

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2005 ～ 2009
 課題番号： 17014040
 研究課題名（和文） Src キナーゼシグナルとがん細胞の接着・運動制御
 研究課題名（英文） Regulation of cell attachment and motility by Src-mediated signal pathways.

研究代表者

浜口 道成 (Hamaguchi Michinari)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・総長
 研究者番号：90135351

研究成果の概要（和文）： Src キナーゼは乳癌、大腸癌などで活性が報告されている。我々は Src キナーゼによるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の分泌の亢進がどのように制御され細胞の浸潤が促進されるのかを調べてきた。我々は今回の研究を通し、サイトカインである TNFalpha, また IL-1beta が Src、FAK のシグナルを介して MMP の分泌を促進し、浸潤を亢進することを明らかにした。また、一酸化窒素により、Src, FAK がニトロソ化され、その活性が亢進し、それが癌細胞の浸潤へとつながることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The Src kinase is often activated in breast cancer and colon cancer. We have been investigating the mechanisms of how Src kinase activates MMP secretion and enhances cell invasion. We have found cytokines such as TNFalpha and IL-1beta activated Src and FAK, which was required for the stimulation of MMP-9 secretion and cell invasion. We also found that nitric oxide induced cell invasion, which was dependent on the activation of FAK and Src by S-nitrosylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,400,000	0	8,400,000
2006 年度	9,800,000	0	9,800,000
2007 年度	9,800,000	0	9,800,000
2008 年度	8,700,000	0	8,700,000
2009 年度	8,700,000	0	8,700,000
総計	45,400,000	0	45,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Src, FAK, MMP, invasion, cytokine, nitric oxide

1. 研究開始当初の背景

原癌遺伝子である Src はヒト乳がん、大腸癌などでその活性が亢進していることが報告されており、実験系において癌細胞の浸潤、転移に関与していることが報告されている。しかしながら、その明確な浸潤、転移機構に

関しては不明である。我々は Src の様々なシグナル伝達経路について研究を重ねてきた。とくに活性型である v-Src を発現したモデル細胞を用いて Src が RAS/MEK/ERK のシグナルを活性化し、細胞外マトリックスを破壊するマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）

を活性化すること、また Src シグナル系はヒアルロン酸合成を亢進し、細胞周囲にヒアルロン酸の豊富なマトリックスを形成し、ヒアルロン酸—CD44 のシグナルを介して細胞の運動と MMP の分泌を促進することを報告してきた。

2. 研究の目的

これまでの研究で Src が RAS/MEK/ERK 経路を活性化し、MMP の分泌を促進することを明らかとしている。そこでさらに Src がどのようなシグナル経路を介して MMP の分泌を促進するのかを調べ、癌の浸潤を制御する様々な機構を明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

(1). 細胞、サイトカインによる刺激、Src, FAK の活性化の検討

ラット由来の線維芽細胞、3Y1 細胞、そして 3Y1 細胞に v-Src を導入した SR3Y1 細胞を主に用いた。また乳がん、胆管癌由来の細胞株などを用いた。これらの細胞を様々なサイトカイン、ホルモンなどで刺激し、FAK, Src などの活性をリン酸化特異的抗体をもちいて観察した。

(2). 動物実験

胆管癌由来の HUCCT1 細胞 1×10^7 個をそれぞれのマウスの腹腔内に移植し、約一月増殖させる。その後 PBS、コントロール siRNA、または Nek2siRNA をマトリックスと混ぜ、腹腔内に 4 回打ち込み、そして癌細胞の増殖を観察した。

4. 研究成果

(1). サイトカインによる MMP 分泌の促進、細胞の浸潤の亢進には FAK が重要である。

TNFalpha や IL-1beta などのサイトカインは癌細胞の浸潤、転移に関与していることが報告されている。そこで我々はそのメカニズムの解明に取り組んだ。細胞をこれらのサイトカインで刺激すると、細胞の接着斑に局在する Focal Adhesion Kinase (FAK) のリン酸化が亢進し、酵素活性が上昇することを見出した。また、これらのサイトカインの刺激により胆管癌、乳癌由来の細胞の浸潤が促進し、MMP の分泌が上昇することが判明した。FAK の活性化が細胞の浸潤に重要であるか検討するため、FAK の発現を siRNA を用いて抑制し、細胞のサイトカイン刺激下における浸潤を検討した。すると FAK の発現抑制により、サイトカイン刺激による細胞の浸潤、そして MMP の分泌が顕著に抑制されることが判明した。また、FAK の下流のシグナル分子である RAS, ERK などの分子の活性も FAK の発現抑制により抑えられた。FAK はサイトカインによる RAS, ERK などの刺激を制御し、細胞の

浸潤を制御する可能性が示された。Invadopodia は癌細胞が細胞外基質に浸潤するときに伸ばすダイナミックな突起様の構造体である。しかしこの構造体がどのような機構でできるのが不明である。IL-1beta の刺激により、Invadopodia の形成が促進されることが判明した。この形成に必要なシグナルを検討したところ、SHP-2 という分子が重要であることが判明した。また、FAK, Src などの発現を抑制することによっても Invadopodia の形成が抑制された。この結果、Src, FAK, そして SHP-2 がサイトカインの刺激による Invadopodia の形成に重要な働きをしていると考えられる。

(2). Nek2 の発現は胆管癌でその発現が亢進し、その発現抑制は癌の増殖を抑制する。

胆管癌は手術が主な治療法であるが、多くの場合、発見時には進行しており、手術による効果は期待できない。抗がん剤も効果的なものがなく、手術できない症例はほとんど治療効果が期待できない。近年癌の治療において分子標的治療が効果を発揮している。そこで胆管癌における分子標的治療を開発するため、癌で発現が亢進している分子の探索をおこなった。そして Nek2 というプロテインキナーゼの発現が胆管癌由来の多くの細胞、そして組織で発現が亢進していることを発見した。そして Nek2 を標的とした治療が開発できるか、様々な胆管癌由来の細胞に Nek2 に対する siRNA を導入し、その効果を検討した。Nek2 は中心体に局在し、中心体の形成を制御している報告がある。胆管癌細胞の Nek2 の発現を抑制すると、癌細胞の増殖が抑制され、多くの細胞がアポトーシスをおこすことが明らかとなった。正常細胞では Nek2 の発現を抑制しても大きな変化は観察されなかった。次に動物モデルを用いて Nek2 抑制の癌細胞の増殖における効果を検討した。マウスの腹腔内に胆管癌由来の細胞である HUCCT1 細胞を移植し、そして Nek2 に対する siRNA を導入し、その効果を検討した。移植した癌細胞に siRNA が導入されること、そして Nek2 の発現が抑制されることを確認した。siRNA の導入によりマウスにおける移植した癌細胞の増殖は顕著に抑制され、またマウスの生存も改善した。皮下移植された癌細胞に Nek2siRNA を導入しても同様の結果が得られた。この結果は Nek2 を標的とした癌治療の可能性を示唆する。

また、我々は TLK1 というプロテインキナーゼが胆管癌でその発現が亢進していることを見出した。TLK1 の発現を抑制しても癌細胞の増殖に変化が見られなかった。胆管癌の治療として、シスプラチン、ゲムシタビンの 2 種類の抗がん剤が使われている。これらの抗がん剤は DNA に損傷を与える。また、TLK1 は

DNA 損傷の修復に関与していることが報告されている。そこで我々は TLK1 の発現抑制が抗がん剤に対する感受性を亢進するかを調べた。胆管癌細胞に TLK1 に対する siRNA を導入し、そして細胞をシスプラチン、またはゲムシタビン存在下で培養した。TLK1 の発現抑制により、シスプラチンによる細胞障害性が亢進したが、ゲムシタビンにおける細胞障害性の亢進は観察されなかった。TLK1 発現抑制により、シスプラチンによる DNA 損傷が促進され、そして細胞死が顕著に誘導された。この結果は、TLK1 の機能を抑制することで、胆管癌のシスプラチンに対する感受性が亢進することを示し、TLK1 が癌治療の標的分子となりえる可能性を示唆する。

(3). システインのニトロソ化が Src の活性を制御し、癌細胞の浸潤を促進する。

Src は膜結合型のチロシンキナーゼであり、細胞の増殖、分化など多くの生理的な役割を担っている。Src の活性は主にチロシンのりん酸化によってなされている。C 末端のチロシンがりん酸化されると、その部位は Src の SH2 領域と分子内結合し、そして酵素が閉じた構造をとることで、不活性化する。また、キナーゼ領域の自己りん酸化が酵素活性を制御している。酵素活性の制御は様々な方法で行われるが、Src の活性は主にりん酸化により制御されると考えられてきた。我々は以前より Src の酵素活性制御にシステイン残基が重要な働きを担っていることを報告してきた。システインと結合する薬剤、また水銀などの重金属が Src のシステインに結合し、その活性を制御することを見出してきた。また、一酸化窒素 (NO) が Src の活性を顕著に亢進することを報告している。今回我々は Src の NO による活性が、Src の C 末端に存在する 498 番目のシステインのニトロソ化によるものであることを明らかにした。細胞を SNAP という NO 産生試薬で刺激すると、Src が活性化する。このときの Src のニトロソ化をビオチンスイッチ法を用いて検討したところ、Src がニトロソ化されることが見出された。さらにニトロソ化に重要なシステインを同定するため、Src のシステインをそれぞれアラニンに変換し、NO による活性化を検討した。その結果、498 番目のシステインをアラニンにかえた C498A-Src では、NO による活性化が観察されなかった。さらに C498A-Src を発現した細胞を作成し、その影響を調べた。すると、野生型 Src に対し、SNAP 刺激による活性が低下し、また細胞の運動能が抑制されることを見出した。また SNAP 刺激後、C498A-Src のニトロソ化は野生型のニトロソ化に比べ、低下していた。この結果は、Src の 498 番目のシステインが NO によりニトロソ化され、そして活性化され、

細胞運動を亢進することを示唆する。さらに癌細胞における浸潤に Src のニトロソ化が関与しているかを検討した。MCF7 細胞は乳癌由来の細胞である。性ホルモンであるエストロゲンは乳癌の形成に関与している。そこで、エストロゲン刺激による細胞の浸潤を検討したところ、MCF7 細胞はエストロゲン存在下でその浸潤が亢進することが観察された。MCF7 細胞をエストロゲンで刺激すると NO 産生酵素である eNOS の発現が亢進することが報告されている。そこでエストロゲン刺激による NO の産生を検討したところ、24 時間後に NO の産生が促進していることが確認された。さらに Src の活性を検討したところ、エストロゲンにより Src が活性化され、そしてその活性化は NO 合成阻害剤で抑制されることが判明した。また、エストロゲンにより、Src がニトロソ化されることが明らかとなった。C498A-Src を MCF7 細胞に導入すると、野生型 Src に比べその活性は減少しており、またニトロソ化も抑制されていた。さらに C498A-Src を発現すると、エストロゲンによる浸潤の亢進が抑制された。これらの結果は、NO が Src の 498 番目のシステインをニトロソ化し、そしてその酵素活性を制御し、細胞の浸潤を促進することを示唆する。

