

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34535

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590695

研究課題名(和文)新規タンパク質Cablesが関与する抗腫瘍メカニズム

研究課題名(英文)Anti-tumor mechanism of novel protein Cables.

研究代表者

坂本 秀生 (Hideo, Sakamoto)

神戸常盤大学・保健科学部・教授

研究者番号：30225817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円、(間接経費) 1,350,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCablesは細胞自己死(アポトーシス)を誘発すると仮説を立て、異なる卵巣腫瘍由来細胞のJHOS-2, OVK18, HSKTCを用いて、発現量調整の機序解明を試みた。外部からのcAMPやPMAで変化無かったが、細胞内でcAMPを増加させるForskolinではHSKTCでのみ発現量が上がり、細胞内cAMP増加がアポトーシス誘発に関与することを示唆した。また、この現象はHSKTCのみであり、細胞によって機序が異なる事を示した。Cables遺伝子を導入すると、アポトーシスを示すカスパーゼ3/7活性が遺伝子量依存的に増え、Cablesがアポトーシスを誘発していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There was no significant promoter activity stimulation by cAMP and PMA in any of three cell lines. However in HSKTC, cAMP increased Cables promoter activity about two fold higher than control and Forskolin increased Cables promoter activity about five fold higher than control. Forskolin is known to stimulate intracellular accumulation of cAMP and this in turn may be the cause of stimulation of Cables promoter activity in response to Forskolin in the HSKTC. These experiments suggest that Cables promoter regulation mechanism depends on the cell type and may be dictated by differences in underlying epigenetic modulation of the Cables promoter. Ovarian carcinoma is difficult to detect by clinical laboratory test and often develops chemoresistance. Future experiments will continue to define the regulation of Cables 1 promoter, which may help predict better treatment or early diagnostics of ovarian carcinoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学 Cables 腫瘍抑制効果 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

ヒト Cables のクローニングは多くの研究者が試み困難を極めたが、坂本は完全長ヒト Cables のクローニングに成功し報告した。(Sakamoto et al, Cancer Biol Ther.2008)

これまでに子宮内膜がん、卵巣がん、大腸がんを対象に、Cables 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、いずれでも Cables の発現低下を高頻度に認めた。Cables 発現が低下する原因として、18 番染色体で Cables が位置する部分にて対立遺伝子の不安定性があった事、Cables のプロモーター部位が高頻度にメチル化している事を報告した。

がん組織にて Cables 発現が低下していること、その後の研究にて Cables はアポトーシスを誘導することから、Cables はがん抑制を発揮する機能があると推察される。

上記のように Cables が抗がん作用を有することは強く示唆されるが、実際にその機能は明確にされておらず、本研究でその機序の一端を明らかにするに至った。

2. 研究の目的

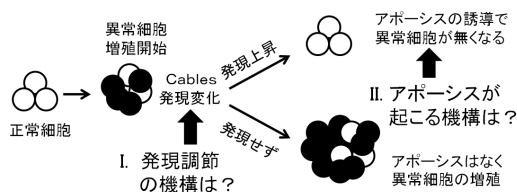
「がん部位で Cables 発現が抑制していた」事実と、「Cables がアポトーシスを誘導する」との二点から、Cables にがん抑制作用があると仮説を立てた。すなわち細胞がん化への過程で、Cables 発現が上昇してアポトーシスを誘導し、暴走化する細胞をなくす作用である。

この仮説を証明し、Cables の発現機序とアポトーシスの関係を解析することで、Cables が持つがん抑制作用の機序を明らかにすることを目的とした。

腫瘍の中でも特に卵巣がんは早期発見が困難なことから、本研究を通じて卵巣がん早期発見法に繋げられる、腫瘍検査学への寄与も大きな目的とした。

3. 研究の方法

Cables の持つがん抑制化機能を明らかにするため、Cables 発現調節機序の解明、Cables が関与するアポトーシス機序の解明と大きく二つに区分して研究を遂行した。



