

## 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 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010年～2011年

課題番号：22689009

研究課題名（和文） Srcによるがん形質発現メカニズムの再考

研究課題名（英文） Molecular basis of Src-induced tumorigenesis

研究代表者 小根山 千歳 (ONEYAMA CHITOSE)  
大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90373208

研究成果の概要（和文）：

c-Src によるがん形質に伴い、ラフトの主成分であるコレステロールやスフィンゴ脂質の組成及びそれらの合成や代謝に関わる遺伝子の発現が変動していること、ラフト領域の量的・質的变化を誘導することでがん形質が制御されることを見出した。c-Src による腫瘍形成を抑制する miR-99a、がん悪性化を抑制する miR-542-3p の機能を明らかにした。これらの研究により、Src によるがん形質発現における新たなシグナルのリンクを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

In c-Src-induced transformation, we found that the lipid composition of rafts and the expression of lipid metabolism genes are changed. The addition of cholesterol to rafts efficiently suppressed c-Src-induced cell transformation. We also found that the miR-99a-mTOR/FGFR3 pathway is crucial for controlling tumor growth and that c-Src-miR-542-3p-ILK-FAK circuit plays a pivotal role in controlling tumor progression. Our study provides insights into these novel signaling axes in the Src-related oncogenic pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2011年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

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：分子腫瘍学, Src, ラフト, マイクロ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

私はこれまでの研究で、Srcを負に制御する Cskを欠損したマウス線維芽細胞(CskKO)は、正常細胞型Srcを発現させることによって(CskKO/Src)がん化することを見出した。この系では、遙かに限定的な細胞内チロシンリン

酸化しか惹起されず、c-Srcによるがん化のメカニズム解析に適したモデルである。そこで、Srcによるがん化とリン酸化あるいは発現の変動が関連している標的分子・遺伝子を探索したところ、細胞膜マイクロドメイン「ラフト」

に局在する膜アダプター蛋白質Cbpと、数種のマイクロRNAを見出した。CbpはSrcによるがん化や腫瘍形成を顕著に抑制した。その機構を解析したところ、Cbpは活性型Srcを直接ラフトにリクルートすることで、ラフト外の膜構造（細胞接着班など）から発信されるがん化シグナル(FAKやCasの活性化、STAT, ERK, AKT経路の活性化)を遮断し、がん形質を正常化していた。さらにCsk存在下においては、Cbpは活性型SrcとCskと別の作用点で結合し、CskによるSrcの効率的な不活性化を助けていた。また大腸がん患者の腫瘍組織やSrcの活性が高いヒトがん細胞においてCbpの発現が低下しており、ヒトがん細胞にCbpを導入すると腫瘍形成が抑制されることを見出した。これらの知見から、これまでシグナル伝達の起点と考えられてきたラフトが、がん化シグナルに関してはむしろ抑制的に作用するという新しい概念に至った。

一方、モデル系のアレイ解析によって、Srcの活性化により発現が変動する数種のマイクロRNAを見出した。マイクロRNAは、細胞内在性のノンコーディングRNAであり、標的mRNAと結合して蛋白発現（翻訳）を調節していると考えられている。近年、がんにおいてマイクロRNAの発現異常が多数報告され、がん形質との関連が示唆されている。そこで、Srcの活性が高いことで知られるヒト大腸がん細胞と正常細胞について申請者らが見出したマイクロRNAの発現を調べたところ、悪性度の高いがん細胞で顕著な発現低下が認められた。さらに、これらのがん細胞にそれぞれのマイクロRNAを導入することで、Srcによるがん化やヌードマウスにおける腫瘍形成が顕著に抑制されることを見出した。一方、正常細胞にこれらマイクロRNAの相補的RNAを導入して機能を抑制すると、がん形質を獲得することも明らかとなった。

## 2. 研究の目的

Srcは代表的ながん原遺伝子とされ、大腸がんを始めとする多くのヒトがん細胞でその発現及び活性の亢進が見られるなどがん化との関わりが示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。これまではv-Srcや

