

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501361

研究課題名(和文) Srcファミリーキナーゼの悪性腫瘍進展での役割の解析と治療への応用

研究課題名(英文) Role of Src-family kinase in the progression of malignant tumor cells and its clinical implication

研究代表者

藤盛 好啓 (Fujimori, Yoshihiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229058

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)：Srcファミリーキナーゼ(SFK)の悪性腫瘍、特に悪性中皮腫における役割を解析した。中皮腫細胞NCI-H28はSFK阻害剤(PP2)によりアポトーシスが誘導された。Src, Yes, Fyn, Lynは、SFKのメンバーであり、中皮腫細胞に発現されていたが、FynはNCI-H28細胞で欠損していた。SFK阻害剤はLynを抑制し、Fynが抑制されている中皮腫にCaspase-8を介してアポトーシスを誘導した。Srcファミリーキナーゼは中皮腫細胞に発現されてその生存・増殖に係わっており、FynとLynを同時に阻害してアポトーシスを誘導できた。このことは中皮腫の新たな治療として応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is an aggressive tumor arising from mesothelial cells of serous membranes. We examined the role of Src family kinases (SFKs) in mesothelioma cells. We found that PP2, a selective SFK inhibitor, inhibited SFK activity and induced apoptosis mediated by caspase-8 in NCI-H28. Src, Yes, Fyn and Lyn protein, which are members of the SFK, were expressed in mesothelioma cell lines, while NCI-H28 cells were deficient in Fyn protein. PP2 reduced Lyn protein levels and suppressed SFK activity. Lyn siRNA induced apoptosis in Fyn-deficient NCI-H28 cells. Double RNAi knockdown of Fyn and Lyn induced apoptosis in Fyn-expressing NCI-H2052 and ACC-MESO-4 cells. Present study suggests that SFK inhibitors induce caspase-8-dependent apoptosis caused by reduction of Lyn protein in Fyn-deficient mesothelioma cells. This provides a new insight for treatment of mesothelioma by simultaneous inhibition of Fyn and Lyn.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：Srcファミリーキナーゼ 中皮腫 アポトーシス Fyn Lyn

### 1. 研究開始当初の背景

c-Src は発癌遺伝子として同定され、細胞の接着、遊走、増殖、生存等に重要な役割を担うことが知られている。悪性胸膜中皮腫は胸腔を覆う漿膜中皮に由来する悪性腫瘍であり、各種治療に抵抗性を示す予後不良の疾患である。中皮腫では、c-Src が活性化されているがその意義についてはまだ不明の部分が多い

### 2. 研究の目的

本研究では悪性腫瘍、特に悪性中皮腫、における Src ファミリーキナーゼ(SFK)の役割を解析し、SFK を標的とした腫瘍の新規治療を目指す。

### 3. 研究の方法

中皮細胞株 Met-5A および、中皮腫細胞株 NCI-H28、ACC-MESO-4、NCI-H2052、を用いた。各細胞の増殖、アポトーシス誘導に対する、Src ファミリーキナーゼ(SFK)阻害剤の影響を検討した。また、SFK 阻害剤の遺伝子発現に対する影響も調べた。さらに、siRNA により遺伝子発現の抑制を行いその影響も検討した。