培養細胞

細胞バンクより、株化された卵巣癌由来細胞の JHOS-2 細胞および OVK18 細胞、転移性卵巣腺癌である Krukenberg 腫瘍細胞由来の HSKTC 細胞を入手し用いた。

Cables 発現調節機序の解明

Cables 発現は子宮内膜にて性周期に沿って増減が確認され、エストロゲン優位な時期

は低く、プロゲステロンの上昇期には多いことを確認している。しかし、性周期依存的な発現変動に関する知見は未解明である。そこで、性ホルモンが関与する Cables プロモーター調整の基本的機構を明らかにする。

Cables プロモーター活性の変動

JHOS-2, OVK18, HSKTC それぞれの細胞に、Cables 転写開始点より上流 1k、1.5k、2k bp の Cables プロモーター領域を有すレポーターベクターを導入し、レポーター活性を確認したところ、いずれの細胞でも 2k bp のプロモーター領域を導入した場合に活性上昇を確認し、以後の実験では 2k bp のプロモーター領域を有すレポーターベクターを用いて実験を行った。

ついで Cables プロモーターの活性への影響を確認するため、プロテインキナーゼ C(PKC) を特異的に活性化する Phorbol12-Myristate13-acetate (PMA)。プロテインキナーゼ A(PKA)の活性化である cyclic AMP (cAMP)、細胞外から PKA を活性化し、細胞内 cAMP を上昇する Forskolin にて細胞を 48 時間刺激し、Cables プロモーターの変化から、発現調節機構の解明を行った。

Cables 発現タンパクの確認

Cables のアミノ酸 307 - 323 残基と 616 - 633 残基を認識する抗体を二種類作成し、Cables 発現タンパクをウエスタンブロット法で確認した。

Cables が誘導するアポトーシス

1 つの mRNA から 2 つの遺伝子の発現可能な内部リボソーム導入部位 (internal ribosomal entry site, IRES) を持つ発現ベクターを用い、Cables 遺伝子と同時に Red Fluorescence Protein (RFP) 発現するプラスミドを細胞に導入して人為的に Cables を発現させた。導入プラスミドの増加を RFP の赤色蛍光で目視し、Cables 量依存的にアポトーシスを誘導するか確認した。

アポトーシスの確認

DNA ラダーの確認とアポトーシス実行カスパーゼであるカスパーゼ-3、-6 を測定し、定量化した。

4. 研究成果

Cables 発現調節機序の解明

培養細胞を用いた結果では、PMA によるプロテインキナーゼ C(PKC)活性化によるレポーター活性への影響は無かった。このことよりこれら三種の細胞内では Cables プロモーター調整に PKC 経路の調整機構は関与しないと思われる。

その一方で、プロテインキナーゼ A(PKA)経路の調整が示唆された。OVK18 及び JHOS-2 ではいずれの刺激剤でも刺激剤による変化が無かったが、HSKTC 細胞では

cAMP の刺激で活性が約 3 倍、Forskolin では約 5 倍上昇するとの興味深い結果となった。以下に刺激剤による活性の変動を分かりやすくするため、コントロールの値を 1 として刺激剤により変化した比率で表した(図 1)。