恒常活性型Srcを用いて細胞のがん化を引き起こすチロシンリン酸化シグナルの研究が進められてきた。私は、Srcの活性を負に制御しているCskを欠損したマウス線維芽細胞が、正常細胞型Srcによってがん化することを明らかにし、この系を活用してSrcによるがん化の詳細な分子メカニズムを再考している。本研究では、代表的ながん原遺伝子産物であるc-Srcについて、がんにおけるその制御破綻・がん形質発現シグナルの伝達機構を、細胞膜マイクロドメイン「ラフト」及びマイクロRNAという新たな観点から解析する。私はこれまでの研究で、上記2点がc-Srcのがんにおける機能に重要であることを見出しつつあり、本研究によってSrcによるがん化メカニズムについてその詳細を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、これまでモデル系で行ってきたCbpのSrcによるがん化に対する抑制メカニズムから重要性が示唆されたラフト自体の機能をさらに詳細に解析するとともに、モデル系を用いて見出されたSrcによるがん化に伴って変動するマイクロRNAについて標的分子を解明し新たなSrcシグナルを明らかにすることを目的として以下の研究を行った。

- 1) モデル細胞におけるがん形質とラフトの量的・質的变化を調べる。
- 2) ヒトがん細胞におけるラフトの役割を明らかにする。
- 3) マイクロRNAの標的遺伝子候補の同定
- 4) マイクロRNA標的分子のSrcによるがん形質発現における役割を明らかにする。
- 5) ヒトがん細胞におけるSrcの活性化とマイクロRNA量の相関を調べる。
- 6) SrcによるマイクロRNAの発現制御機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究において、がん形質に伴ったラフトの量的・質的变化を調べたところ、ラフトの主成分であるコレステロールやスフィンゴ脂質の組成の変化とそれらの合成や代謝に関わる遺伝子の発現が変動していることを見出した。さらにそれらの合成や代謝に関わる

遺伝子の発現変動や薬剤処理によりラフト領域の量的・質的变化を誘導することでがん形質が制御されることを見出した。

また一方で、Src によるがん形質と発現の減少が相関するいくつかのマイクロ RNA を同定した。中でも、ヒトの様々な癌腫で発現減少の見られる miR-99a が Src によるがん化やヌードマウスにおける腫瘍形成を顕著に抑制することを見出した。miR-99a の作用メカニズムを解析した結果、miR-99a は mTOR や FGFR3 を標的遺伝子としその発現を抑制することで下流のがん化シグナルを遮断し、がん形質を抑制することを明らかにした。また Src の活性が高いヒト肺癌細胞において miR-99a の発現が低下しており、ヒト肺癌由来上皮細胞株に miR-99a を導入すると腫瘍形成が抑制されることを見出した。さらに Src による腫瘍形成だけでなく細胞の形態形成に作用する miR-542-3p についてもインテグリン結合キナーゼ ILK 遺伝子の発現を制御することでがん悪性化シグナルを抑制し、細胞接着斑の形成の破綻を引き起こすことでがん細胞の基質への接着や浸潤能などがん悪性化を抑制することを明らかとした。

これらの研究により、Src によるがん形質発現における新たなシグナルのリンクを明らかにすることができた。本研究の知見をもとに、Src シグナルをラフトによる蛋白質の細胞内局在制御あるいはマイクロ RNA による発現制御により制御する方法が見出されれば、今後新たながんの予防や治療法への発展が期待できる。

#### 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 9 件)

1. \*Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, Okada M. MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase is crucial for Src-induced tumor progression. *Oncogene*, 31(13), 1623-1635, (2012) doi: 10.1038/onc.2011.367 (査読有り)

\*corresponding author

2. Takahashi Y, Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Oneyama C, Okada M. The late endosome/lysosome-anchored p18-mTORC1 pathway controls terminal maturation of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(4):1151-7, (2012) DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.03.031 (査読有り)

3. Yamagata K, Li X, Ikegaki S, Oneyama C, Okada M, Nishita M, Minami Y. Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP-13) expression. *J Biol Chem*, 287(2):1588-99. (2012) doi: 10.1074/jbc.M111.315127 (査読有り)

4. \*Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, Morii E, Okumura M, Aozasa K, Okada M. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene*, 30(32), 3489-3501, (2011) doi: 10.1038/onc.2011.63 (査読有り)

\*corresponding author

5. Kuroiwa M, Oneyama C, Nada S, Okada M. A guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in c-Src-induced podosome formation. *J Cell Sci*, 124, 1726-1738, (2011) doi: 10.1242/jcs.080291 (査読有り)

6. Suzuki K, Oneyama C, Kimura H, Tajima S, Okada M. Downregulation of the tumor suppressor Cbp/PAG1 is mediated by epigenetic histone modifications via the MAPK/PI3K pathway. *J Biol Chem*, 286(18):15698-706, (2011) doi: 10.1074/jbc.M110.195362 (査読有り)

