

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501271

研究課題名(和文) 14-3-3ファミリータンパク質が制御する癌細胞の悪性化メカニズムの全容解明

研究課題名(英文) 14-3-3beta-FBI1/Akirin2 complex promotes tumorigenicity and metastasis

研究代表者

田代 文夫(Tashiro, Fumio)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：70089332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：癌の悪性化に働くFBI1/Akirin2により下方制御される遺伝子として、BCAMとSPARCを同定し、癌抑制遺伝子として機能することを明らかにした。これらの結果より、FBI1/Akirin2は、癌抑制遺伝子の転写を抑制させることで、癌の悪性化に関与するというユニークな制御を行っていることが明らかとなった。さらに、マウスLLC1細胞においても、FBI1/Akirin2は、肺転移の促進など癌の悪性化に働くことから、普遍的な癌遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that 14-3-3beta protein promotes cell growth and tumorigenicity of rat K2 hepatocellular carcinoma cells. We identified FBI1/Akirin2 as a binding partner of 14-3-3beta and showed that the complex of these proteins promotes tumorigenicity and metastasis of K2 cells. Based on microarray expression analysis, BCAM and SPARC were identified as the downregulated target genes of the oncogenic 14-3-3beta-FBI1/Akirin2 complex. BCAM and SPARC are suppressive oncoprotein, and that FBI1/Akirin2 is involved in tumorigenicity and metastasis of hepatoma through the downregulation of suppressive oncogenes. Furthermore, we demonstrated that FBI1/Akirin2 performs an oncogenic function in LLC1 Lewis lung carcinoma cells. Although further investigation is required, these results suggest that FBI1/Akirin2 may perform an universal oncogenic function in various cancers.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん制御因子 14-3-3 FBI1/Akirin2

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞の実在が証明されるにつれ、癌転移や再発研究は新たな展開を迎えている。癌の転移には転移臓器で腫瘍を形成するための造腫瘍能と、基底膜への接着・浸潤および運動能の獲得と言った転移能が必要である。前者は癌幹細胞により、後者は上皮・間葉転換(EMT)により説明される。最近、我々は癌幹細胞を高い割合で保持するラット肝癌 K2 細胞でシグナル伝達因子 14-3-3 と、その新規結合因子 fourteen-three-three beta interactant 1 (FBI1)が、核内で転写抑制複合体を形成し、Ras/Raf/ERK シグナル伝達経路の時間的・空間的な制御を介して、造腫瘍能と転移能を促進することを明らかにした。Ras/Raf/ERK の活性化は幹細胞の自己複製能に関わると共に、EMT にも必須である。本研究成果は、癌転移および再発の全貌を明らかにするためにも重要な知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

癌の最大の脅威は悪性形質である浸潤・運動能の獲得による多臓器への転移や再発である。本研究においては、癌抑制タンパク質 p53 などにより発現が制御されるシグナル制御因子 14-3-3 ファミリーに属する 14-3-3 とその結合因子 FBI1/Akirin2 複合体による MAP キナーゼカスケードの異常な活性化を介した癌転移亢進メカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) FBI1 標的遺伝子の探索

K2 細胞を用い FBI1 発現抑制細胞株を樹立し、マイクロアレイ解析をおこなった。コントロール細胞株と比較し、FBI1 発現抑制細胞株で発現亢進している遺伝子を同定した。

(2) BCAM 安定発現細胞株の樹立と機能解析

FBI1 標的遺伝子として同定した BCAM の安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用い癌の悪性形質を比較した。

(3) BCAM プロモーター解析

ルシフェラーゼ遺伝子上流に BCAM プロモーター領域を挿入し、FBI1/Akirin2 による転写の制御をルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。さらに、BCAM プロモーター領域に 14-3-3 と FBI1 が結合するかを、クロマチン免疫沈降法により解析した。

(4) SPARC 安定発現細胞株の樹立と機能解析

FBI1 標的遺伝子として同定した SPARC の安

定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用い癌の悪性形質を比較した。

(5) SPARC プロモーター解析

ルシフェラーゼ遺伝子上流に SPARC プロモーター領域を挿入し、FBI1/Akirin2 による転写の制御をルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。さらに、SPARC プロモーター領域に 14-3-3 と FBI1 が結合するかを、クロマチン免疫沈降法により解析した。

(6) Lewis 肺癌細胞株 LLC1 細胞での FBI1 の機能解析

これまでの研究は、ラット肝癌 K2 細胞での解析であったが、様々な癌においても FBI1/Akirin2 が癌の悪性化に寄与するか明らかにするため、Lewis 肺癌細胞株である LLC1 細胞を用いて FBI1 発現抑制 LLC1 細胞株を樹立し、FBI1/Akirin2 の機能を解析した。

(7) FBI1 の転移能の解析

FBI1 発現抑制 LLC1 細胞株をヌードマウス皮下へ移植し、造腫瘍能を検討した。また、転移能を検討するため、尾静脈より FBI1 発現抑制 LLC1 細胞株を注入し、肺への転移能を解析した。