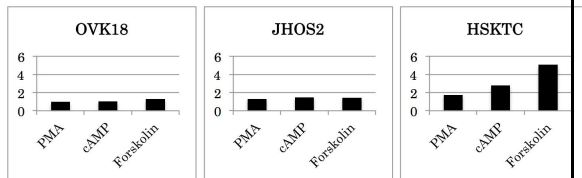


図 1. Cables プロモーター非活性

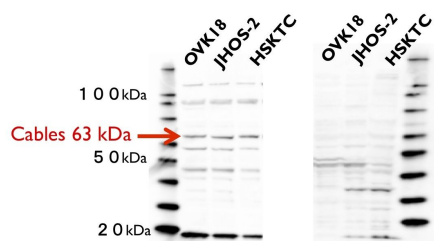
Forskolin は冒頭で述べたように、cAMP を増やす作用を有している。この Forskolin の刺激による細胞内で上昇した cAMP がセカンドメッセンジャーとして、細胞内シグナル伝達によってプロモーター領域に作用した結果、レポーター活性が上昇したと考えられる。水溶性の cAMP は脂質二重構造を形成している細胞膜の透過性が低いため、培養液中に cAMP を直接投与しても細胞内には入っていないと思われる。このことが cAMP 単独で刺激した際の活性上昇が、Forskolin の刺激による内在性 cAMP 上昇によるレポーター活性上昇より明らかに低い原因と思われる。事実、cAMP と同様の作用を示す水溶性がある cAMP アナログの Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) を培養液に投与すると、レポーター活性が上昇した。

Cables プロモーターの調整に cAMP が関与し、プロテインキナーゼ A (PKA) 経路が関与していることが今回の研究で示唆することが出来た。

今回の実験でレポーター活性が変化した細胞は HSKTC だけあった。この現象から HSKTC 細胞内には Cables プロモーター活性を調整できる何らかの因子が存在し、その因子が Cables 発現を上げて細胞周期を抑制し、結果的に細胞増殖速度を抑えている可能性がある。

Cables 発現タンパクの確認

Cables のアミノ酸 307 - 323 残基と 616 633 残基を認識する抗体を二種類作成し、Cables 発現タンパクをウエスタンブロット法で確認したところ、Cables アミノ酸残基 616 633 残基を認識する抗体で Cables タンパクを確認出来た(図 2)。



Cables 認識領域 616-633 残基 307-323 残基

図 2. ウエスタンブロット法による Cables

タンパクの確認

Cables が誘導するアポトーシス

IRES 配列を有し Cables 遺伝子と同時に RFP を発現するプラスミドベクターを用い、Cables 発現とアポトーシスへの影響を観察した。OVK-18 細胞内へ Cables 遺伝子を導入してから 1 日目、2 日目、3 日目の細胞を顕微鏡で目視すると遺伝子導入した細胞で赤い蛍光がプラスミド量依存的に確認でき、ウエスタンブロット法でも Cables タンパクの増強を確認した。

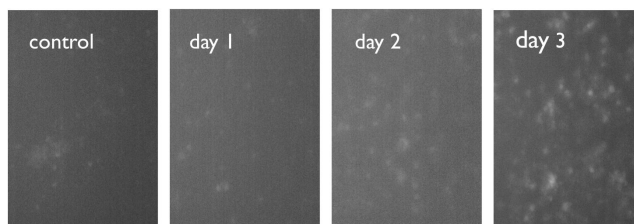


図 3. RFP による遺伝子導入の確認

Cables タンパク量の確認

Cables 発現プラスミド導入 7 2 時間後に細胞を Lysate バッファーにて収集し、Cables アミノ酸 616 633 残基を認識する抗体でタンパク発現量の確認を行い、プラスミド量依存的にバンドの増強を確認した(図 4)。



図 4. ウエスタンブロット法による Cables タンパクの確認

アポトーシスの確認

Cables 発現プラスミド導入 7 2 時間後に付着細胞及び浮遊細胞も収集し、DNA を生成して電気泳動を行った結果、プラスミド量が最も多く導入した細胞でラダー状 DNA を確認した(図 5)。

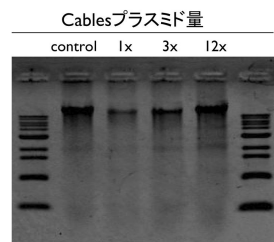


図 5. DNA ラダーの確認

Cables 量依存的なアポトーシスの確認

Cables 量依存的にアポトーシスが誘発されている傾向があった。それを確認するため、アポトーシス実行カスパーゼであるカスパーゼ-3、-6 を測定し定量化し、コントロールの値を 1 として増加比率で表した(図 6)。

