

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06850

研究課題名(和文) 足場非依存性を標的とした癌治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文) Basic research on cancer therapy development targeting anchorage independence

研究代表者

上北 尚正 (Uekita, Takamasa)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工・応用科学群・准教授)

研究者番号：50373402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 癌転移の特性である足場非依存性能を治療の標的とするため、CDCP1による足場非依存性能の制御機構を明らかにする事を目的として研究をおこなった。

本研究により、細胞外領域に存在するCUB2ドメインが細胞膜のCDCP1同種複合体形成に関与する事を発見し、さらにSrcチロシンキナーゼの活性化を介したCDCP1シグナルの制御に重要である事を明らかにした。また、CDCP1シグナル遮断による足場非依存性能の抑制に関して有効な低分子化合物を2つ同定し、マウス腹膜播種実験による胃癌細胞の転移を抑制する事に成功した。

これら結果は、CDCP1が足場非依存性能を標的とした治療法に有用である事を示唆している。

研究成果の概要(英文)： In order to target anchorage-independence, which is a major function of cancer metastasis, as a target of cancer therapy, we aimed to clarify the control mechanism of anchorage-independence by CUB domain-containing protein 1 (CDCP1). In this study, we revealed that the extracellular CUB2 domain of CDCP1 is involved in the CDCP1 homophilic complex formation on the cell membrane and is also important for regulating CDCP1 signal via activation of Src family kinase. In addition, we identified two small-molecular compounds effective for suppressing anchorage-independence by blocking CDCP1 signal and succeeded in suppressing metastasis of gastric cancer cells by mouse peritoneal dissemination model.

These results suggest that CDCP1 is useful candidate for cancer therapy targeting anchorage-independence of cancer cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌転移 足場非依存性 シグナル伝達 複合体形成 低分子化合物

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに継続して癌の特性である足場非依存性能と細胞運動能・浸潤能に重要な機能を持つ因子である CUB domain-containing protein 1 (CDCP1)の研究をおこなってきた。CDCP1 は機能未定の因子であったが、研究代表者の研究から、癌細胞の足場非存在下で Src キナーゼ依存的に CDCP1 のリン酸化が亢進し、リン酸化 CDCP1 が細胞死制御因子である PKC を膜上に留めて下流にシグナルを伝えることによって細胞死を抑制する SFK-CDCP1-PKC 複合体を介したシグナルの存在を報告し、CDCP1 タンパク質発現の抑制による実験動物転移モデル系での肺転移や腹膜播種の抑制も明らかにし、in vivo における重要性も確認した。

このように、CDCP1 が癌の足場非依存性能の獲得や浸潤・転移に重要な役割を担うことを証明してきたことから、CDCP1 が癌進展における治療標的分子として有望であることが示されたが、CDCP1 を標的とするには、CDCP1 自身の制御機構及び、CDCP1 下流シグナルの制御メカニズムを明らかにしなければ、治療標的因子としての有用性を明らかにすることはできないことから研究を推進した。

## 2. 研究の目的

CDCP1 は、癌細胞に足場非依存性能を獲得させ転移を促進するが、そのシグナル制御機構は明らかになっていない。申請者は、CDCP1 が同種複合体形成することを発見し、CDCP1 細胞外ドメインによる CDCP1 シグナル制御機構の存在を推定した。今研究では、(1) CDCP1 の細胞外ドメイン機能領域を同定し、同種複合体形成等を含めた CDCP1 機能の制御機構を明らかにする事、(2) CDCP1 の細胞外領域の切断修飾等による細胞機能への関与を明らかにする事、(3) CDCP1-PKC 結合を阻害する低分子化合物を同定し、下流シグナル伝達への効果と足場非依存性能への影響を明確に

示す事の3項目を検証し、CDCP1 が癌治療法の標的候補として重要であるかを検証する事を目的とした。

## 3. 研究方法

CDCP1 蛋白質を抑制した癌細胞株を用い、CDCP1 の細胞外領域の様々な欠失変異体を発現する系を作成し、CDCP1 の同種複合体形成に関わる領域を特定する。それと共に癌細胞の足場非依存性能を Cell Death Assay や Soft Agar Colony Assay 等により確認する。さらに CDCP1 を含む下流シグナルのリン酸化について検証する。