### 4. 研究成果

(1) Src ファミリーキナーゼ(SFK)阻害剤(PP2)を添加すると、中皮腫細胞株 NCI-H28 の増殖が最も抑制された(図1)。

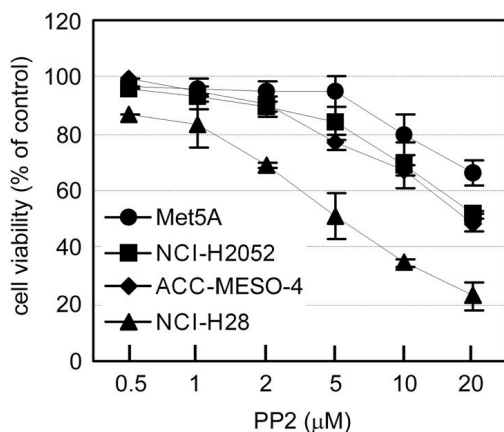


図1 SFK 阻害剤 PP2 の中皮腫細胞の生存に対する影響

(2) Src ファミリーキナーゼ(SFK)阻害剤(PP2)により NCI-H28 中皮腫細胞はアポトーシスを起こした(図2)。

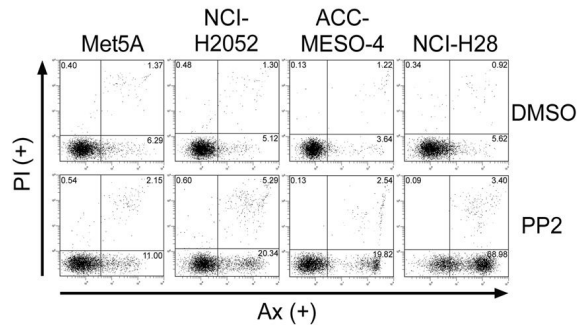


図2 SFK 阻害剤による中皮腫細胞のアポトーシス誘導

(3) NCI-H28 中皮腫細胞の PP2 によるアポトーシスは caspase-8 を介していた(図3)。

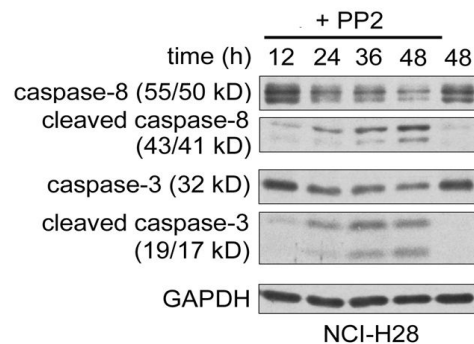


図3 SFK 阻害剤 PP2 の Caspase に対する影響

(4) Src ファミリーキナーゼには、Src、Yes、Fyn、Lyn があり、中皮腫細胞はこれらを発現していたが、NCI-H28 中皮腫細胞は、他の細胞と異なり Fyn を欠損していた(図4)

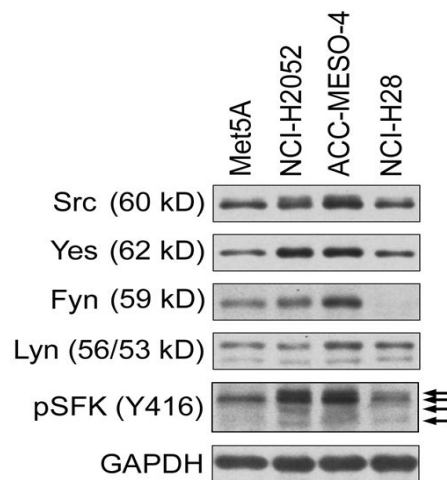


図4 中皮腫細胞の SFK の発現

(5) NCI-H28 中皮腫細胞は Fyn を欠損しているが、Src ファミリーキナーゼ阻害剤 PP2 を処理するとアポトーシスを起こし(前述)、同時に Lyn が抑制された (図 5)。

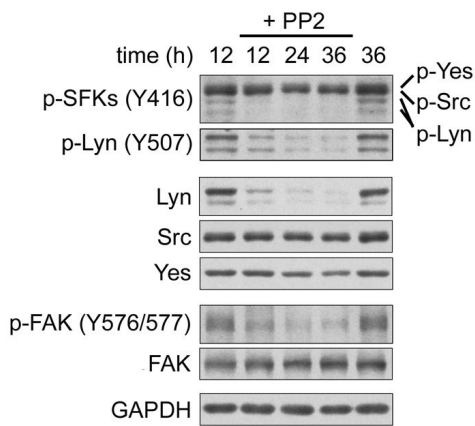


図 5 SFK 阻害剤 PP2 による SFK 発現の変化

(6) Fyn を欠損している NCI-H28 中皮腫細胞を siRNA で Lyn を抑制することにより、アポトーシスが誘導された(図 6)。

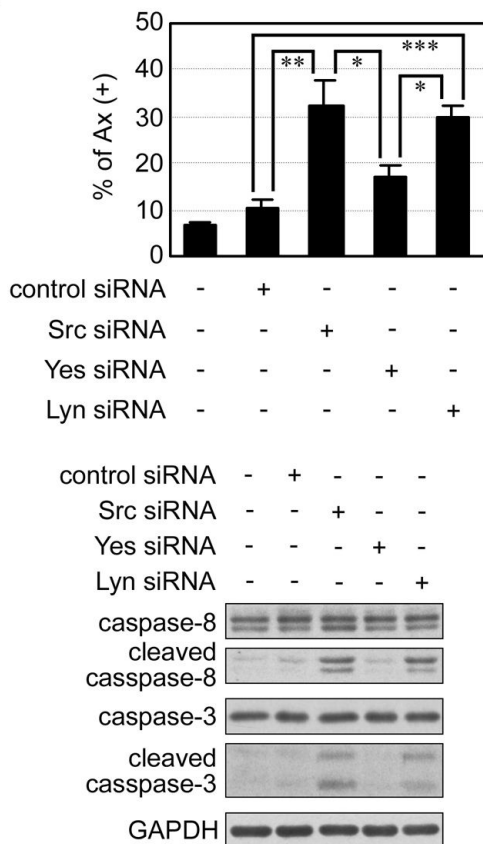


図 6 Lyn 阻害によるアポトーシス誘導

(7) 他の Src ファミリーキナーゼ阻害剤 dasatinib でも同様に NCI-H28 細胞に caspase-8 を介するアポトーシスを誘導できる(図 7)。

