

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 3 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590790

研究課題名（和文） 消化器癌における EGF 様増殖因子の放出に連動した核内転写抑制の解除機構

研究課題名（英文） To clarify the mechanism that C terminal fragments of EGFR ligand cause nuclear export of transcriptional repressors

研究代表者

城 卓志 (JOH TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30231369

研究成果の概要（和文）：

HB-EGF-CTF 結合核内リプレッサー探索するためマイクロアレー法を用い BCL6 を同定した。HB-EGF-CTF は、核移行後 BCL6 と結合し、BCL6 とともに核外輸送されユビキチン化分解される。リプレッサー機能が低下し、cyclinD2 発現が増加した。ヒト胃癌切除標本での、HB-EGF, BCL6, cyclinD2 の免疫染色学的検討でも、HB-EGF 陽性胃癌では、BCL6 発現陽性での cyclinD2 発現抑制が認められた。HB-EGF-CTF 核移行抑制が、BCL6 の機能維持となり、胃がんの増殖進展を抑制すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

BCL6 is a transcriptional repressor that has important functions in lymphocyte differentiation and lymphomagenesis, but there have been no reports of BCL6 expression in gastric cancers. In the present study, we investigated the BCL6 function in gastric cancers. Treatment with TPA resulted in BCL6 degradation and cyclin D2 upregulation. This phenomenon was inhibited by the suppression of the nuclear translocation of HB-EGF-CTF (C-terminal fragment of pro-HB-EGF). The HB-EGF-CTF nuclear translocation leads to the interaction of BCL6 with HB-EGF-CTF and the nuclear export of BCL6, and after that BCL6 degradation was mediated by ubiquitin/proteasome pathway. Real-time RT-PCR and siRNA targeting BCL6 revealed that BCL6 suppresses cyclin D2 expression. Our data indicate that BCL6 interacts with nuclear-translocated HB-EGF-CTF and that the nuclear export and degradation of BCL6 induces cyclin D2 upregulation. We performed immunohistochemical analyses of BCL6, HB-EGF and cyclin D2 in human gastric cancers. The inverse correlation between BCL6 and cyclin D2 was also found in HB-EGF-positive human gastric cancers. BCL6 degradation caused by the HB-EGF-CTF also might induce cyclin D2 expression in human gastric cancers. Inhibition of HB-EGF-CTF nuclear translocation and maintenance of BCL6 function are important for the regulation of gastric cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：HB-EGF shedding, ADAM, BCL6, HB-EGF-CTF, 癌治療戦略

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで癌の形質発現や悪性度について、

(1) EGF 様増殖因子の放出(shedding)

メカニズム

(2) 消化器癌の転写制御因子の検討

を続けてきた。

申請者らのグループは、一方で EGF 様増殖因子の shedding が、ある種の核内転写抑制因子を阻害する事実を明らかにし (*J Cell Biol* 163:469, 2003, *J. Biol. Chem.* 282, 14797, 2007), この shedding に伴う転写制御の抑制が、新しいがん治療の標的になりうることを報告した (*Clin. Cancer Res* 15:14:3956, 2008)。すなわち、申請者らの研究によって、EGF 様増殖因子の特徴とされる細胞膜結合型前駆体から、膜型蛋白分解酵素 ADAM の活性化に伴い増殖因子が放出されると、膜に取り残される前駆体の C 末端フラグメント (CTF) が核に移行し、C2H2 Zn-finger ドメインを持つ転写抑制因子 (repressor: PLZF etc) と結合することで、転写抑制を解除、癌遺伝子 c-myc などの増殖に関わる分子を強力に誘導することが明らかとなった。この事実は、同じ受容体 (EGFR) を活性化する 7 つの増殖因子の前駆体がすべて細胞膜結合型である必要性を説明するだけでなく、構造が違う 7 種類の CTF が受容体とは違ったシグナルをそれぞれに惹起する可能性を示すものであった。しかしながら、この CTF からの EGF シグナルに関する検討はほとんどない。

2. 研究の目的

「EGF 様増殖因子の放出 (shedding) 機構」と「消化器癌の核内転写因子」に関する研究から見出すことのできた「増殖因子の放出に伴う新しい EGF シグナル: shedding に伴う核内転写制御の解除機構」を、新しい転写抑制因子を解析することでさらに明確にし、消化器癌の新しい診断と治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 消化器系癌細胞株における EGF 様増殖因子の機能解明に向けた系統的解析と基礎データの蓄積

消化器系癌細胞株における代表的 EGF 様増殖因子 (HB-EGF, amphiregulin, TGF- α , epiregulin) の shedding と細胞内ドメイン (CTF) の機能を解析する。

① 上記各癌細胞株での EGF 様増殖因子、リセプター、shedding 酵素遺伝子の発現解析
EGF 様増殖因子 (HB-EGF, amphiregulin, TGF- α , epiregulin) の 4 種、リセプター (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4) の 4 種、shedding 酵素 (ADAM 9, 10, 12, 15, 17, 19) の 6 種の定量 PCR による遺伝子発現を定量的に解析する。

② 上記各癌細胞株でのリプレッサーの遺伝子発現解析

オリジナルに作成したヒト・リプレッサー cDNA マイクロアレーを用いて、上記各癌細胞株でのリプレッサー (CTF の標的分子の候補) の発現プロフィールを解析し、データベース化する。発現量の高いものから順に、各 CTF との結合実験を行う。結合の確認できたリプレッサーを解析の候補とする。

(3) 各癌細胞株における EGF 様増殖因子の shedding 解析

① 解析する EGF 様増殖因子が扱う癌細胞株で shedding されることを確認

アルカリフォスファターゼ (AP)-標識 EGF 様増殖因子遺伝子プラスミド

(*Gastroenterology*. 127, 559-569, 2004 参照) を遺伝子導入し、培養上清中の AP 活性で shedding を定量化する。shedding の誘導には 12-O-tetradecanoylphorbol

-13-acetate (TPA; 60 nM) をコントロールとして用いる。shedding によって CTF が産生されることを Western blotting (HB-EGF の場合は #H1 pAb, or mAb#D, または CarBiochem から市販されている抗体) で確認。

① shedding 酵素の同定

用いた刺激で活性化される shedding 酵素 (ADAM 9, 10, 12, 15, 17, 19) の特異的 siRNA

用いて、遺伝子ノックダウンにより、上記の AP 活性測定法を用いて shedding 酵素を同定する。

(3) 手術標本、生検組織における CTF とリプレッサーの免疫組織学的検討と臨床病理学的検討

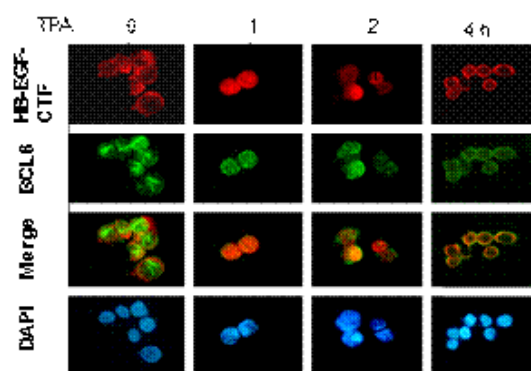
① 消化器癌における CTF の意義

すでに作成した、EGF, TGF- α , HB-EGF, Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin 前駆体の CTF 抗体を用い、臨床検体 (手術標本、生検組織) の免疫組織化学的検討を行う。発現の部位、細胞質か核内かなどの検討を行い。組織型、浸潤程度、予後 (生存期間など)、抗癌剤の効果などと関連するかを検討する。

4. 研究成果

マイクロアレー法にて HB-EGF-CTF と結合する核内リプレッサー遺伝子群を同定した。その 1 つである BCL6 の機能解析を行った。BCL6 は、核内に移行した HB-EGF-CTF と結合し、核外輸送され Ubiquitin/ proteasome pathway により分解され、リプレッサー機能が低下し、cyclinD2 の発現が増加した。さらに、ヒト胃癌切除標本 100 例において HB-EGF, BCL6, cyclinD2 の発現について免疫染色にて検討し、ヒト胃癌切除標本における免疫組織化学的検討においても、HB-EGF 陽性胃癌群においては BCL6 発現による cyclinD2 発現抑制傾向が認められた。

図 1



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 6 件)

1. Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T,

Shimura T, Kamiya T, Kataoka H, Joh T. Involvement of cell proliferation induced by dual intracellular signaling of HB-EGF in the development of colitis-associated cancer during ulcerative colitis. *Ulcers* 査読あり。Volume 2011, 6 pages. doi:10.1155/2011/457637

2. IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸細胞増殖機序. 谷田諭史, 尾関啓司, 塚本宏延, 溝下 勤, 片岡洋望, 神谷 武, 城 卓志. *潰瘍* 査読なし。38(2), 2011, 135-138.

