

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860230

研究課題名(和文) 結合蛋白に着目したStratifinによる肺腺癌初期悪性化の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Analysis for molecular mechanism of SFN-induced lung adenocarcinoma progression

研究代表者

柴 綾 (Shiba, Aya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50708427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肺腺癌の新規oncogeneと考えられるStratifin(SFN)の肺腺癌細胞における機能とその分子機序の解明を目的とした。始めにhSFNを肺のみで高発現させたTgマウスを作製し、このマウスが野生型に比して有意に肺腫瘍発生率が高いことを示した。

機能解析ではSFNはE3ユビキチンリガーゼSCFのアダプター部分であるSKP1に結合し、その機能を抑制することでoncoproteinの安定化を引き起こしていることが明らかになった。SKP1とSFNとの結合部位はすでに予測されており、SFN阻害薬を開発しSFN-SKP1結合をブロックすることで初期肺腺癌の進行を阻止できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we performed an in vivo and in vitro study to clarify the role of SFN and the underlying molecular mechanism in progression of lung adenocarcinoma.

First, we generated SFN-transgenic mice showing lung-specific expression of human SFN. We found that Tg-SFN developed lung tumors at a significantly higher rate than control mice.

One of the SFN-binding proteins, SKP1 is an adapter component of E3 ubiquitin ligase, forming a SCF complex. Our SKP1 IHC and previous results indicate that SFN combines with SKP1 and blocks SCF complex function. We already identified the SFN binding domain in SKP1 protein using in silico simulation, and started screening for small molecule compounds that specifically bind to SFN. Targeted therapy to block the SFN-SKP1 combination might be a new treatment strategy for patients with lung adenocarcinoma.

研究分野：実験病理学

キーワード：肺腺癌 初期悪性化 Stratifin SKP1

1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本では癌死原因として最も多い癌種であり(2011年度には70,293人が死亡)、中でも肺腺癌は最も発生頻度の高い組織型である。喫煙との関係が深い肺扁平上皮癌と異なり、腺癌は非喫煙者・アジア人・女性に多く、根本的な発癌原因は分かっていない。現在までにEGFR 遺伝子変異やEML4-ALK 転座などに関して多数の研究がなされ、ゲフィチニブやクリゾチニブなどの分子標的薬が治療に応用されているが、その多くがすでに根治不可能な進行癌に対するものである。しかし、切除することで完治可能な初期腺癌もCT 検診の普及とともに増加し(Nawa T. Lung Cancer, 2012)、肺癌のWHO 分類第4版(改訂進行中)でも進行癌、初期癌(上皮内癌)と分けられることが検討されている。今後の肺腺癌治療の中心課題は、完治可能な初期癌の発見と治療に移りつつあると言える。申請者は進行癌は複数の遺伝子異常が heterogenous に存在するため、発癌の原因となるような単一の driver oncogene を見出すには初期癌が適していると考えた。同定された driver oncogene を抑えることができれば、癌という遺伝子異常のドミノ倒しを初期段階でくい止めることができるはずである。野口らは2cm以下の初期肺腺癌を形態学的に分類し、一部に非常に予後の良い群(上皮内癌)が存在することを明らかにした(Noguchi M. Cancer, 1995)。しかし、上皮内癌に線維化巣の増生が加わった初期浸潤癌では、術後5年生存率は74.8%となり一部に死亡例が含まれていた。申請者はこの術後5年生存率の差に着目し、上皮内癌と初期浸潤癌の違いを生み出す原因、つまり初期悪性化の原因遺伝子を分子レベルで解析してきた。これまでに stratifin(SFN; Shiba-Ishii A. Int J Cancer, 2011), OCIAD2(Ishiyama T. Cancer Sci, 2007), S100A6(Ishii A. Pathol Int, 2009), IGBP1(Li D. Anticancer Res, 2011)が上皮内癌に比べて初期浸潤癌で有意に高発現していることが明らかになっている。申請者はその中でも特に、SFN は肺腺癌細胞でその発現を抑制すると増殖能や腫瘍形成能が低下すること既に示しており、一定の機能を持って肺腺癌の初期悪性化を促していると考えている(Shiba-Ishii A. Int J Cancer, 2011)。SFN は細胞内の種々の蛋白に結合し、リガンドの活性や局在を変化させることで、細胞増殖やアポトーシスなどに関与する(Hermeking H. Nat Rev, 2003)。腫瘍との関連も深く、p53 に制御され cyclin B1-cdc2 複合体の核内移行を阻害することで G2/M arrest を起こす tumor suppressor であると考えられてきた(Hermeking H. Mol Cell, 1997)。最近では Smad3 依存的に TGF- β に発現が誘導されることも明らかになり(Hong HY, BBRC, 2013)、複数のシグナル経路と係り腫瘍抑制的に機能することが示唆される。さらに、それらの癌細胞では SFN プロモーター領

