

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 18 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591013

研究課題名（和文）核細胞質間シャトル機構を標的とした小細胞肺癌の治療開発

研究課題名（英文）Development of treatment strategies aimed at nucleocytoplasmic shuttling for small cell lung cancer

研究代表者

堀尾 芳嗣（HORIO YOSHITSUGU）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号：30344336

研究成果の概要（和文）：核細胞質間をシャトルする p27 の T198 と T157 のリン酸化は浸潤に関わる。小細胞肺癌の細胞株のウェスタンブロットで p27 の S10 と T198 及び T157 のリン酸化は相関していたが、切除標本 30 例染色では 3 部位ともリン酸化 p27 は高発現であった。線維芽細胞と SCLC 細胞株で VP-16 や Amrubicine と Leptomycin B あるいは siRNA による CRM1 阻害の併用効果は相加的であった。トポイソメラーゼ II と核内移行に関わる RanBP2 の発現と抗がん剤の感受性との間に相関はなかった。

研究成果の概要（英文）：Cell cycle regulator p27 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. Phosphorylation at threonine 198 (T198) and 157 (T157) increase cell motility. We showed S10 phosphorylation was associated with T198 and T157 phosphorylation in small cell lung cancer (SCLC) cell lines. In 30 surgically resected SCLC specimens, however, immunohistochemistry revealed high expression of phosphorylated p27 at T198 and T157. Leptomycin B or knockdown of cellular CRM1 by siRNA showed additive effects with topoisomerase II inhibitors (Etoposide and Amrubicine) in SCLC cell lines and a fibroblast cell line. There were no correlations between chemosensitivity of amrubicin and mRNA expression levels of the RanBP2, TopoII-alpha and TopoII-beta genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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・呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌、核細胞質間シャトル、p27

1. 研究開始当初の背景

腫瘍抑制遺伝子である p27 は核細胞質間をシャトル移行することが知られている (Chum, et al. Nature Rev Cancer 8, 253-267, 2008)。小細胞肺癌において p27 蛋白の不活化は①ユビキチン分解酵素 Skp2 の発現亢進

により核内 p27 の発現低下する場合と②p27 蛋白がリン酸化修飾を受け核外輸送担体 CRM1 を介して核外移行し細胞質で高発現することの 2 つがある。我々は小細胞肺癌における p27 蛋白の発現亢進が高頻度であることを報告しているが (Yatabe Y, et al. Cancer

Res. 58, 1042-47, 1998)、細胞質内 p27 蛋白の高発現の意義は、CDK 阻害機能が消失するだけでなく、浸潤性や転移能に関与すると考えられている (Besson A, et al. Nature Rev Cancer 4, 948-955, 2004)。小細胞肺癌における p27 の発現亢進の分子機序は不明であり、その解析を行うことは新たな治療法の開発につながることを期待される。

また、小細胞肺癌の治療薬であるエトポシドや塩酸アムルピシンの標的であるトポイソメラーゼ II alpha も核細胞質間をシャトル移行し、その移行には核外輸送担体 CRM1 が関与している (Turner JG, et al. J Cell Science 117, 3061-3071, 2004)。従って、核外輸送を阻害することでトポイソメラーゼ II 阻害剤の効果を増強することが期待される。

2. 研究の目的

核内蛋白質の核外移行あるいは細胞質内蛋白質の核内移行に関与する分子は治療標的として注目されているが (Kau TR, et al. Nature Rev Cancer 4, 106-117, 2004)、我々は小細胞肺癌における p27 蛋白の核外移行の分子機序の解明と治療への応用を図る。核内で CDK 阻害を行う p27 蛋白と細胞質内に存在する p27 蛋白のリン酸化状態と Skp2 と KPC1/KPC2 によるユビキチン化蛋白分解過程の状態の検討および CRM1 を介して核外移行阻害による p27 の核内量/細胞質内量の変動、さらには p27 の T157、T198 のリン酸化状態を制御する PI3K-AKT 系の関与の検討を行い、p27 の発現亢進と mislocalization の原因探索を行い、CRM1 阻害による治療の可能性とリン酸化修飾を阻害することによる治療の可能性を明らかにする。

トポイソメラーゼ II alpha の核外移行の阻害により治療効果を増強できることを証明する。小細胞肺癌の臨床では塩酸イリノテカン、エトポシドあるいは塩酸アムルピシンなどのトポイソメラーゼ阻害剤がキー・ドラッグである。ポイソメラーゼ II 阻害剤の標的であるトポイソメラーゼ II alpha の核細胞質間シャトルを CRM1 のレベルで阻害することによりエトポシドあるいは塩酸アムルピシンの治療効果が増強されることを明らかにする。

3. 研究の方法

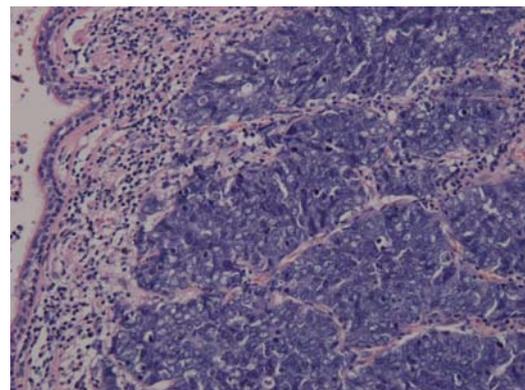
(1) 腫瘍抑制遺伝子 p27 は核内で KIS (Kinase Interacting stathmin) や DYRK (Dual tyrosine phosphorylation related Kinase) により p27S10 のリン酸化を受け CRM1 を介して核外移行し、CyclinD/CDK4/6 との複合体として核内移行し核・細胞質間シャトルが成立する。PI3K 系からのシグナルのより p27T157

のリン酸化は核内移行を阻害する。また、核内では Skp2、細胞質内では KPC によりユビキチン化され蛋白分解を受ける。今回、p27 の発現亢進と mislocalization の原因探索として p27 のリン酸化状態の検討と核内での Skp2、細胞質内での KPC によりユビキチン化蛋白分解の低下の有無の検討を行う。さらに、細胞質内 p27 による Rho/ROCK 系を介する浸潤性や転移能を亢進する分子機序についても検討する。

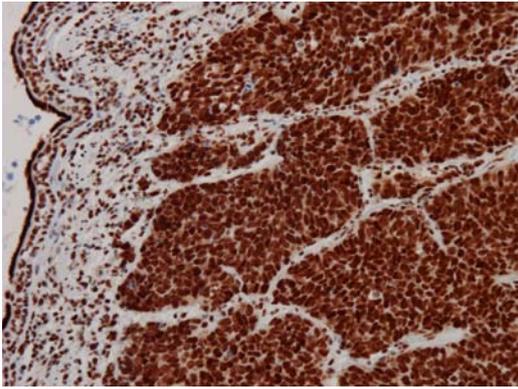
(2) 核・細胞質間シャトルするトポイソメラーゼ II alpha の核外移行を Leptomycin B あるいは CRM1 に対する SiRNA で阻害し、トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドや塩酸アムルピシンとの併用効果を Chou と Talalay 導き出された combination index 法により解析する。

4. 研究成果

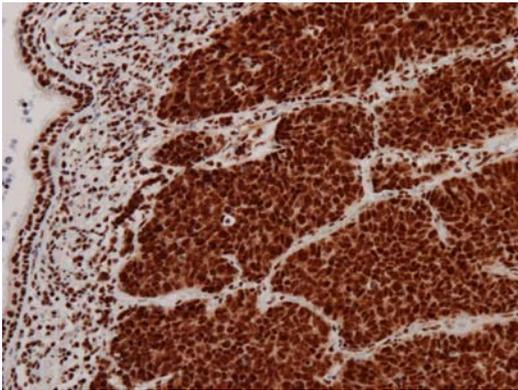
(1) 小細胞肺癌 5 株を含む肺癌細胞株 20 株において、p27、Skp2 (2 つのアイソフォームを含む)、CRM1 の 3 分子の遺伝子発現を RT-PCR で検討したところ、基本的には正の相関を認めた。Skp2 の高発現の ACC-LC-172 は例外であった。小細胞肺癌 5 株において S10 のリン酸化は ACC-LC-49 と 172 が低発現であった。S10 リン酸化と相関して p27 の p27T198 と p27T157 のリン酸化が認められた。臨床検体での検討を行うために切除された小細胞肺癌 30 症例の組織を免疫組織学的に検討した。予想したとは異なってすべての検体で、p27S10 と T157 のリン酸化の強い発現を認め、細胞質内リン酸化 p27 発現と浸潤能や転移能との関連の検討には至らなかった。培養細胞と臨床検体との間の細胞質内 p27 発現の乖離の理由は明らかにできなかった。



HE 染色



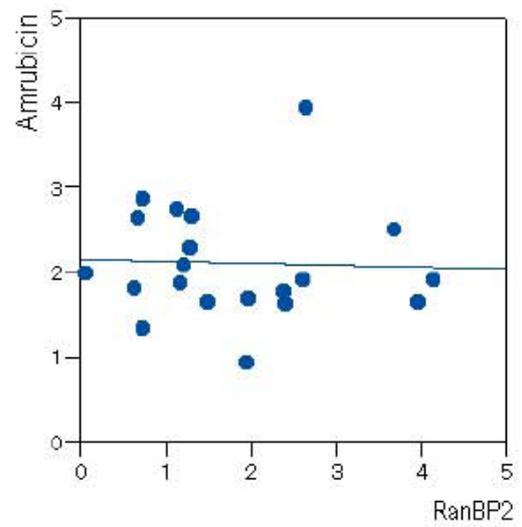
p27T157 のリン酸化



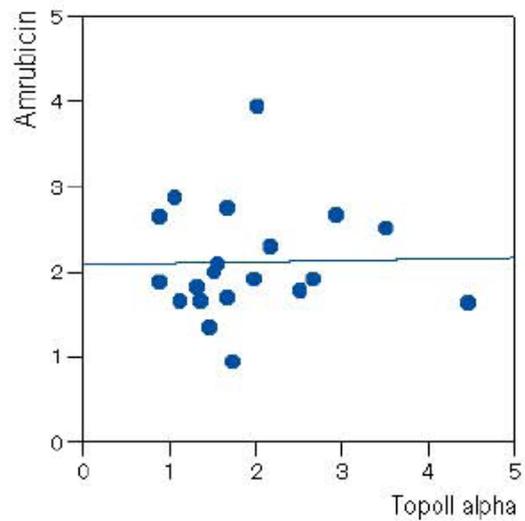
p27S10 のリン酸化

(2) 核・細胞質間シャトルするトポイソメラーゼ II alpha の核外移行を Leptomycin B あるいは CRM1 に対する SiRNA で阻害し、トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドや塩酸アムルピシンの併用効果を Chou と Talalay 導き出された combination index 法で検討した。Leptomycin B とエトポシドあるいは塩酸アムルピシンの細胞増殖抑制効果は、相加的で相乗効果は認められなかった。CRM1 に対する SiRNA で阻害に関しても相加的で相乗効果は認められなかった。細胞株におけるエトポシドや塩酸アムルピシンの抗腫瘍効果とトポイソメラーゼ II の核細胞質間シャトル移行と機能発現に関与する RanBP2 やトポイソメラーゼ II の発現と 2 つの抗がん剤の効果には相関のないことに関しては Cancer Chemother Pharmacol. 2010 に論文化した。

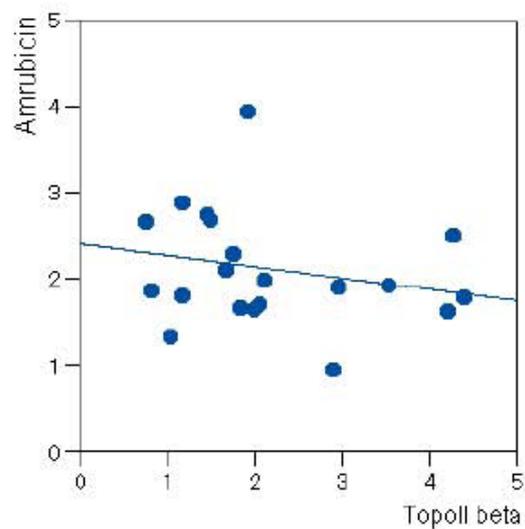
(A)



(B)



(C)



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)

Ogawa S, Horio Y, Yatabe Y, Fukui T, Ito S, Hasegawa Y, Mitsudomi T, Hida T. Patterns of recurrence and outcome in patients with surgically resected small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol.*、査読有、2011 Jun 30. [Epub ahead of print]

Horio Y, Osada H, Shimizu J, Ogawa S, Hida T, Sekido Y. Relationship of mRNA expressions of RanBP2 and topoisomerase II isoforms to cytotoxicity of amrubicin in human lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.*、査読有、66 2010、237-243

Yoshida K, Yatabe Y, Park J, Ogawa S, Park JY, Shimizu J, Horio Y, Matsuo K, Mitsudomi T, Hida T. Clinical outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients screened for epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Cancer Res Clin Oncol.*、査読有、36、2010、525-537

Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y. Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. *Carcinogenesis*、査読有、30、2009、1097-1105

[学会発表] (計2件)

Horio Y, Ishikawa S, Yatabe Y, Shimizu J, Yoshida K, Fukui T, Ito S, Hasegawa Y, Mitsudomi T, Hida T. Clinical features in surgically treated patients with small cell lung cancer: Risk of brain metastasis and possible role of prophylactic cranial irradiation. *ASCO*、e17532、2010

堀尾芳嗣、清水淳市、朴智栄、朴将哲、小川紫都、吉田公秀、樋田豊明、関戸好孝: 肺癌細胞株におけるトポイソメラーゼII阻害剤アムルビシンの感受性とRanBP2 とトポイソメラーゼII遺伝子発現. 第49回日本呼吸器学会、2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀尾 芳嗣 (HORIO YOSHITSUGU)

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍

学部・研究員

研究者番号: 30344336