CDCP1 は細胞表面でプロテアーゼにより切断されることが報告されているが、細胞機能への影響はよく分かっていない。よって切断されない CDCP1 変異体を作成し、CDCP1 の切断修飾による足場非依存性能、細胞増殖能、浸潤・転移能といった細胞機能への関与を明らかにする。

CDCP1-PKC の結合は CDCP1 のリン酸化依存的に起こる。これまでに、PKC の CDCP1 結合部位である C2 領域のみを強発現するシグナル阻害により、足場非依存性能が抑制される事を明らかにしてきた。そこで、CDCP1-PKC シグナルを阻害するために CDCP1-PKC 間の結合を検出する系を確立し、CDCP1 シグナルの抑制を抗リン酸化抗体等による Western blot 法で検証し、PKC の CDCP1 への結合阻害による下流シグナル遮断を目的とした候補物質を同定する。

## 4. 研究成果

癌転移機構の重要な要因の一つである足場非依存性能に関与する CDCP1 細胞外ドメインにおいて、3つある CUB ドメイン内の CUB2 ドメインが CDCP1 の2量体およびそれ以上の同種複合体形成に重要である事を明らかにした。さらに、CUB2 ドメインのみの添加は、癌細胞膜上の CDCP1 の同種複合体形成を阻害して CDCP1 細胞内ドメインのチロシン残基をリン酸化する

Src family kinase (SFK)の活性を抑制することが明らかとなった。また、CDCP1 シグナル下流の PKC のリン酸化も抑制され、足場非依存性能及び細胞運動能を抑制することを明らかにした。今後は、CUB2 ドメインに結合する抗体を作成し、抗体療法の基盤研究を推進する予定である。

研究当初に、CDCP1の切断が CDCP1 シグナルの増強に関与するとの報告がなされた。よって、CDCP1を切断する酵素を阻害する事による CDCP1 機能の抑制を介した治療法開発が出来ないかを検討する事とした。CDCP1 は膜型セリンプロテアーゼの MT-SP1 によって切られる可能性が指摘されていたため、siRNA 法による MT-SP1 の抑制をおこなったところ、CDCP1 の細胞外ドメインの切断が抑制されるとともに、CDCP1 シグナルも抑制されることが確認された。そして、この切断抑制は、足場非依存性能の抑制をも引き起こしている事が観察された。つまり、MT-SP1 は CDCP1 切断の主要な酵素の一つであると考えられ、MT-SP1 阻害剤による CDCP1 切断制御を介した治療法の開発の可能性が示唆された。よって、MT-SP1 による CDCP1 切断機構に関するさらなる研究が治療基盤研究に必要であると考えられる。

一方の CDCP1 細胞内ドメインにおいて、CDCP1-PKC の結合は、CDCP1 のリン酸化依存的に起こること報告していた。またこれまでに、PKC の CDCP1 結合部位である C2 領域のみを強発現する結合阻害により、足場非依存性能が抑制される事をこれまで明らかにしてきた。そこで、CDCP1 シグナルを阻害するために細胞膜透過性 HIV-TAT 配列を N 末端側に付加した 17 アミノ酸のリン酸化 CDCP1 ペプチドを作製し、癌細胞に処理したところ、CDCP1-PKC を介したシグナルを抑制する事に成功した。また、CDCP1 細胞内ドメインと PKC 間の結合を検出するスクリーニング系を確立し、低分子化合物による結合阻害実験をおこなったところ、候補となる低分子化

合物を 2 つ同定することに成功した。これらの低分子化合物が、胃癌細胞株の増殖と腹膜播種を *in vivo* で抑制することをマウス皮下注射および腹腔内注入時の薬剤添加実験で明らかにし、癌転移の特性である足場非依存性能を標的とした低分子化合物による新規治療法開発の基盤を確立することが出来た。

さらに興味深い知見として、小細胞肺癌細胞株においては、足場非依存性能に関与する CDCP1 の遺伝子座が欠失しながら足場非依存性を保持しているを発見した。よって、癌種によっては新規の足場非依存性能の制御因子が存在する可能性があり、癌転移治療開発における新たな足場非依存性に対する標的因子の同定が期待できる。

以上の結果から、CDCP1 細胞外ドメインに関しては、CDCP1 の細胞外ドメイン CUB2 が同種複合体形成に重要である事、

CDCP1 の MT-SP1 による切断がいくつかの癌細胞で足場非依存性能の獲得に重要である事を示唆する成果が得られた。一方、CDCP1 細胞内ドメインに関しては、CDCP1-PKC 間の結合を阻害する低分子化合物を同定し、動物転移モデルで転移抑制の効果を確認する事が出来た。

今研究により、癌転移の特性である足場非依存性能の制御機構に CDCP1 が重要な役割を担っている事を明らかにするとともに、CDCP1 が足場非依存性能を標的とした治療法の開発に有用である事を示唆することが出来た。

#### 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. Sawayama T., Uekita T.  
The extracellular CUB domain of CDCP1 is involved in cell-cell contact

- and regulates collective cell migration in BxPC3 cells.  
Memoirs of NDA (in press), 2018  
<http://nda-repository.nda.ac.jp/dspace/>  
(査読・有)
2. Nakashima K., Uekita T., Yano S., Kikuchi JI., Nakanishi R., Sakamoto N., Fukumoto K., Nomoto A., Kawamoto K., Shibahara T., Yamaguchi H., Sakai R. Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC $\delta$  pathway reduces tumor metastasis and proliferation.  
Cancer Sci. 108, 1049-1057, 2017  
DOI: 10.1111/cas.13218.  
(査読・有)
  3. Taoka M., Fujii M., Tsuchiya M., Uekita T., Ichimura T. A Sensitive Microbead-Based Organic Media-Assisted Method for Proteomics Sample Preparation from Dilute and Denaturing Solutions.  
ACS Appl. Mater. Interfaces. 9, 42661-42667, 2017  
DOI: 10.1021/acsami.7b16095.  
(査読・有)
  4. Kawaguchi Y., Taoka M., Takekiyo T., Uekita T., Shoji I., Hachiya N., Ichimura T. TRIM32 Cytoplasmic Body Formation is an ATP-consuming process stimulated by HSP70 in cells.  
PLoS One 12, e0169436, 2017  
DOI: 10.1371/journal.pone.0169436.  
(査読・有)
  5. Ueno H., Tomiyama A., Yamaguchi H., Uekita T., Shirakihara T., Nakashima K., Otani N., Wada K., Sakai R., Arai H., Mori K. Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 468, 240-247, 2015  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.122.  
(査読・有)
- [学会発表] (計 13 件)
1. 澤山忠司、上北尚正  
The possibility of CUB2 domain of CDCP1 extracellular domain as a novel therapeutic target for cancer metastasis.  
ConBio 2017、2017 年
  2. Sawayama T., Uekita T.  
Homophilic complex formation of CDCP1 by CUB2 domain regulates lung cancer invasion  
NCRI Cancer Conference 2017、2017 年
  3. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメイン依存的な同種多量体形成を介した足場非依存性能の制御機構の解明  
第 76 回日本癌学会学術集会、2017 年
  4. 上北尚正、澤山忠司  
Analysis of FAK-mediated anchorage-independent cell growth in small cell lung cancer.  
第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年
  5. 澤山忠司、上北尚正  
Cleavage of CDCP1 regulates signaling of anchorage-independence through its homophilic complex formation  
第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年
  6. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメインによる同種多量体形成は Src を活性化し肺がん転移を亢進する  
第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

7. 澤山忠司、上北尚正  
Dimerization of CDCP1 via extracellular domain regulates anchorage independence by activating Src signaling.  
第 75 回日本癌学会学術集会、2016 年
8. 中島克彦、上北尚正、堺隆一  
癌進展に関わる膜タンパク質 CDCP1 と PKC との相互作用を標的とした新規癌治療薬の開発  
第 75 回日本癌学会学術集会、2016 年
9. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメインは同種 2 多量体形成は Src を活性化し癌の足場非依存性を制御する  
第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会、2016 年
10. 中島克彦、上北尚正、堺隆一  
CDCP1-PKC シグナル経路を遮断する新規化合物による抗腫瘍進展効果  
第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会、2016 年
11. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメインは同種多量体形成によって癌細胞の運動能を促進する  
BMB2015、2015 年
12. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメインは同種複合体形成によって癌細胞の運動能を制御する  
第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年
13. 澤山忠司、上北尚正  
CDCP1 細胞外ドメインは同種多量体形成によって癌細胞の運動能を制御する  
第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会、2015 年

## 5. 研究組織

- (1) 研究代表者  
上北 尚正 (UEKITA TAKAMASA)  
防衛大学校・応用科学群・准教授

研究者番号：50373402

- (2) 研究分担者  
該当者なし
- (3) 連携研究者  
該当者なし