(4). V-Src によるギャップ結合の抑制は Ras、AKT の活性化に依存的である。

細胞間には小さなイオンなどを交換するトンネルのような結合が存在し、それをギャップ結合と称する。ギャップ結合はコネキシンという一群のタンパク質のファミリーにより形成されている。V-Src などの癌遺伝子により癌化した細胞ではギャップ結合が抑制されることが知られている。しかしながら、v-Src によるギャップ結合の抑制の機構はいまだ明らかでない部分がある。Ras は様々な刺激により活性化される GTP 結合タンパク質である。V-Src を細胞に発現させると、Ras が活性化されることが知られている。そこで我々は、Ras が v-Src によるギャップ結合の抑制に重要であるかを検討した。V-Src 癌化細胞にドミナントネガティブ型の Ras を誘導的に発現できる細胞株を作成し、Ras の活性を一過性に抑制し、ギャップ結合を観察した。ギャップ結合は細胞に蛍光色素をマイクロインジェクションで導入し、その色素が周囲の細胞に広がっていく様子でその機能を定量できる。ギャップ結合が正常ならば、周囲の細胞に色素が広がっていき、癌細胞などでギャップ結合が抑制されていると、色素は広がっていかない。Ras の活性を抑制すると v-Src 癌化細胞におけるギャップ結合が有意に回復した。また、薬剤などを使って一過性に Ras の活性を抑えても同様の結果が得られた。

次に我々は AKT というプロテインキナーゼの役割についても検討した。V-Src 癌化細胞にドミナントネガティブ型の AKT を導入し、ギャップ結合を調べたところ、有意に回復した。また、薬剤を用いて AKT の活性を抑制しても同様な結果が得られた。これらの結果より、v-Src によるギャップ結合の抑制は Ras と AKT が重要な働きをしていると考えられる。

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 17 件) (全て査読有)

1. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion.

Rahman MA, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi M.

J Biol Chem. 2010 285(6): 3806-3814

2. Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma. Tsunoda N, Kokuryo T, Oda K, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y, Hamaguchi M. **Cancer Sci.** 2009 100(1): 111-116

3. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. **Exp Cell Res.** 2009 315(8):1384-92.

4. Characterization of interaction between CLP36 and palladin. Maeda M, Asano E, Ito D, Ito S, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T. **FEBS J.** 2009 276(10):2775-85.

5. Phosphorylation of histone H3 at Ser10: its role in cell transformation by v-Src. Tange S, Ito S, Senga T, Hamaguchi M. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 386(4):588-92.

6. Human papillomavirus type 16 oncoprotein E7 suppresses cadherin-mediated cell adhesion via ERK and AP-1 signaling. Yuan H, Ito S, Senga T, Hyodo T, Kiyono T, Kikkawa F, Hamaguchi M. **Int J Oncol.** 2009 35(2):309-14.

7. Three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning for analysis of invasive capacity of BALB/3T3/v-src.

Okochi M, Takano S, Isaji Y, Senga T, Hamaguchi M, Honda H.

Lab Chip. 2009 9(23) 3378-84

8. The cysteine-cluster motif of c-Src: its role for the heavy metal-mediated activation of kinase. Senga T, Hasegawa H, Tanaka M, Rahman MA, Ito S, Hamaguchi M. **Cancer Sci.** 2008 99(3):571-5.

9. MEK inhibitor enhances the inhibitory effect of imatinib on pancreatic cancer cell growth. Takayama Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y, Senga T, Hamaguchi M. **Cancer Lett.** 2008 264(2):241-9.

10. The cysteine-cluster motif of c-Yes, Lyn and FAK as a suppressive module for the kinases. Rahman MA, Senga T, Oo ML, Hasegawa H, Biswas MH, Mon NN, Huang P, Ito S, Yamamoto T, Hamaguchi M. **Oncol Rep.** 2008 19(4):975-80.

11. A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. Huang P, Senga T, Hamaguchi M. **Oncogene.** 2007 26(30):4357-71.

12. SIRPalphal and SIRPalpha2: their role as tumor suppressors in breast carcinoma cells. Yamasaki Y, Ito S, Tsunoda N, Kokuryo T, Hara K, Senga T, Kannagi R, Yamamoto T, Oda K, Nagino M, Nimura Y, Hamaguchi M. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007;361(1):7-13

13. A role for SHPS-1/SIRPalpha in Concanavalin A-dependent production of MMP-9. Ruhul Amin AR, Uddin Biswas MH, Senga T, Feng GS, Kannagi R, Agarwal ML, Hamaguchi M. **Genes Cells.** 2007 (9):1023-33.

