する。また、Ras による CDCP1 タンパク質発現の変化が、今まで明らかにしてきた足場非依存性、浸潤等の機能に相関するかを実験系により確認する。

4. 研究成果

CDCP1 のドメイン機能解析では、細胞外に存在する各 CUB ドメイン欠失変異体を用いた実験により細胞膜に近い部位にある CUB2、CUB3 ドメインが CDCP1 の 2~多量体形成、CDCP1 のリン酸化亢進及び、足場非依存性に関与する事を示唆するデータを得た。また、細胞内では CDCP1 のアミノ酸の 734 番目のチロシンを含む領域が必須であることを CDCP1 細胞内ドメイン欠失変異体での再構築実験で明らかにした。以上より、CDCP1 の細胞内外の両特定領域が CDCP1 機能を介したシグナルと足場非依存性に重要である可能性が示唆された。(発表論文 1)

CDCP1 のヒト肺癌組織及び、ヒト膵癌組織における発現が、生命予後に相関することが明らかとなった事から(発表論文 2、3)、CDCP1 は生体内で癌の進展に寄与する方向に働いている可能性が示唆された。よって、癌の進展に関わる浸潤能に関して研究を進めた。CDCP1 の機能を介したがん細胞の浸潤に関しては、膵がん細胞株での CDCP1 発現抑制により CDCP1 が浸潤に必要な事、細胞外基質分解酵素である MMP-9 の分泌制御に関わる事を明らかにした。さらに乳癌細胞株において、CDCP1 が MT1-MMP と結合し、浸潤に重要な構造体である浸潤突起への MT1-MMP の輸送を制御して浸潤突起における細胞外基質分解活性に関与する事を明らかにした。今まで CDCP1 が浸潤に関与する機構は明らかではなかったが、今研究

で CDCP1 による MMP-9 の分泌制御及び、MT1-MMP の浸潤突起への輸送機構を介した細胞外基質分解能の制御を見出し、癌の浸潤に関与する CDCP1 機能の一端を明らかにした。(発表論文 2 及び、論文投稿中)

CDCP1 の機能を制御する上で重要である CDCP1 の発現制御に関しては、肺癌組織検体の CDCP1 抗体染色から活性型変異 RAS の検体で優位に CDCP1 発現が高いことを明らかにした。また 58 種の肺がん細胞株を用いた定量 PCR による CDCP1 の mRNA 発現の定量においても同様の結果を得た。面白いことに CDCP1 の mRNA 発現は、肺がん細胞株で変異が確認された EGFR、p53、LKB1 では影響がない事も明らかとなった。さらに、Ras 及び、下流シグナルの阻害により、CDCP1 の mRNA 発現が Ras と下流の ERK シグナルにより制御されていることを明らかにした。これら結果から、Ras-ERK シグナルと、これまで報告してきた Src 型キナーゼによる CDCP1 リン酸化が協調して足場非依存性や細胞の浸潤・転移能に関わるという CDCP1 の癌における機能モデルを提唱し、さらに、CDCP1 が今まで明らかではなかった癌原遺伝子 Ras と Src 型キナーゼの協調作用のエフェクターであることを提唱するに至った。(論文投稿中)

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 3 件)

1. Uekita T. and Sakai R. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci* 102, 1943-1948, 2011
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02052.x
(査読・有)
2. Miyazawa Y., Uekita T., Hiraoka N., Fujii S., Kosuge T., Kanai Y., Nojima Y. and Sakai R. CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res* 70, 5136-5146, 2010
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0220
(査読・有)
3. Ikeda JI., Oda T., Inoue M., Uekita T., Sakai R., Okumura M., Aozasa K. and Morii E. Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Sci* 100, 429-433, 2009
DOI:10.1111/j.1349-7006.2008.01066.x
(査読・有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 上北尚正、堺隆一
癌の足場非依存性と浸潤・転移を制御する新規因子 CDCP1 の解析
平成 23 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 個体レベルのがん研究のパラダイム—動物発がんモデルと分子機構の解明— 2012 年 1 月 19 日 琵琶湖ホテル
2. Uekita T. and Sakai R. Suppression of autophagy by CDCP1 is essential for anoikis resistance in cancer cells. 第 70 回 日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 5 日 名古屋国際会議場
3. Uekita T. and Sakai R. CDCP1 links Ras and Src signaling pathway as a common effector for the promotion of tumor metastasis. The 6th Mechanisms & Models of Cancer 2011 年 8 月 14 日 Salk Institute, La Jolla, CA, USA
4. Uekita T. and Sakai R. Oncogenic Ras induces CDCP1 expression and regulates anoikis resistance, motility and invasion in cancer cells.
第 69 回 日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル
5. 宮澤悠里、上北尚正、堺隆一
がん細胞の浸潤に関与する CDCP1 及び下流因子 PKC δ の機能解析
第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル
6. 八木玲子、上北尚正、堺隆一
肺がんの骨転移モデル作製と骨転移関連因子の探索
第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル
7. 上北尚正、堺隆一
癌細胞の足場非依存性増殖における CDCP1 の Autophagy 抑制の重要性
第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 2010 年 6 月 17 日 金沢市文化ホール
8. Uekita T. and Sakai R. Regulation of metastasis and invasion by a novel Src substrate CDCP1. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜
9. 上北尚正、堺隆一
CDCP1 は膀胱癌の転移・浸潤能に関わる予後因子である
第 18 回日本がん転移学会学術集会・総会 2009 年 7 月 24 日 旭川グランドホテル

[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

上北 尚正 (UEKITA TAKAMASA)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員
研究者番号 : 50373402

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :