

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791425

研究課題名(和文)大腸癌悪性化進展におけるJab1の役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of Jab1 in malignant progression of colon cancer

研究代表者

西本 新(NISHIMOTO, Arata)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90396325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌細胞の核抽出液を用いた免疫沈降によりJAB1とSTAT3との蛋白質間相互作用が認められた。次にSTAT3の活性に対するJAB1の影響を調べるため、RNAiによりJAB1の発現抑制を行った。ゲルシフトアッセイにより、STAT3の標的DNA結合能の減少が認められ、その標的遺伝子であるMDR1、NANOG、VEGFの発現量の減少も認められた。さらに、JAB1ノックダウンにより抗癌剤誘導性のアポトーシスが增強された。これらの結果は、ヒト大腸癌細胞において、蛋白質間相互作用を介してJAB1がSTAT3の標的DNAに対する結合を安定化させ、抗癌剤抵抗性の獲得に貢献していることを示している。

研究成果の概要(英文)：Immunoprecipitation using nuclear extract of human colon cancer cells revealed that JAB1 interacted with STAT3. To investigate the effect of JAB1 on STAT3 activity, RNAi studies were performed. JAB1 knockdown decreased STAT3 DNA-binding activity and the expression levels of MDR1, NANOG, and VEGF, which are STAT3 target genes. Furthermore, JAB1 knockdown increased anti-cancer drug-induced apoptosis. Taken together, these results suggest that JAB1 contributes to the acquisition of drug resistance by stabilizing STAT3 DNA-binding through protein-protein interaction in human colon cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：ヒト大腸癌細胞 JAB1 STAT3 蛋白質間相互作用 STAT3標的DNA結合能

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の抗癌剤抵抗性の獲得は、癌治療において大きな障壁となっているが、未だそれらを根本的に克服した治療法は確立されていない。そのため、抗癌剤抵抗性の獲得の分子メカニズムに基づいた新たな標的分子の同定が求められている。抗癌剤抵抗性の獲得に関わる遺伝子は多数存在するので治療標的としては適さず、それらの発現を制御する転写因子がより有効な治療標的である。これまでに抗癌剤抵抗性の獲得に深く関与する転写因子として STAT3, HIF-1 が報告されている。シスプラチン抵抗性胃癌細胞株 (SGC7901/cisplatin) では、STAT3, リン酸化 STAT3, 抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現レベルの増大が認められ、STAT3 の機能阻害によりシスプラチン抵抗性の減弱およびアポトーシスの亢進が認められた (Huang S et al, Cancer Lett, 2012, 315, 198-205)。また、ビンクリスチン抵抗性胃癌細胞株 (SGC7901/vincristine) では、HIF-1 の発現レベルの増大が認められ、親株である SGC7901 を低酸素環境下で培養すると HIF-1 とともに抗癌剤排出トランスポーターである MDR1, MRP1 の発現レベルの増大が認められた。さらに SGC7901/vincristine においてビンクリスチン処理 + HIF-1 ノックダウンにより MDR1, MRP1 の発現レベルの減弱が認められた (Liu L et al, Cancer Sci, 2008, 99, 121-128)。

本研究では、これまでの様々な報告や応募者がこれまでに行った研究成果 (Nishimoto A et al, Cancer Res, 2005, 65, 6701-6710. Nishimoto A et al, Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391, 1616-1622) に基づき、転写因子 STAT3 の標的 DNA 配列に対する結合を正に制御する候補分子として Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) に着目した。JAB1 は、c-Jun, myc, HAND2, brn-2 といった様々な転写因子と結合し、それらの標的 DNA 配列に対する結合や

転写誘導活性を高めることが報告されている (Shackleford TJ et al, Cell Div, 2010, 5:26)。さらに肝細胞癌細胞株 HepG2 において、STAT3 は c-Jun と結合することから、c-Jun を介して STAT3 と JAB1 が結合し、JAB1 が STAT3 の標的 DNA 配列に対する結合能を高めている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

大腸癌細胞における転写因子 STAT3 の活性制御および抗癌剤抵抗性獲得における JAB1 の役割を解明すること。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株を用いて、JAB1 と STAT3 の結合や JAB1 ノックダウン・過剰発現による STAT3 活性の変化、抗癌剤抵抗性の変化を検討する。また、核内の JAB1 の発現レベルと STAT3 活性との相関性の検討も行う。さらに、5-FU、ドキソルビシン耐性の大腸癌細胞株を用いて核内の JAB1 発現レベルと STAT3 活性との相関性を検討し、JAB1 ノックダウンによる STAT3 活性及び抗癌剤抵抗性の変化を検討する。さらに、手術切除された大腸癌症例を用いて核内の JAB1 発現レベルや STAT3 の発現・活性レベルを調べ、再発率、抗癌剤抵抗性との相関性を検討する。

4. 研究成果

ヒト大腸癌細胞株を用いて、JAB1 と STAT3 との蛋白質間相互作用や JAB1 ノックダウンによる STAT3 活性 (標的 DNA に対する結合能や標的遺伝子の発現量) の変化、さらに抗癌剤抵抗性の変化を検討した。まず、ヒト大腸癌細胞株の核抽出液を準備し、ウェスタンブロット法により核内における JAB1 および STAT3 蛋白質の発現を確認した (図 1)。リン酸化 STAT3 蛋白質の発現は認められなかった (図 1)。さらにその核抽出液を用いた免疫沈降により JAB1 と STAT3 との蛋白質間相互作用

用が認められた (図 2)。次に JAB1 に対する siRNA を用いて JAB1 の発現抑制を行い、ゲルシフトアッセイにより STAT3 の標的 DNA に対する結合能を検討したところ、STAT3 の標的 DNA 結合能の減少が認められた (図 3)。



図 1. 大腸癌細胞の核内・細胞質内における STAT3, リン酸化 STAT3, JAB1 蛋白質の検出

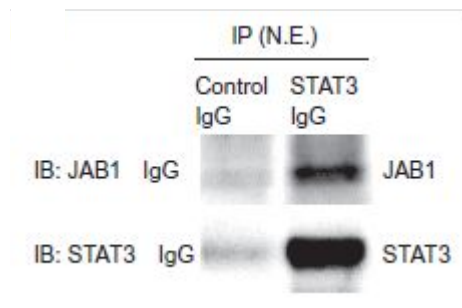


図 2. 核抽出物を用いた JAB1 と STAT3 との蛋白質間相互作用

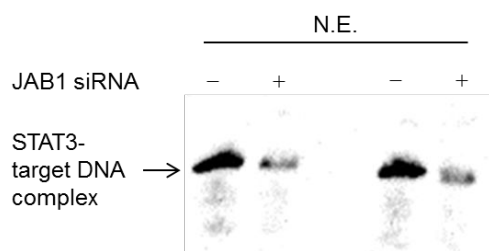


図 3. JAB1 ノックダウンによる STAT3 DNA 結合能の変化

STAT3 の標的遺伝子である *MDR1*, *NANOG*, *VEGF* の発現量の減少も認められた (図 4A-D)。

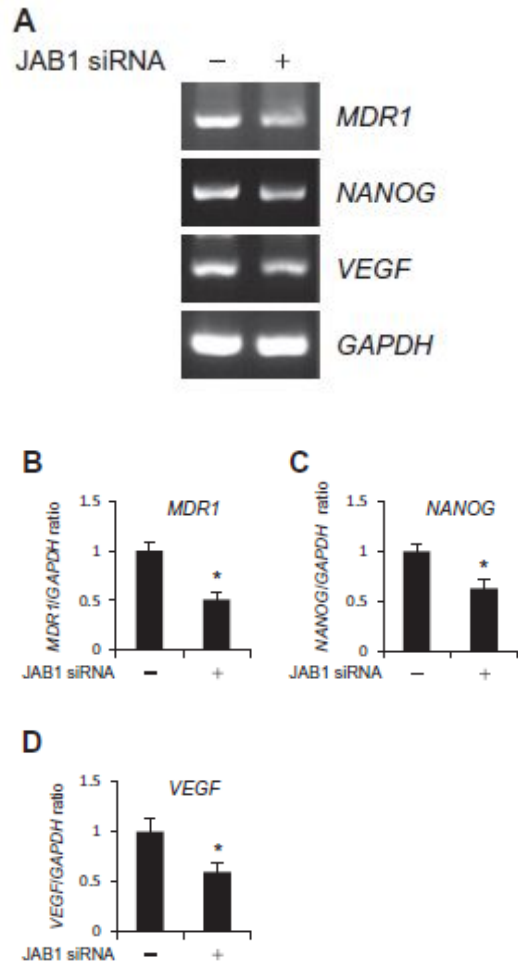


図 4. JAB1 ノックダウンによる STAT3 標的遺伝子の発現量の変化

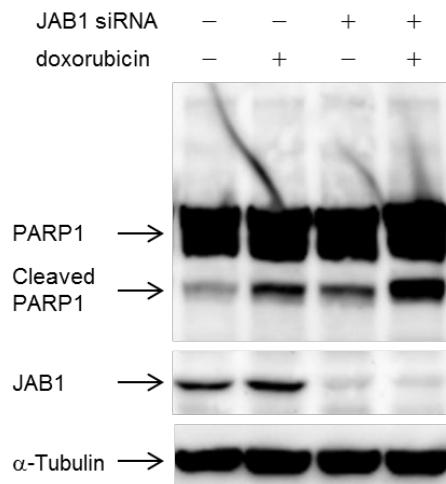


図 5. JAB1 ノックダウンによる抗癌剤誘導性アポトーシスの変化

さらに、抗癌剤誘導性のアポトーシスにおける JAB1 発現抑制の効果を検討したところ、JAB1 ノックダウンにより抗癌剤誘導性のアポトーシスが増大した (図 5)。

以上の結果より、核内において JAB1 は、STAT3 と結合し、STAT3 の標的 DNA に対する結合を安定化させることによって STAT3 標的遺伝子の発現を誘導し、抗癌剤抵抗性の獲得に貢献していることが示された。

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 5 件)

1. Nishimoto A, Kugimiya N, Hosoyama T, Enoki T, Li TS, Hamano K. Int J Oncol. 2014 ;44(6):2077-84. HIF-1 activation under glucose deprivation plays a central role in the acquisition of anti-apoptosis in human colon cancer cells. 査読有
2. Kudo T, Hosoyama T, Samura M, Katsura S, Nishimoto A, Kugimiya N, Fujii Y, Li TS, Hamano K. Biochem Biophys Res Commun. 2014 ;444(3):370-5. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. 査読有
3. Nishimoto A, Kugimiya N, Hosoyama T, Enoki T, Li TS, Hamano K. Biochem Biophys Res Commun. 2013 ;438(3):513-8. JAB1 regulates unphosphorylated STAT3 DNA-binding activity through protein-protein interaction in human colon cancer cells. 査読有
4. Suga A, Ueda K, Takemoto Y, Nishimoto A, Hosoyama T, Li TS, Hamano K. J Surg Res. 2013 ;183(1):84-90. Significant role of bone marrow-derived cells in compensatory regenerative lung growth. 査読有
5. Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Yamamoto Y, Nishimoto A, Mikamo A, Fujimoto M, Nakai A, Hamano

K. PLoS One. 2012;7(5):e37934. Heat shock factor 1 contributes to ischemia-induced angiogenesis by regulating the mobilization and recruitment of bone marrow stem/progenitor cells. 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. 西本 新, 釘宮成二, 村上順一, 上田和弘, 濱野公一 JAB1 は蛋白質間相互作用を介して STAT3 及び HIF-1 の標的 DNA への結合を安定化し抗アポトーシス活性を増強させる、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、横浜(パシフィコ横浜)
2. Arata Nishimoto, Naruji Kugimiya, Tohru Hosoyama, Tadahiko Enoki, Tao-Sheng Li, Kimikazu Hamano. Jab1 plays an important role in drug resistance by stabilizing STAT3 and HIF-1 DNA-binding. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013 Feb 21-25., Maui (Hawaii, USA)
3. 西本 新, 村上順一, 上田和弘 Jab1 は STAT3 の標的 DNA 配列に対する結合能を蛋白質間相互作用を介して正に制御する、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-25 日、札幌(ロイトン札幌)

[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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 新 (NISHIMOTO, Arata)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90396325

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし