

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592009

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子FHITのPKC制御による膵癌の浸潤・転移抑制効果の研究

研究課題名(英文) Tumor suppressor FHIT regulates tumor invasion of pancreatic cancer cells via inhibiting association of Ezrin and Actin cytoskeleton

研究代表者

西崎 正彦(Nishizaki, Masahiko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30379789

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)：Ezrinは癌の転移を促進するが、PKCにより制御されている。PKCI(PKC関連タンパク)と相同性がある癌抑制遺伝子FHITは膵癌でも異常が報告されているが、アデノウイルスベクターを用いてFHITを膵癌細胞S2-VP10に過剰発現させることで、FhitがPKCとEzrinの結合を阻害することによりEzrinのスレオニン基のリン酸化を抑制し、EzrinとActinの結合抑制されることを証明した。結果としてEzrinによる細胞の遊走性が抑制された。以上より、癌抑制遺伝子FHITの過剰発現はEzrinを制御することで膵癌の転移を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ezrin is recognized as a key component in tumor metastasis and regulated by PKC. Abnormalities of tumor suppressor FHIT, which shares homology with PKCI (PKC-interacting protein), have been found in pancreatic cancers. In this study, we showed that FHIT overexpression in S2-VP10 pancreatic adenocarcinoma cells by transfection of Ad-FHIT suppressed migratory/invasive capacities of tumor cells. We observed that overexpression of FHIT largely reduced threonine-phosphorylated Ezrin. Furthermore, FHIT overexpression interrupted not only Ezrin and Actin cytoskeleton interaction but also Ezrin and PKC alpha interaction. We also found Fhit and PKC alpha binding in the immunoprecipitation analysis. Ectopic activation of FHIT significantly reduced the invasive potential in S2-VP10 cells. These findings suggested that overexpression of FHIT protein might regulate tumor invasion via inhibiting Ezrin and Actin cytoskeleton interaction.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：遺伝子治療 癌 転移・浸潤

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌による死亡者数は年間 2 万人を越えており、今後も喫煙・飲酒・肥満など生活習慣や社会環境を背景に増加傾向にあると予測されている。その難治性の要因として、早期発見が困難であり、発見時にはすでに周囲臓器への浸潤や転移を来していることが多く、また、既存の化学療法、放射線療法に対する抵抗性が挙げられる。膵癌の浸潤転移を抑制することが切除率を向上し、切除不能であっても予後の改善に繋がることが期待できる。PKC (protein kinase C) はセリン/スレオニンキナーゼとして機能する密接に関連した酵素ファミリーからなっており、細胞-細胞シグナリング、遺伝子発現、および細胞の分化と増殖の制御に重要な役割を果たしている。PKC は非常に多様な働きを持っているが、その発現異常は発癌や癌の浸潤・転移に大きく関わっていることが分かっており、PKC 阻害剤は従来の抗癌剤と全く異なる機序で抗腫瘍効果を有する次世代の抗癌剤として期待されている。

(2) FHIT (Fragile Histidine Triad) 癌抑制遺伝子は固形癌や血液系腫瘍において転写異常や蛋白発現の低下が高率に認められているが、その機能は十分解明されていない。FHIT 蛋白配列は Ap4A 加水分解酵素と 52% 相同性があり、核内では核酸の加水分解あるいは転写酵素として働いていることが示唆されている。また、FHIT 蛋白は細胞質にも存在しており、PKCI (protein kinase C inhibitor/interacting protein) と 20% 相同性を持っていることが判明している。PKCI は PKC と複合体を形成し PKC のシグナル伝達を制御しているが、FHIT が PKC を制御している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では癌抑制遺伝子 FHIT により FHIT 蛋白を強発現させることで PKC を阻害す

る全く新しい治療法の開発であり、膵癌細胞の浸潤転移を抑制する独創的な遺伝子治療である。

(2) 癌抑制遺伝子を導入する遺伝子治療は癌細胞のアポトーシスを誘導する目的のことが多いが、遺伝子導入効率の問題やアポトーシスに抵抗性の癌細胞も多いことで実臨床での応用に至っていない。固形癌が宿主を死に至らしめるのは無秩序な増殖のみではなく、重要臓器への浸潤転移により生命維持が困難になることが上げられる。癌の浸潤転移を制御できれば予後の改善、延いては癌との共存も可能となり、最も悪性度の高い膵癌など現在の治療では限界のある固形癌に対し画期的な治療法を確立する基礎的研究となることを期待するものである。

3. 研究の方法

(1) 癌の浸潤転移に関わるシグナル伝達系の中で最近注目されている ERM family (Ezrin-Radixin-Moesin) は細胞骨格アクチンフィラメントと細胞膜タンパク質を架橋するリンカータンパク質として機能することにより、細胞アピカル膜を構造的・機能的に構築し、癌細胞においては浸潤・転移を促進する。上流は PKC により制御されている。今回の研究では FHIT 遺伝子を欠損している膵癌細胞株 SUIT-2、S2-CP9、S2-VP10 を用い、FHIT 発現プラスミドおよび FHIT 発現アデノウイルスベクターによる FHIT 強発現系で FHIT による PKC 制御を検討する。実際に膵癌細胞株でも FHIT と PKC が結合することを確認し、ERM family-Actin 相互作用を解析する。FHIT が PKC 阻害作用を有すれば、下流の ERM family である EZRIN のスレオニン残基のリン酸化を阻害し、EZRIN と ACTIN の結合を抑制することを明らかにする。さらに *in vitro* で Boyden チャンバー法により FHIT が癌細胞の浸潤能を抑制し、さらに、*in vivo* でヌードマウスの肺転移モデルを作成し、FHIT による肺転移

抑制を検討することで FHIT の PKC 阻害薬としての浸潤・転移抑制という新たな可能性を探求する。

4 . 研究成果

FHIT 遺伝子を欠損している膀胱癌細胞株 SUIT-2、S2-CP9、S2-VP10 において EZRIN、ACTIN の発現をウェスタン・ブロッティング (IB) により確認した結果、いずれの細胞株でも両者の発現を認めた。EZRIN の発現量が最も多く、細胞増殖能および浸潤能も強い S2-VP10 を以後の実験系に使用した。

FHIT 発現アデノウイルスベクター (Ad-FHIT) をコントロールして PBS、LacZ 発現アデノウイルスベクター (Ad-LacZ) を S2-VP10 に 1000 MOI で感染させ 48 時間後の cell viability を XTT assay にて差がないことを確認した。同時に GFP 発現アデノウイルスベクター (Ad-GFP) 1000MOI 48 時間で GFP 発現効率が 95%以上であることを確認し、遺伝子導入が確実に行われていることを実証した。

S2-VP10 に Ad-FHIT を感染 48 時間後の細胞質成分を用い抗 PKC 抗体により免疫沈降 (IP) を行い、抗 FHIT 抗体で IB を行い、PKC と FHIT が結合していることを証明した。同時に抗 EZRIN 抗体で IB を行ったが、コントロール群では PKC と EZRIN の結合を認めたが、Ad-FHIT 感染細胞では PKC と EZRIN の結合を認めなかった (図 1)。このことにより、FHIT タンパクが PKC と結合することにより、PKC と EZRIN の結合を阻害している可能性が強く示唆された。

次に抗 EZRIN 抗体により IP を行い、次いで抗リン酸化チロシン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体で IB を行い、EZRIN のリン酸基の変化を WB 法で検討した。EZRIN のチロシン基のリン酸化はコントロール群、Ad-FHIT 感染細胞で共に変化なかったが、スレオニン基のリン酸化はコントロール群では変化なく、Ad-FHIT 感染細胞のみ 100%阻害されていた

(図 1)。また同時に抗 Actin 抗体で WB を行うと Ad-FHIT 感染細胞でのみ FHIT と Actin の結合が阻害されている結果が得られた (図 1)。抗 Actin 抗体で IP を行い、抗 EZRIN 抗体で WB を行った結果も同様に、Ad-FHIT 感染細胞のみ Actin と EZRIN の結合が阻害されていることが証明された。この結果より、FHIT 過剰発現では FHIT と PKC が結合し、PKC による EZRIN のスレオニン基のリン酸化が阻害され、FHIT と Actin の結合も阻害される可能性が強く示唆された。

図 1

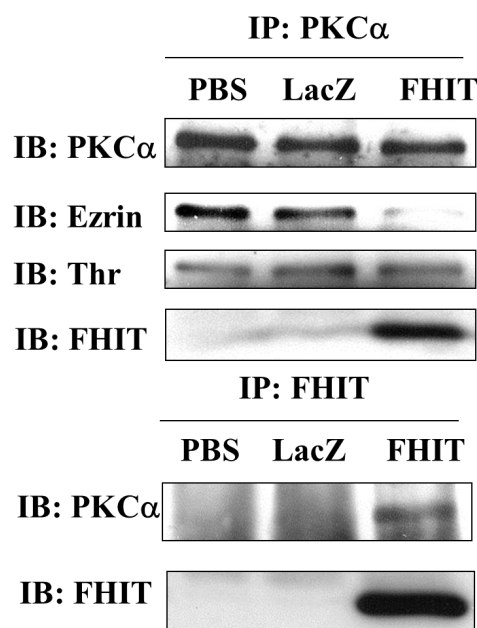
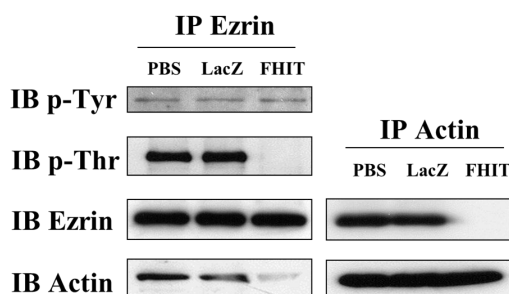


図 2



Ad-FHIT を用いた実験をより生理的な条件で再現するため、カチオンリポソームである DOTAP コレステロールを用いプラスミドで

の遺伝子導入実験を行ったが、遺伝子導入効率が低く、アデノウイルスベクターと同様な結果は得られなかった。そのため、免疫蛍光染色で遺伝子導入が行われた細胞のみ形態の変化を観察した。コントロール細胞ではアクチンフィラメントの重合とそれに一致した EZRIN の局在が確認されたが、FHIT 発現プラスミドが導入された細胞ではアクチンフィラメントの重合阻害と EZRIN のびまん性発現が認められ、EZRIN と ACTIN との結合阻害が示唆された。

上記の結果より強発現系の Ad-FHIT を用い膵癌細胞の転移能を検討する実験を行った。細胞増殖能をそろえた条件で、Boyden チャンバー法による細胞浸潤能の検討を行った。Ad-FHIT 感染 (1000MOI) 36 時間後にメンブレンに S2-VP10 を敷き、その 12 時間後にメンブレンを通過してチャンバーに到達した細胞を固定、DAPI 染色の蛍光吸光度で定量した。Ad-FHIT 感染細胞はコントロール群に比し有意に細胞浸潤能の減弱が認められた ($P < 0.01$) (図 3、4)。

図 3

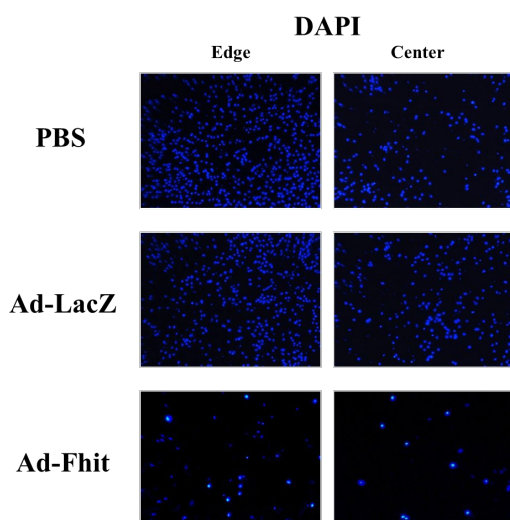
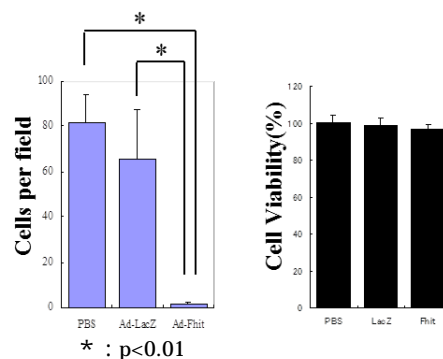


図 4



以上より、FHIT 遺伝子治療は PKC を制御することにより EZRIN と ACTIN の結合を阻害し細胞の遊走能を減弱することで膵癌の転移を抑制する可能性が示唆された。

ヌードマウスを用いた肺転移モデルは現在構築中である。

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)

[学会発表](計 1 件)

第 19 回 日本遺伝子治療学会

「Tumor suppressor FHIT regulates tumor invasion of pancreatic cancer cells via inhibiting association of Ezrin and Actin cytoskeleton」

西崎正彦 田澤大 黒田新士 岸本浩行
香川俊輔 藤原俊義

2013 年 7 月 5 日 ホテルグランヴィア岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西崎 正彦 (NISHIZAKI MASAHIKO)

岡山大学・病院・助教

研究者番号 : 30379789

(2) 研究分担者

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 00304303

(3)連携研究者

香川 俊輔 (KAGAWA SHUNSUKE)

岡山大学・病院・講師

研究者番号：00362971

永坂 岳司 (NAGASAKA TAKESHI)

岡山大学・病院・助教

研究者番号：30452569

田澤 大 (TAZAWA HIROSHI)

岡山大学・助教

研究者番号：90415513