

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501327

研究課題名(和文) 活性変異型 Ras による細胞老化を克服するがん進展機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of cancer progression that overcome the cellular senescence by activated Ras

研究代表者

上北 尚正 (UEKITA, TAKAMASA)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工・その他部局等・准教授)

研究者番号：50373402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 活性型Rasは、正常細胞で細胞内空胞形成を介した細胞老化により抑制されるが、癌細胞では浸潤・転移等の癌進展に關する事が示唆されている。しかし、細胞老化を克服し癌が進展する機構の詳細は不明であった。

本研究により、CDCP1蛋白質が活性型Rasを介した細胞内空胞化を抑制し細胞死を抑制する事を発見した。また、CDCP1の発現亢進には活性型Ras-ERKシグナルが關与する事を明らかにした。さらに、CDCP1が細胞外基質分解酵素のMMP(MT1-MMP, MMP-2, 9)の制御にも關与する事を見出した。

これらの発見により、細胞老化を克服する癌進展にはCDCP1が重要である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In normal cells, the expression of activated Ras induces cell death by cellular senescence, but recent evidence indicates a role in cancer progression, including metastasis and invasion; however, the mechanism is still unknown.

In this study, we present in vitro evidence that CDCP1 might play an essential role in suppressing autophagy and cancer cell death by cellular senescence. Activated Ras induces CDCP1 expression through authentic Ras-ERK signaling pathway. Moreover, we found that CDCP1 induced by activated Ras controls cancer cell invasion through regulation of MMPs, such as MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9.

These results indicate that CDCP1 is an essential regulator of the cancer progression that overcome cell senescence.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Ras CDCP1 MMP Invasion Metastasis ERK Autophagy

## 1. 研究開始当初の背景

Ras は GTPase 活性をもつ膜結合型蛋白質で、種々のエフェクター分子を介した細胞の分化や増殖に関わるシグナルの制御に重要な役割を担う因子である。非小細胞肺癌や膵臓癌などの多くの癌で Ras 遺伝子の活性型変異が認められる事から、活性型 Ras は癌の発生・進展に寄与することが示唆されていた。その一方で、活性型 Ras により誘導される細胞老化では、細胞内空胞化を伴うオートファジーが関与する事が示唆されていた。正常細胞では、癌原遺伝子の活性化のようなストレスが生じた場合に細胞老化を引き起こす事により、癌化を抑制する機能が存在するが、癌化する細胞では、この機能の喪失もしくは抑制がかかると考えられていた。しかし、詳細に関しては未だ不明な点が多く存在していた。

申請者は、癌細胞の特性である足場非依存性に重要な役割を果たすと考えられる因子 CUB domain-containing protein 1 (CDCP1)の同定に成功し、様々な活性型 Ras を持つ癌における発現上昇を報告していた。さらに、CDCP1 が細胞内空胞化現象を抑制している事を示唆する結果を得ていた。よって、活性型 Ras による細胞老化を克服する癌細胞の進展機構に CDCP1 が関与している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

正常細胞は、活性型 Ras による癌化シグナルに対してオートファジー等を介して細胞老化を誘導し癌化を抑制するが、癌化した細胞では、その機能が喪失もしくは抑制されている。癌細胞における細胞老化抑制機構の解明は、活性型 Ras を介した難治癌をターゲットとした新規の治療法開発に有効であると考えられる。

本研究では、活性型 Ras を介した難治癌治療法開発の端緒となる可能性がある細胞老化克服による癌進展機構に CDCP1 を介した癌進展の制御機構がどのように関与しているかを解明する事を目的とした。

## 3. 研究方法

ドキシサイクリン(Dox)により活性型 Ras を誘導し細胞老化を抑制する正常不死化細胞株の系を樹立し、CDCP1 の発現量を検出すると共に、活性型 Ras を発現している癌細胞も追加する事により、プラスミド発現による蛋白質亢進および siRNA 法による蛋白質抑制による CDCP1 発現系を用いて CDCP1 シグナルの有無によるオートファジーを介した細胞老化を観察する。さらに、電子顕微鏡を用いて細胞内器官の構造上の変化を観察する。また、細胞老化による、細胞内空胞化により引き起こされる細胞死がどのタイプの細胞死であるか各々の細胞死に対応した抗体等で検出する。

CDCP1 の細胞における局在を各組織に対応する抗体と CDCP1 抗体による共染色し、共焦点顕微鏡で観察する。その際に CDCP1 と局在を共にする蛋白質について既存抗体を用いて検証をおこなう。また、共同在蛋白質が検出された場合は、その因子による CDCP1 との免疫沈降法を用いて結合の有無を確認し、CDCP1 を介した癌進展機構にそのように関与しているかを細胞運動能では Wound healing assay を浸潤能では Transwell assay を用いて検証する。

ドキシサイクリン(Dox)により活性型 Ras を誘導し細胞老化を抑制する正常不死化細胞株を繊維芽細胞とコラーゲンを共培養し生体内のコラーゲン組織を模したモデルの上で培養し、siRNA による CDCP1 発現抑制や関連因子の阻害剤等を用いて ex vivo における癌進展機構について検討をおこなう。その際には活性型 Ras と CDCP1 を介したシグナルが関連因子の制御に関わるかについても検討をおこなう。

## 4. 研究成果

ドキシサイクリン(Dox)により活性型 Ras を誘導し細胞老化を抑制する正常不死化細胞株の樹立に成功し、元株の不死化正常細胞株と比較して CDCP1 の蛋白質発現の上昇とリン酸化の亢進が確認された。さ

らに細胞老化耐性株に対して CDCP1 発現抑制をかけると、細胞老化耐性株は再度空胞化を引き起こし細胞死が起こる事を明らかにした。また、CDCP1 抑制を介したこの細胞老化による細胞死は切断された Caspase を認識する抗体に細胞サンプルが反応しなかったため、Caspase 依存型では無いことが明らかとなり、空胞化を介している事が示唆された（発表論文 1）。

活性型 Ras に誘導される CDCP1 は、Ras の下流因子である ERK シグナルを介していることが阻害剤による検討により明らかとなった（発表論文 4）。また、癌細胞において CDCP1 は脂質ラフトに存在する事を発見し、細胞外基質分解酵素である MT1-MMP と共局在する事及び免疫沈降法において共沈してくる事まで確認した。さらに、CDCP1 発現を siRNA 法により抑制すると、MT1-MMP が浸潤突起と呼ばれる癌浸潤に重要な装置へ輸送されなくなる事を発見し、蛍光ゼラチンによる基質分解解析では、浸潤突起における分解が抑制されている事が明らかとなった。よって、活性型 Ras が従来報告されていた初期の癌化のみならず、癌細胞の浸潤機構に寄与し、癌の進展にも重要な役割をしている事が明らかとなった（発表論文 2）。

コラーゲンと繊維芽細胞の共培養による ex vivo コラーゲン組織モデルによる実験では、Ras による CDCP1 の発現上昇は、細胞老化による細胞内空胞化現象を抑制するだけでなく、細胞外基質分解酵素群（MT1-MMP, MMP-2, MMP-9）の活性化制御および細胞外への輸送制御に重要な役割を果たしている事が明らかになった（発表論文 4）。

以上の結果から、活性型 Ras を発現する難治癌においては、CDCP1 発現が亢進し、よって細胞老化機構の一部である細胞内空胞化とそれを介した細胞死を抑制する事、

活性型 Ras により発現亢進した CDCP1 は脂質ラフトに局在し、細胞外基質分解酵素である MT1-MMP と結合する事によっ

て浸潤装置である浸潤突起へ MT1-MMP の輸送をおこなっている事、さらに CDCP1 は癌浸潤に重要な役割を果たしている MMP 群（MMP-2, MMP-9）の活性および輸送に関与して癌進展に関与している事を明らかにした。

今回は、細胞老化機構の関連因子に対する CDCP1 の影響については詳細な結果を得る事が出来なかった。研究結果による発表論文において示唆できる結果は、CDCP1-PKC $\delta$ -Tissue transglutaminase (TG2)を介したシグナルが細胞内空胞化の抑制に関与している事のみである。（発表論文 1）この件に関してはより良い分子標的薬剤開発のためにもさらなる研究が必要であると考えている。

今研究により、活性型 Ras による細胞老化克服機構の一端には CDCP1 が関与している事を明らかにするとともに、CDCP1 を標的とした分子標的治療が細胞老化を克服する活性型 Ras を介した難治癌の治療に有効である可能性を示した。

#### 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）

1. Uekita T., Fujii S., Miyazawa Y., Hashiguchi A., Abe H., Sakamoto M., Sakai R. Suppression of autophagy by CDCP1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Sci* 104, 865-870, 2013  
DOI: 10.1111/cas.12154  
（査読・有）
2. Miyazawa Y., Uekita T., Ito Y., Seiki M., Yamaguchi H., Sakai R. CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of

cancer cells.

Mol Cancer Res 11, 628-637, 2013

DOI:10.1158/1541-7786.MCR-12-0544

(査読・有)

3. Tomiyama A., Uekita T., Kamata R., Sasaki K., Takita J., Ohira M., Nakagawara A., Kitanaka C., Mori K., Yamaguchi H., Sakai R. Flottillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. Cancer Res 74, 3790-3801, 2014  
DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-0241  
(査読・有)
4. Uekita T., Fujii S., Miyazawa Y., Iwakawa R., Narisawa-Saito M., Nakashima K., Tsuta K., Tsuda H., Kiyono T., Yokota J., Sakai R. Oncogenic Ras/ERK signaling activates CDCP1 to promote tumor invasion and metastasis. Mol Cancer Res 12, 1449-1459, 2014  
DOI:10.1158/1541-7786.MCR-13-0587  
(査読・有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 上北尚正、堺隆一  
CDCP1 は Ras により発現誘導され、癌細胞の足場非依存性及び、浸潤・転移に関与する  
第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会  
2012 年 7 月 12 日～7 月 13 日 広島
2. 上北尚正、堺隆一  
Ras-ERK シグナルによる癌の転移能の亢進は CDCP1 発現誘導を介する  
第 71 回日本癌学会学術集会  
2012 年 9 月 19 日～9 月 21 日 札幌
3. Tomiyama A., Uekita T., Sakai R.  
Flottillin-1 is a novel ALK binding protein which regulates ALK signaling through receptor endocytosis

Advances in Neuroblastoma Research Conference 2012

2012 年 6 月 18 日～6 月 21 日 Tront, CA

4. 富山新太、上北尚正、堺隆一  
新規 ALK 結合蛋白質 Flottillin-1 は、endocytosis を介して ALK シグナルを制御する  
第 71 回日本癌学会学術集会  
2012 年 9 月 19 日～9 月 21 日 札幌
5. Sakai R. and Uekita T.  
Oncogenic Ras-ERK signaling requires activation of CDCP1 pathway for promotion of tumor metastasis  
9<sup>th</sup> AACR-JCA Joint Conference  
2013 年 2 月 21 日～2 月 25 日 Maui, USA
6. 富山新太、上北尚正、堺隆一  
ALK のネガティブレギュレーター FLOT1 の神経芽腫における役割  
第 19 回神経芽腫研究会  
2013 年 2 月 23 日 千葉
7. 上北尚正、堺隆一  
癌細胞の足場非依存性における CDCP1 シグナルを介した Autophagy 抑制の重要性  
第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会  
2013 年 7 月 11 日～7 月 12 日 長野
8. Uekita T. and Sakai R.  
CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells.  
The 7<sup>th</sup> Mechanisms and Models of cancer  
2013 年 8 月 7 日～8 月 11 日 La Jolla USA
9. 上北尚正、山口英樹、堺隆一  
CDCP1 は MT1-MMP の機能と浸潤突起を介した癌細胞の浸潤を抑制する  
第 72 回日本癌学会学術集会  
2013 年 10 月 3 日～10 月 5 日 横浜

10. 富山新太、上北尚正、山口英樹、堺隆一  
新規 ALK 結合蛋白質である  
Flottillin-1 は endocytosis を介して  
ALK シグナルを制御する  
第 72 回日本癌学会学術集会  
2013 年 10 月 3 日～10 月 5 日 横浜
11. 上北尚正、堺隆一  
Analysis of anchorage-independent  
growth signaling in small cell lung  
cancer (SCLC).  
第 23 回日本がん転移学会学術集会・総  
会  
2012 年 7 月 10 日～7 月 11 日 金沢
12. 上北尚正、堺隆一  
Oncogenic Ras-ERK signaling  
activates CDCP1 pathway to promote  
tumor invasion and metastasis.  
第 73 回日本癌学会学術集会  
2014 年 9 月 25 日～9 月 27 日 横浜
13. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメインは同種多量体  
形成によって癌細胞の運動能を促進す  
る  
第 37 回日本分子生物学会年会  
2014 年 11 月 25 日～11 月 27 日 横浜

## 5 . 研究組織

- (1) 研究代表者  
上北 尚正 (UEKITA TAKAMASA)  
防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・准教授  
研究者番号：50373402
- (2) 研究分担者  
該当者なし
- (3) 連携研究者  
山口英樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)  
国立がん研究センター・難治進行がん研究分野・ユニット長  
研究者番号：10345035