7. Kanou T, Oneyama C, Kawahara K, Okimura A, Ohta M, Ikeda N, Shintani Y, Okumura M, Okada M. The transmembrane adaptor Cbp/PAG1 controls the malignant potential of human non-small cell lung cancers that have c-src upregulation. *Mol Cancer Res*, 9(1), 103-114 (2011) doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0340 (査読有り)

8. Hikita T, Oneyama C, Okada M. Purvalanol A, a CDK inhibitor, effectively suppresses Src-mediated transformation by inhibiting both

CDKs and c-Src. *Genes Cells*, 15(10), 1051-1062 (2010) doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01439.x (査読有り)

9. Mukai E, Fujimoto S, Sato H, **Oneyama C**, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N. Exendin-4 suppresses SRC activity and reactive oxygen species production in diabetic Goto-Kakizaki rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes*, 60(1), 218-226 (2010) doi: 10.2337/db10-0021 (査読有り)

[学会発表] (計 15 件)  
(招待講演)

1. **小根山千歳** 「Src によるがん形質発現メカニズムの再考-マイクロ RNA を介したシグナル制御」 北海道大学大学院医学研究科 札幌 2011.11.4

2. **小根山千歳** 「がん細胞正常化を目指して-細胞内シグナルのリチューニング」 大分統計談話会 大分 2011.10.13

3. **小根山千歳** 「マイクロ RNA による Src がん形質発現の制御機構」 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 岡山 2011.7.15

4. **小根山千歳** 「Src によるがん形質発現メカニズム」 第 12 回守田科学研究奨励賞受賞記念講演 東京 大学女性協会 2010.6.5

(通常発表)

5. 安藤雄哉、梶原健太郎、小根山千歳、岡田雅人「スフィンゴミエリン分解酵素 nSMase2 によるがん形質発現制御機構の解析」 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011. 12.16

6. 鬼頭頼子、岡田雅人、**小根山千歳** 「microRNA による Src がん化抑制機構の解析」 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011. 12.16

7. 若林菜穂子、森井英一、奥崎大介、高橋佑介、池田純一郎、岡田雅人、**小根山千歳** 「microRNA による Src がん悪性化の制御機構の解析」 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011.

12.16

8. 梶原健太郎、**小根山千歳**、今本文男、岡田雅人 「Metabolic alteration of lipid components in membrane microdomain by c-Src-induced transformation」 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011. 12.14

9. **小根山千歳**、森井英一、奥崎大介、高橋佑介、若林菜穂子、池田純一郎、青笹克之、岡田雅人 「MicroRNA controls c-Src-induced tumor progression」 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.4

10. **小根山千歳**、若林菜穂子、森井英一、奥崎大介、高橋佑介、池田純一郎、鬼頭頼子、浅井麗伊、岡田雅人 「miRNA による Src がん悪性化の制御機構」 第 3 回日本 RNAi 研究会 広島 2011. 8.26

11. **小根山千歳**、鈴木慶、池田純一郎、狩野孝、奥崎大介、鬼頭頼子、若林菜穂子、森井英一、青笹克之、岡田雅人 「miRNA による Src がん形質発現の抑制機構」 BMB2010 神戸 2010. 12. 9

12. **小根山千歳**、池田純一郎、鈴木慶、狩野孝、奥崎大介、森井英一、野島博、青笹克之、岡田雅人 「MicroRNA involvement c-Src-induced transformation」 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪 2010.9.23

13. **小根山千歳**、鈴木慶、池田純一郎、狩野孝、奥崎大介、森井英一、青笹克之、岡田雅人 「Src によるがん形質発現の miRNA による調節機構」 第 2 回日本 RNAi 研究会 広島 2010. 8.28

14. **小根山千歳**、飯野琢也、疋田智也、岡田雅人 「Regulation of oncogenic potential of Src family kinases via membrane microdomain」 第 27 回内藤コンファレンス 札幌 2010. 6.30

15. **小根山千歳**、岡田雅人 「Src によるがん形質発現メカニズムの再考」 第 2 回シグナルネットワーク研究会 大阪 2010. 5.21

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: mTOR 阻害剤の投与が有効ながん患者

の選択方法

発明者：小根山千歳、岡田雅人、田村研治

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2011-218271

出願年月日：2011.9.30

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/oncogene/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小根山 千歳 (ONEYAMA CHITOSE)  
大阪大学・微生物病研究所・准教授  
研究者番号：90373208

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：