域が高メチル状態にあることも示されている(Ferguson AT. PNAS, 2000)。その一方で、Bax の核内移行を阻害することでアポトーシスを抑制したり(Samuel T. J Biol Chem, 2001)、IGF1 に誘導され cyclin D1 を介した増殖能の亢進を起こすなど(Zhang Y. J Biol Chem, 2004)、oncogene としての側面もある。驚くことに申請者によって9割以上の肺腺癌において、腫瘍組織では正常組織に比べて低メチル状態にあることも示された(Shiba-Ishii A. Am J Pathol, 2012)。つまり SFN は発現・メチル化・機能の全てにおいて、臓器や組織によって違いがある「両作用遺伝子」であると言え、最新の報告でも癌の種類で発現量が極端に異なることにも反映されている(Ling C. Cancer Discov, 2012. Chen L. Int J Gynecol Pathol, 2013)。しかし肺腺癌で SFN が過剰発現し、増殖や腫瘍形成に関係するということは申請者に独自の知見であり、その機能の検証や機序の解明はなされていない。SFN は初期の肺腺癌の悪性化を促すと予想され、その機能や阻害物質の制癌効果が示されれば、肺腺癌の増悪を初期段階で阻止できる可能性もある。

2. 研究の目的

肺腺癌における SFN の機能機序を分子レベルで解明することで、肺腺癌初期悪性化の根本的な原因の1つを明らかにするとともに、SFN 阻害物質を用いた新たな治療方法の提示を目指す。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに stratifin(SFN) が初期浸潤肺腺癌において異常に発現亢進することや、SFN 発現を抑制すると肺腺癌細胞の増殖や腫瘍形成が抑えられることを示した。そこで、肺のみで SFN を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、発癌物質投与時の肺腫瘍発生率を解析し、SFN が肺腺癌悪性化に及ぼす影響を明らかにしたい。また、SFN が結合するリガンドに着目し、どのような分子メカニズムで SFN が肺腺癌細胞の増殖亢進を起こすかを解析する。そのリガンドとの結合部位の同定や SFN アンタゴニストの制癌効果の評価も行い、SFN とリガンドとの結合を阻害することによって肺腺癌を治療できる可能性を探索する。また、SFN に対する中和抗体の作製や、SFN 特異結合化合物の予測・合成も試み、複数の方法で SFN 結合阻害の実現を目指す。

4. 研究成果

始めに SFN を肺のみで高発現させたトランスジェニックマウス(Tg-SPC-SFN)を作製した。これに発癌物質 NNK を投与し20週観察し、その間10・15週の時点でCTを用いて肺を経過観察した。一部の Tg-SPC-SFN では10週からCTで肺に腫瘍が発生していることが確認できた。20週経過後、コントロールであ

る野生型 ICR 肺における腫瘍発生率が 11.1% であったのに対し、Tg-SPC-SFN では 47.8% と有意に高い結果となった。さらに興味深いことに、Tg-SPC-SFN は NNK 非投与群でも 28.6% に腫瘍が発生していた。これは SFN が肺腺癌の悪性化だけでなく発生にも関与することを示す(表 1)。

表 1. Tg-SPC-SFN^{+/-} マウスの腫瘍発生率。

genotype	wild type		Tg-SPC-SFN ^{+/-}	
	saline	NNK	saline	NNK
i. p.				
nodule count				
0	7	24	5	12
1	0	3	1	10
2	0	0	1	0
3	0	0	0	1
total	7	27	7	23
rate of mice with tumor(s)	0	11.1%	28.6%	47.8%

次に、先行実験により肺腺癌細胞で SFN 結合因子として同定された SKP1 とその制御因子の 1 つであるリン酸化 cyclin E1 の免疫染色を肺腺癌組織を用いて行った。SFN 陽性症例は SKP1 核・細胞質に陽性、SFN 陰性症例は SKP1 核のみ陽性になるという傾向があった。この結果は SFN 発現を抑制すると SKP1 の核内発現が有意に上昇するという先行実験の結果と一致し、SFN は SKP1 と細胞質において結合し、その機能を抑制している可能性が示唆された。さらにリン酸化 cyclin E1 は SFN と同様に肺腺癌の悪性化とともに発現量が高くなっていくことも示され(図 1)、SKP1 を含む SCF 複合体によるリン酸化 cyclin E1 のユビキチン化が SFN により抑制された結果であると考えられる。

SFN は SCF 複合体の機能抑制を介して肺腺癌初期悪性化を促していることが示唆され、SFN-SKP1 の結合をブロックすることで初期肺腺癌の進行を阻止できる可能性が示された。

さらに、SKP1 と SFN との結合部位を ClusPro プログラムによるタンパク質-タンパク質ドッキングシミュレーションにより予測した(図 2)。また、シミュレーションにより SFN 結合部位と予測された SKP1 蛋白内のアミノ酸に対し、アミノ酸置換を起こす変異を導入した変異型 SKP1 プラスミドを作製し、プルダウンアッセイを行った。その結果、変異型 SKP1 は SFN と結合しないことが確認され、このことから SKP1 は確かに予測された部位で SFN と結合していることが明らかになった。

現在は、SFN 内のドラッグブル部位を同定し、その部位に特異的に結合する小分子化合物を化合物ライブラリーからスクリーニン

グしている。SFN は SKP1 と結合することで肺腺癌初期悪性化を促していることが示されており、同定された小分子化合物によって SFN-SKP1 結合をブロックすることで初期肺腺癌の進行を阻止できる可能性が示唆された。

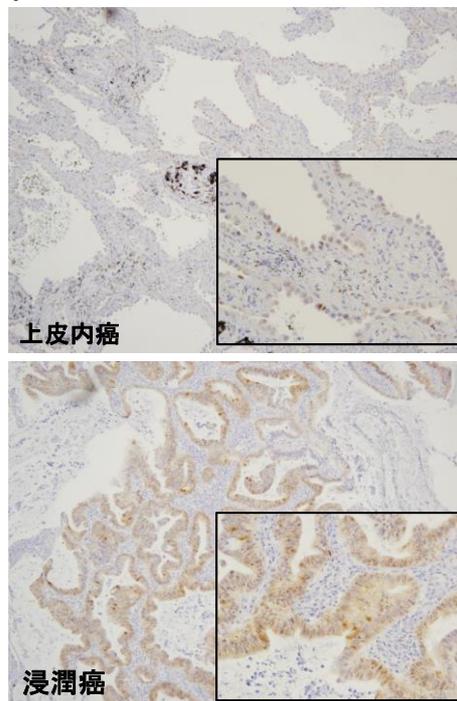


図 1. リン酸化 cyclin E1 免疫染色像。上皮内癌に比べ、より進行している浸潤癌で発現が高い。



図 2. ClusPro プログラムによりシミュレーションされた SFN と SKP1 蛋白のドッキングパターン。ピンクが SFN ダイマー、黄色が SKP1。

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 Husni RE, Shiba-Ishii A, Iyama S, Shiozawa T, Kim Y, Nakagawa T, Sato T, Kano J, Minami Y, Noguchi M. DNMT3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma. Lung Cancer 2016, in press. 査読有り。

② Shiba-Ishii A, Kim Y, Shiozawa T, Iyama

S, Satomi K, Kano J, Sakashita S, Morishita Y, Noguchi M. Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Molecular cancer* 14(1):142, 2015. 査読有り。
DOI: 10.1186/s12943-015-0414-1.

③ Itoguchi N, Nakagawa T, Murata Y, Li D, Shiba-Ishii A, Minami Y, Noguchi M. Immunocytochemical staining for stratifin and OCIAD2 in bronchial washing specimens increases sensitivity for diagnosis of lung cancer. *Cytopathology* 26(6):534-61, 2015. 査読有り。
DOI: 10.1111/cyt.12220.

④ Ohara R, Michikami H, Nakamura Y, Sakata A, Sakashita S, Satomi K, Shiba-Ishii A, Kano J, Yoshikawa H, Noguchi M. Moesin overexpression is a unique biomarker of adenomyosis. *Pathology international* 64(3):115-22, 2014. 査読有り。
DOI: 10.1111/pin.12148.

⑤ Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S, Kato M. TMEPAI/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. *Cancer Science* 105(3):334-341, 2014. 査読有り。
DOI: 10.1111/cas.12355.

[学会発表] (計 1 件)

① Shiba-Ishii A, Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage, 第16回世界肺癌学会、2015年9月9日、デンバー (米国)

[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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
柴 綾 (SHIBA, Aya)
筑波大学 医学医療系・助教
研究者番号：50708427