その結果 Cables 遺伝子導入量依存的に、アポトーシスを示すカスパーゼ 3/7 活性が上昇し、Cables がアポトーシスを誘発していることを明らかにした。

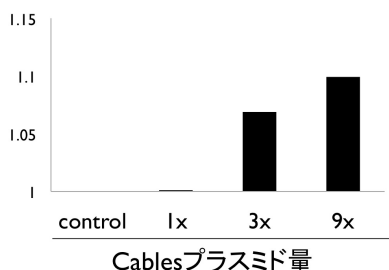


図 6. Cables 量依存的カスパーゼ活性の変化

考察

Cables プロモーターの調整に cAMP が関与し、プロテインキナーゼ A (PKA) 経路が関与していることが今回の研究で示唆することが出来た。しかし cAMP の刺激経路は多数あり、どの経路を經由して Cables プロモーター調整を行なっているかが検討課題である。各種刺激により Cables レポーター活性が変化した細胞は HSKTC 細胞だけであった。この現象から HSKTC 細胞内には Cables プロモーター活性を調整できる何らかの因子が存在し、その因子が Cables 発現を上げて細胞周期を抑制し、結果的に細胞増殖速度を抑えている可能性がある。また、HSKTC 細胞は転移性卵巣腺癌である Krukenberg 腫瘍細胞由来であることから、がん細胞の転移に Cables が関与している可能性を示唆する。

アポトーシスの実行カスパーゼ 3/7 活性が Cables 量依存的に上昇し、Cables がアポトーシスを誘発していることを明らかにした。Cables が単独でアポトーシスに関わっている可能性は低く、p53 を代表とするようなガン抑制遺伝子との関連も含め、今後の研究にさらなる必要である。

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 7 件)

1. 坂本秀生, 海外における POCT の現状と検査技師の役割, Medical Technology 39(4) 345-347. 2011.
2. 坂本秀生, 他 12 名, 東日本大震災対策委員会における活動報告: 臨床病理 59(12) 1144-1153. 2011
3. 坂本秀生. アメリカ合衆国における臨床検査技師教育制度と国際資格. 臨床化学. 41(1), 8-9. 2012.
4. 坂本秀生. POCT を用いた移動型健康管理の可能性. 医療と検査機器・試薬, 35(2) 159-162, 2012.
5. 坂本秀生. 東日本大震災における臨床検査の役割. 医学のあゆみ, 242(12) 963-965, 2012.

6. 坂本秀生. 海外における臨床検査技師の資格制度. Modern Media, 58(12) 359-364. 2012.

〔国際学会発表〕(計 6 件)

1. Sakamoto H. Experience of Lab Professionals in the Japan Earthquake/Tsunami. 2011 ASCP Annual Meeting/WASPaLM XXVI World Congress, Las Vegas, NV USA, October 20, 2011.
2. Sakamoto H. and Shimetani N. Model of the Laboratory Medicine Relief Coordinator using POCT devices after huge disaster at Japan. AACC CPOCT 24th International Symposium. Prague, The Czech Republic. October 4, 2012.
3. Sakamoto H. and Hata K. Introduce the Mobile Health Check system to home healthcare using POCT devices in Japan. Boston, USA November 3, 2012.
4. Sakamoto H., Lynch MP and Rueda BR. Promoter of Cables 1, a cyclin-dependent kinase binding protein affected by cyclic AMP pathway. American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting 2013. Houston, TX USA. July 30, 2013
5. Sakamoto H., Hata K, Matsuda M, 他 12. POCT beyond the hospital as a preventive medicine model, using the Mobile Health Check system in Japan. 2013 ASCP Annual Meeting. Chicago, IL USA. September 19, 2013.
6. Sakamoto H and Hata K. Contribution of POCT to Home Health Care in Japan. 4th Congress of Asia Association of Medical Laboratory Scientists. Singapore, Singapore. October 4, 2013.