3. HB-EGF-C 末端核移行シグナルをターゲットにした新規薬剤探索と細胞増殖抑制機序. 尾関啓司, 谷田諭史, 溝下 勤, 水島隆史, 志村貴也, 村上賢治, 平田慶和, 片岡洋望, 神谷 武, 福田伸治, 東山繁樹, 城 卓志. *消化器と免疫*. 査読なし。47, 2011, 144-146.

4. Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Kubota E, Hirata Y, Mizushima T, Mizoshita T, Tanaka M, Mabuchi M, Tsukamoto H, Tanida S, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T. TGF β induces proHB-EGF shedding and EGFR transactivation through ADAM activation in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読あり。19; 402(3) 2010, 449-54. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.09.130

5. Tanida S, Kataoka H, Mizoshita T, Shimura T, Kamiya T, Joh T. Intranuclear translocation signaling of HB-EGF carboxy-terminal fragment and mucosal defense through cell proliferation and migration in digestive tracts. *Digestion*. 査読あり。82(3), 2010, 145-9. DOI:10.1159/000310903

6. Hirata Y, Ogasawara N, Sasaki M, Mizushima T, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kubota E, Wada T, Tanida S,

Kataoka H, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T. BCL6 degradation caused by the interaction with the C-terminus of proHB-EGF induces cyclin D2 expression in gastric cancers. British Journal of Cancer 査読あり。100, 2009, 1320-1329. DOI:10.1016/S0016-5085(09)61447-5

[学会発表] (計7件)

1. IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF-C 末端 signal を介した大腸癌細胞増殖機序 —HB-EGF-CTF シグナル抑制薬網羅的探索から—。尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、城 卓志。JDDW 2011, 2011.10.20. 福岡
2. TGFβ による ROS および ADAM17 を介した EGF 受容体 transactivation のメカニズムの解析。海老正秀、片岡洋望、志村貴也、溝下 勤、谷田諭史、平田慶和、神谷 武、水島隆史、東山繁樹、城 卓志。JDDW 2011, 2011.10.20. 福岡
3. HB-EGF-CTF の核内移行は胃癌浸潤を促進する。志村貴也、吉田道弘、福田信治、溝下 勤、片岡洋望、東山繁樹、城 卓志。第 70 回日本癌学会学術総会。2011.10.5 名古屋
4. IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF signal を介した大腸癌細胞増殖機序 —EGF-C 末端 signal を標的とした新規薬剤探索—。尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、城 卓志。第 7 回消化管学会総会 2011. 2.18 京都
5. IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸癌細胞増殖機序 - HB-EGF-C 末端シグナルを標的とした網羅的薬剤探索 -。谷田 諭史、溝下 勤、水島隆史、城 卓志。厚生労働省「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」。平成 22 年度第 2 回総会 免疫関連バイオマーカーの開発。2011.1.28 東京
6. TGFbeta induces shedding of proHB-EGF

and EGFR transactivation though ADAM activation. 海老正秀、城 卓志、神谷武、片岡洋望、久保田英嗣、溝下 勤、志村貴也、村上賢治、平田慶和、東山繁樹。第 69 回 日本癌学会総会 English Workshops 2010.9.24. 東京

7. HB-EGF-C 末端核移行シグナルをターゲットにした新規薬剤探索と細胞増殖抑制効果について。尾関啓司、谷田諭史、福田信治、東山繁樹、城 卓志。第 47 回日本消化器免疫学会総会 一般演題 2010.07.08. 滋賀

[その他]

名古屋市立大学大学院医学研究科消化器代謝内科学ホームページ業績集
<http://www.ncu-shotai.ac/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 卓志 (JOH TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30231369

(2) 研究分担者

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40381785

谷田諭史 (TANIDA SATOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30528782

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・医学部・教授
研究者番号：60202372