4. 研究成果

(1) マウス 23,000 遺伝子をマイクロアレイ解析した結果、FBI1 発現抑制 K2 細胞株で 2 倍以上発現亢進している遺伝子が 23 遺伝子得られた。それらの中で、BCAM と SPARC に着目し、癌への関与の解析を行った。

(2) BCAM が癌の悪性化にどのように働くか解析するため、BCAM 安定発現株を樹立した。BCAM 安定発現株は、足場非依存的増殖や運動能など癌の悪性化に寄与する性質が抑制されていることを明らかにした。さらに、NOD/SCID マウスへの移植実験により、造腫瘍能の抑制も確認された。これらの結果より、BCAM は癌抑制タンパク質として機能していることが示唆された。

(3) 14-3-3 と FBI1/Akirin2 複合体は、核内で転写抑制複合体を形成し、MAP キナーゼフォスファターゼである MKP-1 の発現を抑制し、Ras/Raf/ERK シグナル伝達経路を活性化させる。B-CAM 遺伝子の転写制御に、14-3-3 ・FBI1/Akirin2 複合体が影響を及ぼすか検討した。B-CAM プロモーターを取得し、ルシフェラーゼ活性を調べたところ、FBI1/Akirin2 の量依存的に B-CAM プロモーター活性の抑制が確認された。さらに、FBI1/Akirin2 が、B-CAM プロモーター上に結合することをクロマチン免疫沈降法により明らかにした。

以上の結果より、14-3-3 ・FBI1/Akirin2 複合体は、癌抑制タンパク質 BCAM の発現を抑制することで、腫瘍形成能と転移能を獲得

すること明らかとした。

(4) SPARC が癌の悪性化にどのように働くか解析するため、ラット肝癌 K2 細胞を用い SPARC 安定発現株と発現抑制株を樹立した。SPARC 安定発現株と発現抑制株ともに、足場依存的増殖能はコントロール細胞株と変わらなかった。しかし、足場非依存的増殖能は SPARC 安定発現株で有意にコロニー形成が抑制された。この結果より、ラット肝癌で SPARC は癌抑制タンパク質として機能していることが示唆された。

(5) SPARC 遺伝子の転写制御に、14-3-3 ・ FBI1/Akirin2 複合体が影響を及ぼすか検討した。SPARC プロモーターを取得し、ルシフェラーゼ活性を調べたところ、FBI1/Akirin2 の量依存的に SPARC プロモーター活性の抑制が確認された。さらに、FBI1/Akirin2 が、B-CAM プロモーター上に結合することをクロマチン免疫沈降法により明らかにした。

以上の結果より、14-3-3 ・ FBI1/Akirin2 複合体は、癌抑制タンパク質 SPARC の発現を抑制することで、腫瘍形成能と転移能を獲得すること明らかとした。

(6) FBI1 発現抑制 LLC1 細胞株は、足場非依存的増殖能が抑制され、ERK のリン酸化が抑制された。これらの結果より、LLC1 細胞においても FBI1/Akirin2 は腫瘍促進能を有することが示された。

(7) LLC1 細胞は、肺への高い転移能を示すことが知られていることから、FBI1 発現抑制 LLC1 細胞株の転移能の影響を検討した。その結果、FBI1/Akirin2 発現抑制 LLC1 細胞株は、造腫瘍能の抑制および肺への転移能が抑制された。以上の結果より、14-3-3 ・ FBI1/Akirin2 複合体は、ラット肝癌 K2 細胞のみではなく、様々な癌細胞において腫瘍形成能と転移能の獲得に関与していることを明らかとした。

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 9 件)

Komiya Y, Akiyama H, Sakumoto R, Tashiro F, FBI1/Akirin2 promotes tumorigenicity and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 444(3), 2014, 382-386. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.064.
Akiyama H, Iwahana Y, Suda M, Yoshimura A, Kogai H, Nagashima A, Ohtsuka H, Komiya Y, Tashiro F, The FBI1/Akirin2 target gene, BCAM, acts as a suppressive oncogene., *PLoS One*,

