

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590980

研究課題名(和文)細胞周期調節因子cdh1の消化器癌発生・進展における役割の解明

研究課題名(英文)The role of cell cycle regulator Cdh1 in carcinogenesis and development of gastrointestinal cancer.

研究代表者

直江 秀昭(Naoe, Hideaki)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30599246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： Cdh1発現をsiRNAにより抑制した大腸癌細胞株では、コントロール細胞と比べて、細胞骨格の異常を来した。Wound healing assayによる運動能評価では、Cdh1を抑制した細胞では高い移動能が観察された。次に、Cdh1の生体における機能を明らかにするために、Cdh1のリン酸化部位を抑制型に変異させたヘテロマウスを製作した。ヘテロマウス同士の交配では、仔の遺伝子型は45匹中、野生型：ヘテロ：ホモ=13：32：0という結果であった。この結果より、Cdh1リン酸化のホモ抑制マウスが胎生致死であることが明らかとなった。現在、胎生致死の時期と原因について解析中である。

研究成果の概要(英文)： Suppress the expression of Cdh1 with siRNA technique in colon cancer cell line. These cells revealed cytoskeletal abnormality with decreased actin filament. In the analysis of cell motility with the wound healing assay, Cdh1 suppressed cells showed high motility compared with the control cells. Next, we generated heterogenous mice which one of the phosphorylation site of Cdh1 was suppressed with gene trap technique. Genotyping of offspring of these mice was following as wild type: hetero: homo=13:32:0. These results indicated that homo suppression of Cdh1 phosphorylation site was embryonic lethal event in mice. Now, we are studying about the timing of lethality and cause of death.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学 pathway解析

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞周期の進行は関連分子のリン酸化(活性化)と分解という二つの生化学的反応によって厳密に制御されている。後者を担うものがユビキチンリガーゼであり、中でも Anaphase promoting complex (APC) は Cyclin B や Geminin 等の分解を司る重要な役割を担っている(King et al. Cell 1995, Sudakin et al. Cell 1995)。今回我々が注目している Cdh1 は、分裂期前中期から G1 期の終わりにかけて APC の活性を維持している活性化因子の一つである。

このような APC 調節作用に加えて、Cdh1 の機能の新たな一面が近年、報告されている。例えば、APC/C^{Cdh1} は分裂を終えた細胞が大部分を占めるニューロンにおいても発現し、活性を持っており、軸索の伸長とパターン化を促進することが明らかになった(Konishi et al. Science 2004)。

さらに重要な報告として、申請者は Cdh1 が細胞骨格と細胞運動の制御に関与しているという生理的機能を明らかにした(Naoe et al. Mol Cell Biol.2010)。

Rho は細胞の形態や極性、アクチン重合による運動、アクトミオシン収縮、接着、微小管動力などの調節において中心的な役割を果たしている。加えて、癌の進展過程において Rho の調節異常がみられ、予後とも関連していることが示されている(Sahai et al. Nature Rev. Cancer 2002)。Cdh1 は代表的な RhoGAP である p190 RhoGAP の分解を介して Rho の活性を制御することを明らかにした。以上の結果は、Cdh1 と Rho との機能的相互作用は、生理的、病的状況下において Cdh1 が有する多岐にわたる役割の分子基盤を担うことを示唆するものである。

しかしながら、ヒト消化器癌の増殖・進展過程における Cdh1 の関与については、Cdh1 を欠損したマウスの線維芽細胞が染色体の不安定性を来すとの報告がある程度で、詳細は不明である。申請者のこれまでの研究から Cdh1 が Rho の活性を制御していることが明らかであり、Cdh1 が消化器癌の増殖や転移、浸潤などの多段階にわたって大きく関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

消化器系癌細胞株において Cdh1 の発現制御による生物学的特性の変化を解析すると共に、臨床検体の解析結果と統合することで、消化器系癌の発癌進展機構における Cdh1 の役割を明らかにする。具体的には

Cdh1 の発現制御することで、癌細胞の形態の変化や、浸潤転移能、増殖能などの癌細胞の有する生物学的特性の変化がもたらされるか。

ヒト臨床検体において Cdh1 の遺伝子発現、蛋白質発現が変化しているかどうか。変化しているとすればそれは臨床像と相関があるか。

Pathway 解析等の bioinformatics 的検索を用い、Cdh1 を中心とした上流、下流の関連する分子群と Network を明らかにし、消化器癌の発癌進展にこのような経路が関与しているか。

3. 研究の方法

(1)癌細胞実験系：癌細胞を用いて、Cdh1 の発現制御による生物学的特性の変化を解析する。評価項目としては以下の通りである。

細胞形態の評価。各種癌細胞株における Cdh1 蛋白質の発現レベルをウエスタンブロットで評価する。Cdh1 発現の低い細胞株には Cdh1 発現ベクターを transfection することで Cdh1 を過剰発現させ、逆に Cdh1 発現の多い細胞に対しては Cdh1 siRNA を transfection することでその発現を低下させる。このように Cdh1 蛋白質発現を変化させた細胞の形態的な評価を、既報(Naoe et al. Mol Cell Biol.2010)に準じて行う。

細胞運動の評価：細胞の運動と極性を明らかにするために Wound healing assay を行う。Confluent な培養細胞をスクラッチして、スクラッチした部分への細胞の移動を経時的に観察する。それと共に移動先端部の細胞のゴルジ体の位置を免疫染色で観察し、Cdh1 の極性、運動能における役割を検討する。また、3 次元的な浸潤能をみる実験系として"Boyden chamber"を用いて細胞運動能を評価する。即ち、チャンバー上部の無血清培地中に播いた細胞は、チャンバー下部の血清培地側へ膜を通過して移動することから、移動した膜下の細胞をカウントすることで細胞運動能を検討する。増殖の評価：Cdh1 の蛋白質発現を変化させた癌細胞株の増殖曲線を描き、Cdh1 が細胞増殖に与える影響について検討する。加えてヌードマウスに接種することで腫瘍形成能を解析する。

(2)動物実験系：マウスを用いて、Cdh1 の発現制御細胞の浸潤・増殖能を評価する。ヌードマウスの皮下に Cdh1 発現を制御した細胞を注射し、腫瘍径の増大の程度を計測して生体内における浸潤能を評価する。

(3)ヒト癌サンプル実験系：ヒトの消化器癌臨床サンプルを用いて、Cdh1 発現と臨床像の比較検討を行う。申請者らはヒト肝癌細胞の手術により得た切除標本を B 型、C 型、非 B 非 C 型と臨床像に分けて有している。これらはすべて包括同意を得た標本である。

これらの標本から組織の抽出液を作り、Cdh1 の遺伝子発現、蛋白質発現をウエスタンブロット法により評価する。

また、標本より凍結切片を作成し、免疫組織学的にも Cdh1 の蛋白質発現を検討し、ウエスタンブロット結果との比較を行う。

肝癌癌の大きさ、転移の有無、組織型などの臨床データと Cdh1 発現との関係を対比して比較検討する。

(4)バイオインフォマティクス解析：cDNA マイクロアレイを用いて生物学的特性の変化

を担う遺伝子群を明らかにすることで、Cdh1の機能をつかさどる分子群のNetworkを解明する。

Cdh1 発現ベクターあるいは Cdh1 siRNA により Cdh1 の発現を制御し、その結果としての遺伝子発現の網羅的解析を cDNA マイクロアレイにて行う。

さらに pathway 解析を行い、Cdh1 の標的分子群の Network を構築すると共に、Cdh1 機能を担う分子群を同定する。同様の検討を内視鏡的に、あるいは外科的に切除した大腸癌サンプルについても行う。

4. 研究成果

5 種類の大腸癌細胞株において、Cdh1 の発現を比較した。その結果、細胞株により Cdh1 の発現の程度は異なっていた(図1)。

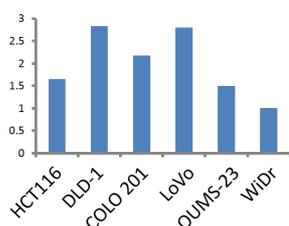


図1. 大腸癌細胞株における Cdh1 発現

このうち、Cdh1 発現量の多い DLD-1 細胞で siRNA により Cdh1 発現を抑制した(図2)。

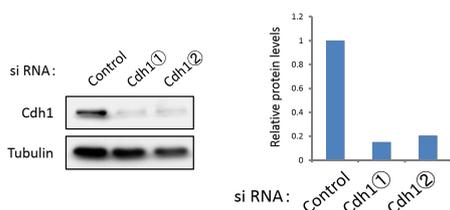


図2. siRNA による Cdh1 発現の抑制

この様にして Cdh1 発現を抑制した大腸癌細胞を用いて、アクチン繊維を免疫染色したところ、コントロール細胞と比べて、Cdh1 抑制細胞では明らかにアクチン繊維の減弱を認めた(図3)。

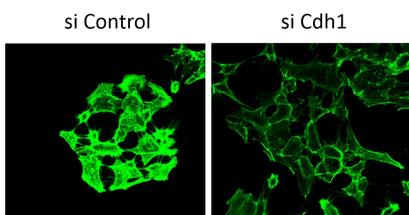


図3. Cdh1 抑制細胞の免疫染色(アクチン)

上記の様に Cdh1 抑制細胞では大腸癌細胞の細胞骨格の異常を来したため、細胞運動における Cdh1 の機能を調べる目的で、wound healing assay を行った。その結果、予想に反して、Cdh1 を抑制した細胞において、高い移動能が観察された(図4 n=3)。今後は、transwell migration assay により3次元にお

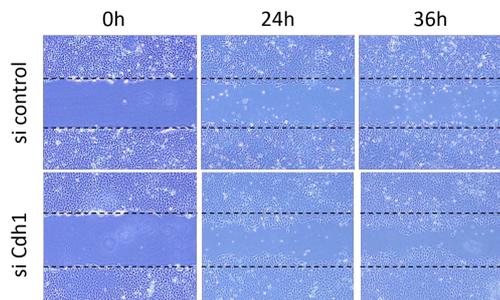


図4. Cdh1 抑制下、Wound healing assay

ける Cdh1 抑制大腸癌細胞の移動能を評価していく予定である。

次に、当初の計画からやや離れて、Cdh1 の生体における機能を明らかにするために、Cdh1 のリン酸化部位を抑制型に変異させたヘテロマウスを作製した。このマウスは通常通り生まれ、発育し、子供を産むことがわかった。ホモ抑制マウスの表現型を明らかにするために、ヘテロマウス同士の交配を行ったところ、仔の遺伝子型は 45 匹中、野生型：ヘテロ：ホモ = 13：32：0 という結果であった。この結果より、Cdh1 リン酸化のホモ抑制マウスが胎生致死であることが明らかとなった。Cdh1 抑制マウスが胎生致死であることは過去に報告されているが、リン酸化部位のみを抑制したマウスの表現型はこれまで明らかになっておらず、この結果は重要な意義を持っているものと思われる。現在、胎生致死の時期と原因について解析中であり、胎生 12.5 日目の評価では、正常より一回り小さい胎盤と胎児を認めている。この胎盤では、胎盤の成熟に重要な役割を持つ Trophoblast giant cell (TGS)の欠損が確認された。Cdh1 が胎盤の形成に関与していることが示唆され、この解析を通して、今後は細胞の浸潤における Cdh1 の役割を明らかにしていく予定である。

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 1 件)

Naoe H, Chiyoda T, Ishizawa J,

Masuda K, Saya H, Kuninaka S

The APC/C activator Cdh1 regulates the G2/M transition during differentiation of placental trophoblast stem cells

Biochemical and Biophysical Research

Communications, 2013, 11;430(2):757-62

(査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

An integrated approach of differential

mass spectrometry and gene ontology analysis can identify key molecules regulating apoptosis resistance in human hepatoma cells. Naoe H, Hoshida Y, Hirota Y, Yokote S, Nagaoka K, Watanabe T, Yamada Y, Tsuruta Y, Tanaka M, Araki N, Sasaki Y. The 63rd annual meeting of the American association for the study of liver diseases 2012, Nov. 9-13, Boston, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

直江 秀昭 (NAOE HIDEAKI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30599246

(2)研究分担者

佐々木 裕 (SASAKI YUTAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70235282

(3)研究分担者

横峰 和典 (YOKOMINE KAZUNORI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60530128

(平成 23 年度)

(4)研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIROU)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

(5)連携研究者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80264282