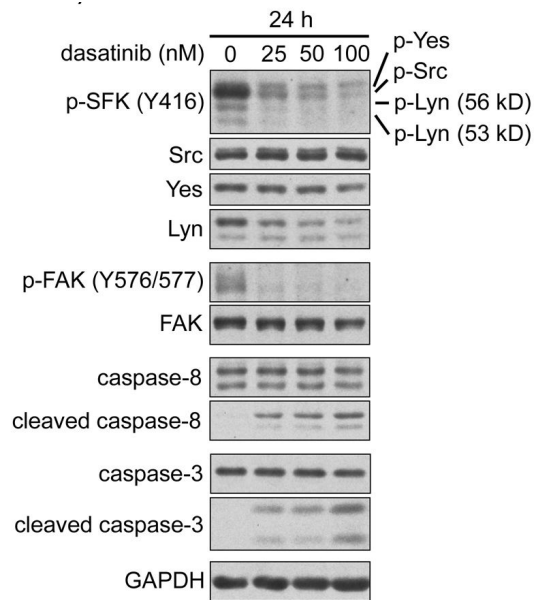


図 7 SFK 阻害剤 dasatinib による Caspase の変化

(8) Src ファミリーキナーゼ(SFK)阻害剤に低反応で Fyn を発現している中皮腫 NCI-H2052、および ACC-MESO-4 も siRNA で Fyn と Lyn を同時に抑制することによりアポトーシスを誘導できる(図 8)。

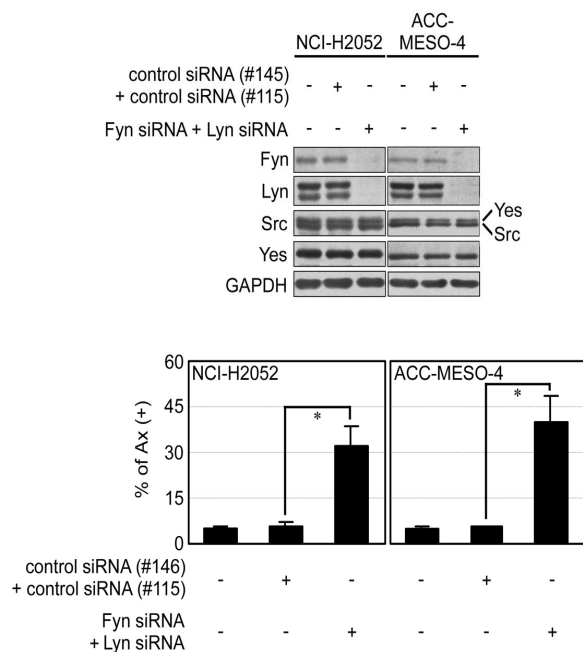


図 8 Lyn と Fyn 同時阻害によるアポトーシス誘導

以上により、Src ファミリーキナーゼ阻害剤は Fyn が抑制されている時、Lyn を抑制することにより中皮腫に caspase-8 を介してアポトーシスを誘導する事が判明した (Carcinogenesis. 2012; 33: 969-75)。

この様に Src ファミリーキナーゼは、中皮腫の生存・増殖に係わっており、Src ファミリーキナーゼ Fyn と Lyn を同時に阻害することにより、中皮腫にアポトーシスを誘導できる。このことは、中皮腫の新しい治療法として応用可能なことを示唆する。

#### 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 1 件)

- 1) Eguchi R, Kubo S, Takeda H, Ohta T, Tabata C, Ogawa H, Nakano T, Fujimori Y. Deficiency of Fyn protein is prerequisite for apoptosis induced by Src family kinase inhibitors in human mesothelioma cells. Carcinogenesis. 2012; 33: 969-75. (査読有, IF:5.334)

[学会発表](計 2 件)

- 1) 江口良二、田端千春、小川啓恭、中野孝司、藤盛好啓：ヒト中皮腫細胞において SFK 阻害はアノキス耐性を克服し、シスプラチンによるアポトーシスを促進する 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 ~ 5 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 2) 江口良二、藤盛好啓、小川啓恭  
Deficiency of Fyn Protein Is Prerequisite for Apoptosis Induced by Src Family Kinase Inhibitors in Human Mesothelioma Cells 第 21 回日本 Cell Death 学会、2012 年 7 月 27 ~ 28 日 名古屋大学(愛知県名古屋市)、

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

藤盛 好啓(FUJIMORI, YOSHIHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20229058

##### (2)研究分担者

江口 良二(EGUTI, RYOJI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00461088

久保 秀司 (KUBO, SYUJI)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10441320