査読有, 8(11), 2013, e78716, 10.1371/journal.pone.0078716.
Suda M, Kamoshida H, Hayashi T, Ogawa M, Ohtsuka H, Murakama S, Yuko Komiya Y, Murakama Y, Akiyama H, Tashiro F, Involvement of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) downregulation in malignant conversion of aflatoxin B₁-induced rat hepatocellular carcinoma K2 cells., *Mycotoxins*, 63(2), 2013, 151-159, doi: 10.2520/myco.63.151
Murakami S, Chishima S, Uemoto H, Sakamoto E, Sato T, Kurabe N, Kawasaki Y, Shibata T, Akiyama H, Tashiro F, The male-specific factor Sry harbors oncogenic function., *Oncogene*, 2013, doi: 10.1038/onc.2013.262
Yamada T, Urano-Tashiro Y, Hashi Y, Sakumoto M, Akiyama H, Tashiro F, The U-box-type ubiquitin ligase PRP19 regulates astrocyte differentiation via ubiquitination of PTP1B., 1 1524, 2013, 12-25, doi: 10.1016/j.brainres.2013.06.007.
Atsumi Y, Inase A, Osawa T, Sugihara E, Sakasai R, Fujimori H, Teraoka H, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Nakagama H, Masutani M, Yoshioka K, The Arf/p53 protein module, which induces apoptosis, down-regulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs., *J. Biol. Chem.*, 288(19), 2013, 13269-13277. doi: 10.1074/jbc.M112.402560.
Yamada T, Urano-Tashiro Y, Tanaka S, Akiyama H, Tashiro F, Involvement of crosstalk between Oct4 and Meis1a in neural cell fate decision., *PLoS One*, 8(2), 2013, e56997, doi: 10.1371/journal.pone.0056997.
Osawa T, Atsumi Y, Sugihara E, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Masutani M, Yoshioka K, Arf and p53 act as guardians of a quiescent cellular state by protecting against immortalization of cells with stable genomes., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 432(1), 2013, 34-39. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.091.
Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R., Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein., *J. Biol. Chem.* 286(20), 2011, 18251-18260.

doi: 10.1074/jbc.M110.208587.

〔学会発表〕(計 15 件)

永島 愛, 橋本 理那, 秋山 弘匡, 田代 文夫, FBI1 による癌幹細胞様特性獲得機構の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

日笠 里映, 村上 重和, 二宮 航, 茂木 南士, 秋山 弘匡, 田代 文夫, Bcas2 の異常な発現は中心体の複製を介して染色体不安定性の引き金となる、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

村上 重和, 坂本 依里奈, 二宮 航, 茂木 南士, 日笠 里映, 柴田 龍弘, 秋山 弘匡, 田代 文夫, 肝がんにおける雄性特異的因子 Sry のがん促進機能の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

小野 孝英, 大塚 寛子, 前田 貴央, 戸松 誠, 秋山 弘匡, 田代 文夫, 癌細胞選択的毒性を有するタラノ芽由来 aralin 受容体 HDLBP の同定とその機能的プロセッシング機構の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

山田 健之, 田代 有美子, 田中 沙織, 秋山 弘匡, 田代 文夫, 神経細胞の運命決定時における Oct4 と Meis1a の相互作用、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

坂本依里奈, 村上重和, 上元寿人, 加藤康平, 茂木南士, 二宮航, 日笠里英, 柴田龍弘, 秋山弘匡, 田代文夫, ヒト肝癌細胞において性決定因子 SRY は stemness factors の転写制御を介して癌幹細胞の性質を維持する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡

村上重和, 上元寿人, 坂本依里奈, 加藤康平, 茂木南士, 二宮航, 日笠里英, 柴田龍弘, 秋山弘匡, 田代文夫, 前立腺がんの悪性化過程における SRY の新たな機能、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡

小野孝英, 大塚寛子, 秋山弘匡, 戸松誠, 飯田直幸, 服部成介, 田代文夫, 癌細胞選択的毒性を有するタラノ芽由来 aralin 受容体 HDLBP の同定とその機能的プロセッシング機構、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡

清田政宏, 須藤祐人, 秋山弘匡, 田代文夫, ヒト肝癌における癌幹細胞形質獲得に関わる CD133 の機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡

Hirotsada Akiyama, Shigekazu Murakami, Fumio Tashiro, The 14-3-3 beta/FBI1

complex target gene, SPARC acts as a suppressive oncogene, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌

Shigekazu Murakami, Hirotsada Akiyama, Fumio Tashiro, Ectopic BCAS2 expression causes abnormal amplification of centrosome, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌

Hiroko Otsuka, Hirotsada Akiyama, Yoshitaka Gotou, Makoto Tomatsu, Takashi Komeno, Naoyuki Iida, Seisuke Hattori, Yasushi Kawasaki, Fumio Tashiro, Analysis of membrane receptor of aralin, a cancer-selective cytotoxic protein from aralin elata, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜
Shigekazu Murakami, Satomi Chishima, Hisato Uemoto, Erina Sakamoto, Tatsuhiko Shibata, Hirotsada Akiyama, Fumio Tashiro, Possible involvement of SRY in occurrence of cancer stem cells, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜

Akiyama Hirotsada, Murakami Shigekazu, Tashiro Fumio, FBI1/Akirin2 target genes, SPARC and B-CAM, are suppressive oncogenes, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋

Hirotsada Akiyama, Akito Hattori, Shogo Hayashi, Kohei Soga, Fumio Tashiro, Establishment of the highly sensitive detection method of cancer cells under near infrared excitation, and its possible application for cancer therapy, International Symposium on Technologies against Cancer (ISTC2011), 2011 年 9 月 1-2 日, 江戸川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/lab/tasiro.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 文夫 (TASHIRO Fumio)
東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授
研究者番号：70089332

(2) 研究分担者

秋山 弘匡 (AKIYAMA Hirotada)
東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教
研究者番号：40400254

(3) 連携研究者

()

研究者番号：