

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：46402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08951

研究課題名(和文) 癌転移抑制分子Nm23-H1の分子間相互作用に基づく胃癌転移機構の解明とその制御

研究課題名(英文) The mechanism of metastasis and metastasis suppression in gastric carcinoma by molecular interactions between intracellular target molecules and metastasis suppressor protein Nm23-H1

研究代表者

村上 雅尚 (MURAKAMI, MASANAO)

高知学園短期大学・その他部局等・准教授(移行)

研究者番号：80571017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は癌転移抑制分子Nm23-H1の細胞内標的分子候補を見出してきた。Nm23-H1分子と標的分子の関わりを検討し、がん細胞がいかにして移動能を獲得し転移を可能にしたかを調べた。大腸がん、大腸腺腫症で発現しAPCにより活性化されるAsef2分子がNm23-H1の発現を認めない高転移性胃癌細胞株でその発現を認めた。Asef分子のGEF活性が優位になった結果がん細胞の運動能が亢進した。乳がん、膵臓がんの増殖・進展に関連するG3BP分子も結合標的分子であったが、結合強度に差があった。各G3BP分子は異なる機能を有することが知られ、共発現細胞では両分子が顆粒形成をして細胞質に共局在するのを認めた。

研究成果の概要(英文)：We had identified several molecules as a target protein of metastasis suppressor protein Nm23-H1. To clear the mechanism of how cancer cells were obtained ability of migration, we investigated the relationship between Nm23-H1 and candidate of binding proteins which we identified previously. Asef2 was identified as a target protein of Nm23-H1, which was stimulated by adenomatous polyposis coli. The GEF activity of Asef was enhanced in scirrhous type gastric carcinoma cell lines and then led to high migration activities, however exogenous Nm23-H1 again suppressed GEF activity. G3BP1, 2a and 2b (G3BPs) that are associated with breast cancer and pancreatic cancer, were also bound to Nm23-H1, but there was a difference in the binding strength. Each G3BP molecules have different functions. G3BP1 is known to associate with stress granules formation. Co-transfected cells of G3BPs and Nm23-H1 showed co-localization in the cytoplasm as punctate signals and in all cases.

研究分野：腫瘍ウイルス学

キーワード：胃がん がん転移抑制 Nm23-H1 Asef G3BP

1. 研究開始当初の背景

nm23 遺伝子は癌転移抑制遺伝子として初めて同定され、これまでに NME1、KAI1、KISS1 など 8 種類の癌転移抑制遺伝子が知られている。がん細胞において nm23 の遺伝子翻訳蛋白質である Nm23-H1 の発現低下とがん転移との関係が報告されるようになった。特に乳がん、メラノーマなどの癌では発現低下が顕著であることが知られる一方で、発現が増加しているがんとして神経芽腫、膵臓癌が報告されている。がんや腫瘍の転移と Nm23-H1 の発現との相関関係や予後との相関関係についての評価報告は多数あるが、Nm23-H1 の機能つまり、がん転移と転移抑制の分子メカニズムについてはほとんど未知の状態であった。Nm23-H1 は細胞内においてホモ六量体、もしくは相同性の高い Nm23-H2 とヘテロ六量体を形成し、Nm23-H1 は主に細胞質に特異的に局在している。Nm23-H1 は NDPK (nucleoside diphosphate kinase) 活性を有し、Nm23-H2 は DNA と結合し、c-Myc の転写活性があることや、転写制御で知られる PuF と同一であるという報告がある。

研究代表者は腫瘍ウイルスの一つである EB ウイルスの核抗原 (EBNA3C, EBNA1) が Nm23-H1 と結合し Nm23-H1 により抑制されていたがん細胞の運動性を回復させることや、発現局在を細胞質から核内へと変えることを発見した。これは腫瘍ウイルスがヒトにがんを起こす以外でがんの悪性性に関与する機能として世界で初めての報告となった。この報告以降 EB ウイルス以外のその他の腫瘍ウイルス (KSHV, HPV, HCV) の抗原による Nm23-H1 の制御とがん転移についての報告が続き、腫瘍ウイルスは発がんだけでなく、がん転移をも制御することが知られるようになった。我々は、*in vitro* 系で明らかにされた癌細胞の運動性回復の結果はマウスを用いた実験で検証しがん転移の抑制とウイルス抗原によるがんの転移能回復を動物モデルでも証明した。

我々は更に EB ウイルス感染のないびまん性大細胞 B リンパ腫から見出された onco-protein Dbl-1 が Nm23-H1 と結合し、EB ウイルス抗原と同様に腫瘍細胞の運動性を回復させることを見出した。ウイルス非感染リンパ腫細胞において Dbl-1 からのシグナルは Rho family 蛋白質分子の Cdc42 や Rac1 を介して、リンパ球細胞の運動性 (浸潤) の亢進に繋がっている。しかし、Nm23-H1 を外部から遺伝子導入により発現させると、細胞の運動性が抑えられる現象を証明した。つまり、腫瘍ウイルスの感染後発現されるウイルス抗原やびまん性大細胞 B リンパ腫で見られる onco-protein は、本来細胞で発現しているがん転移抑制蛋白質 Nm23-H1 と直接結合することで細胞情報伝達を乗っ取り、細胞の運動性制御を不能にし、がんの転移・浸潤を可能にしていることを明らかにした。また、外部から Nm23-H1 の補充または、ウイルス抗原や

onco-protein を標的とした治療無しには転移を抑制することは難しいことを示してきた。

がん転移の分子メカニズムの理解と Nm23-H1 によるがん転移を抑制するメカニズムの解明に向け、我々はリンパ球細胞を用いた研究を行い種々の分子を同定し証明を行ってきた。同時に、動物実験にて乳がん細胞の転移を Nm23-H1 単独で抑制できたことや、がん細胞内において actin network の構築に重要な役割を担っている Rho family 蛋白質分子の活性化が細胞運動能を亢進していることを現象として観察してきた。そして、Nm23-H1 がその活性化を抑制したことから、actin network が発達し大きな細胞質を持つ上皮細胞内には Nm23-H1 の未知作用標的分子が存在すると考え、新規標的分子の同定を質量分析法 (MALDI-TOFMS 解析法) を行い、細胞骨格形成分子 8 種、細胞接着関連分子 4 種、情報伝達分子 20 種、その他機能不明分子 12 種を標的分子候補として先の研究で見出してきた。

2. 研究の目的

酵素活性を有するがん転移抑制分子 Nm23-H1 の細胞内での標的分子との分子間相互作用の影響について検討することを目的とする。実際に、我々がこれまでに証明してきた「ウイルスとがん転移」で用いた EB ウイルスは、腫瘍ウイルスである一方、多くの人が既感染している。患者にだけ有効な治療法・治療薬でなければいけないことから、がん転移抑制分子によるシグナル経路や転移の分子メカニズムを理解し解明することは、がん治療及びがん転移に対する新規治療薬や治療法の開発に幅広い分野から展開できることが期待され有用である。

3. 研究の方法

質量分析 (MALDI-TOF MS 解析) の結果より、Mascot search engine を使用し新規標的候補分子を選定してある。その結果のうちこれまでの我々の経験を活かすため (1) Rho family 蛋白質分子関連の Asef2 と Nm23-H1 についての継続研究 (2) がん細胞のあらゆるシグナルの中継分子として知られる Ras 分子の活性化に関連する G3BP1, G3BP2 と Nm23-H1 について *in vitro* および *in vivo* に於いて分子レベルでの解析を行った。

4. 研究成果

Asef2 と Nm23-H1 の *in vitro* および *in vivo* における物理的結合性とがん細胞の運動性に及ぼす影響は先の科研費プロジェクトで報告済み。その後の継続研究として (1)

Asef 分子による Cdc42 分子に対する GEF 活性を計測した結果、Asef 分子は Cdc42 分子を活性化誘導した。また、Nm23-H1 分子は Cdc42 分子の活性化を半減 (Vector 対照に比して) させた。更に Asef 分子と Nm23-H1 分

子の共発現細胞においては Vector 対照レベルにまで Cdc42 に対する活性化が低下した。

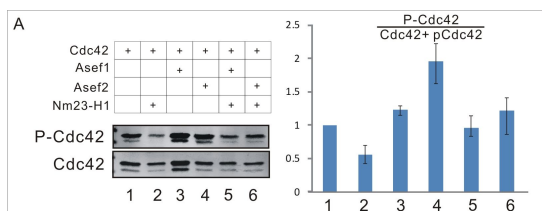


Fig.1 COS7 細胞を用いて Asef 分子の Cdc42 に対する GEF 活性の測定。レポーター分子として Cdc42 に焦点を絞り、p-Cdc42/total Cdc42 の値をシグナル強度から求め、Cdc42 だけを導入した細胞の値を 1 として比較した。

Nm23-H1 の標的分子として Asef を見出す際に用いたスキルタイプ胃癌細胞株における内在性 Asef による Cdc42 分子に対する GEF 活性を計測した。Cdc42 分子の活性化は細胞株によりその強度が異なっていたが全ての株で高い GEF 活性を示した。また、Nm23-H1 をそれらの細胞株に外部導入し発現させたところ、いずれの細胞株も Cdc42 の活性化が 40%以下に低下した。更に、Asef 分子を活性化させる変異型 APC 分子を発現させた場合、Vector 対照に比べ 2-4 倍に活性が伸びたが、Nm23-H1 分子を共発現させると、活性化された強度から 40-50%レベルに低下した。これは無処理の Vector 対照より高い数値であり、おそらく APC により活性化される分子が Nm23-H1 の制御を受けることなく Cdc42 を活性化する別の新たなシグナル経路が存在する可能性を示唆した。

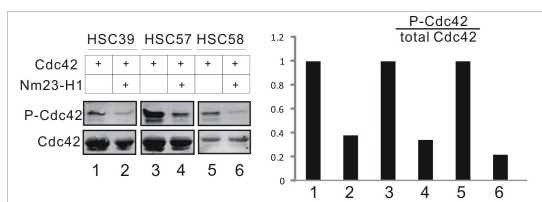


Fig.2 内在性 Asef による Cdc42 分子に対する GEF 活性の測定。レポーターとして Cdc42 を導入した各胃癌細胞株において p-Cdc42/total Cdc42 の割合を求め、それを 1 として、Nm23-H1 を導入した各細胞株の抑制レベルを比較した。

(2) G3BP1, G3BP2a 及び G3BP2b 分子と Nm23-H1 との結合性は in vitro および in vivo において複数の実験系で確認したが、G3BP2b との結合だけが全ての実験系で弱い結合性を示した。G3BP2a 分子と G3BP2b 分子の違いは中央部分に 33aa の PxxP motif 1 つ分の差があり、その他の domain は一致する。このことから 3 次構造上でズレが生じることから結合性が弱くなったと考えられた。

細胞内における局在性は全分子で顆粒形成し Nm23-H1 との共同在性は Z 軸撮影結果からも核以外の細胞質全体に共同在して広がっていた。

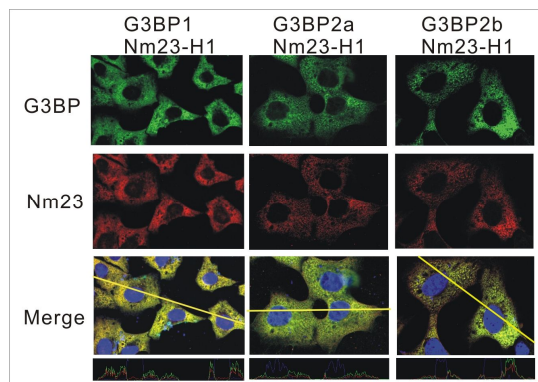


Fig.3 G3BP1, G3BP2a, G3BP2b 分子と Nm23-H1 の細胞内局在性を共焦点レーザー顕微鏡にて検射。

G3BP 分子は各分子ごとに異なる機能活性を持つことが知られており、それは細胞株、組織により異なることから分子間結合による相互作用がもたらす機能的影響については今後の継続研究にて解明する。

以上の研究結果より高転移性の胃癌特にスキルタイプ胃癌細胞株においては、他のがんにおいて転移・悪性に関与が指摘されていた分子 (Asef, G3BP) が細胞の運動性に大きく関わっていたことが明らかとなった。またその機構は、Rho family 分子に対し GEF 活性を示し、標的分子を活性化することで寄与していた。一方、転移抑制分子である Nm23-H1 はそれらの分子と結合することで Rho family 分子の活性化を抑制していることを明らかにした。しかし、Nm23-H1 の抑制能だけでは完全に Rho family 分子の活性を抑えることができておらず、また細胞運動能も完全に抑えられていない点から、新たなシグナル経路の存在が考えられた。これらは今後の継続研究にて行う予定である。

現在学術雑誌に投稿準備中である。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Yumiko Hashida, Kimiko Nakajima, Hideki Nakajima, Takeo Shiga, Moe Tanaka, Masanao Murakami, Shigenobu Matsuzaki, Seiji Nganuma, Naoki Kuroda, Yasutaka Seki, Harutaka

- Katano, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata. High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. *J. Clin. Virol.* 査読有、2016, 82:101-107.
2. Yumiko Hashida, Mikio Kamioka, Moe Tanaka, Sena Hosokawa, **Masanao Murakami**, Kimiko Nakajima, Hiroaki Kikuchi, Mikiya Fujieda, Sshigetoshi Sano, Masanori Daibata. Ecology of Merkel cell Polyomavirus in Healthy Skin among an Asian Cohort. *Journal of Infectious Diseases.* 査読有、2016, 213(11):1708-1716.
3. Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, **Masanao Murakami**, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, and Masanori Daibata. Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infect Agent Cancer.* 査読有、2015 Jan.27, 10:3.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Tanaka M, Hashida Y, **Murakami M**, Shigenobu M, Daibata M. Phylogenetic analysis of Merkel cell polyomavirus based on full-length LT and VP1 sequences derived from normal skin of healthy individuals. *The 64th conference of Japanese Society for Virology (Sapporo, Japan)* Oct. 2016
2. Hashida Y, Tanaka M, **Murakami M**, Shigenobu M, Daibata M. Epidemiological study of Merkel cell polyomavirus in healthy skin among healthy individuals in Japan. *The 64th conference of Japanese Society for Virology (Sapporo, Japan)* Oct. 2016

3. Hashida Y, Taniguchi A, Yawata T, Hoshikawa S, Tanaka M, **Murakami M**, Kamioka M, Hiroi M, Ueba T, Daibata M. Virus infection in glioblastoma multiform (GBM): Possible association of human papillomavirus with pathogenesis of GBM. *The 63rd conference of Japanese Society for Virology (Fukuoka, Japan)* Nov. 2015
4. Mstuzaki S, Ohhara N, Taniguchi H, Yamasaki T, Ujihata T, **Murakami M**, Daibata M. Viability of *Mycobacterium smegmatis* phages after long term stock. (*Mycobacterium smegmatis*バクテリオファージの長期保存状態における生存率) *The 68th regional conference of Japanese Society for Bacteriology (Okayama, Japan)* Oct. 2015
5. **Murakami M**, Hashida Y, Kamioka M, Kawasaki Y, Yanagihara K, Matsuzasi S, Akiyama Tetsu, Daibata M. Nm23-H1 regulates cell migration via interaction with Asef1 and Asef2. *The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Nagoya, Japan)* Oct. 2015
6. Uchiyama J, Kurokawa K, Sakaguchi Y, Uchiyama-Takemura I, Ujihara Takako, **Murakami M**, Daibata M, Matsuzaki S. Analysis of receptor molecules to various *Staphylococcus aureus* phages. *The 88th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology (Gifu, Japan)* March. 2015

〔図書〕(計 1 件)

1. 松崎茂展 氏原隆子 **村上雅尚** 大畑雅典. ‘ウィローム バクテリオファージ療法’ 臨床と微生物 2015、 42(6): 697-701.

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

村上 雅尚 (MURAKAMI MASANAO)
高知学園短期大学・医療衛生学科・准教授
研究者番号：80571017

(2) 研究分担者

大畑 雅典 (DAIBATA MASANORI)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・教授
研究者番号：50263976

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Derek Kennedy
グリフィス大学・エスキティス研究所・准
教授