14. Nek2 as an effective target for inhibition of tumorigenic growth and peritoneal dissemination of cholangiocarcinoma. Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y, Hamaguchi M. **Cancer Res.** 2007 67(20):9637-42.

15. v-Src requires Ras signaling for the suppression of gap junctional intercellular communication. Ito S, Ito Y, Senga T, Hattori S, Matsuo S, Hamaguchi M. **Oncogene.** 2006 25(16):2420-4

16. A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor- α -dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. Mon NN, Hasegawa H, Thant AA, Huang P, Tanimura Y, Senga T, Hamaguchi M. **Cancer Res.** 2006 66(13):6778-84

17. SHP-2-Erk signaling regulates concanavalin A-dependent production of TIMP-2. Biswas MH, Hasegawa HH, Rahman MA, Huang P, Mon NN, Ruhul Amin AR, Senga T, Kannagi R, Hamaguchi M. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006 348(3):1145-9.

[学会発表] (計15件)

1. 発表者 高原悠子、千賀威、浜口道成
Role of Pinch-1 for integrin signaling
学会名 日本生化学会
発表年月日 平成20年12月12日
発表場所 神戸

2. 発表者 浅野恵理、千賀威、浜口道成
細胞分裂期における palladin のリン酸化
学会名 日本生化学会
発表年月日 平成20年12月9日
発表場所 神戸

3. 発表者 千賀威、ラーマンアミナー、浜口道成
NO シグナルと癌の浸潤転移
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成20年10月28日
発表場所 名古屋

4. 発表者 丹下正一郎、浜口道成
A Role for Ras Signaling on Histone H3 Ser10 Phosphorylation in Cells Transformed with Oncogenic Tyrosine Kinase, v-Src.
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成20年10月28日
発表場所 名古屋

5. 発表者 ナイナイモン、伊藤聡子、千賀威、浜口道成
Focal Adhesion Kinase regulates proinflammatory cytokine IL-1 β -dependent MMP-9 production
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成20年10月28日
発表場所 名古屋

6. 発表者 丹下正一郎、浜口道成
v-Src によるヒストン H3 のリン酸化は Ras シグナルが関与する。
学会名 日本生化学会
発表年月日 平成19年12月13日
発表場所 横浜

7. 発表者 浜口道成
癌の浸潤転移と Src/Shp-2 シグナル
学会名 日本生化学会
発表年月日 平成19年12月12日
発表場所 横浜

8. 発表者 兵頭寿典、伊藤聡子、千賀威、浜口道成
ギャップ結合機能における SHP-2 の機能解析
学会名 日本生化学会
発表年月日 平成19年12月12日
発表場所 横浜

9. 発表者 角田伸行、山崎由紀子、伊藤聡子、千賀威、二村雄次、浜口道成
Nek2siRNA を用いた乳癌の分子標的治療の開発
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成18年9月29日
発表場所 横浜

10. 発表者 ラーマンアミナー、千賀威、浜口道成
一酸化窒素による細胞運動の亢進、浸潤の機構
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成18年9月28日
発表場所 横浜

11. 発表者 山崎由紀子、伊藤聡子、角田伸行、千賀威、二村雄次、浜口道成
乳癌細胞における SHPS-1 の腫瘍抑制効果
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成18年9月28日
発表場所 横浜

12. 発表者 伊藤聡子、千賀威、山崎由紀子、浜口道成
v-Src によるギャップ結合よく背における Ras シグナルの役割
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成18年9月28日
発表場所 横浜

13. 発表者 長谷川仁、兵頭寿典、千賀威、浜口道成
Suppression of cell spreading by v-Crk requires AP-1 dependent transcription
学会名 IUBMB International Congress of

Biochemistry and Molecular Biology
発表年月日 平成18年6月21日
発表場所 京都

14. 発表者 伊藤聡子、千賀威、浜口道成
The role of gap junctional intercellular
communication and protein kinase Akt in
osteosarcoma metastasis
学会名 IUBMB International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology
発表年月日 平成18年6月21日
発表場所 京都

15. 発表者 ヒーラルビスワス、千賀威、伊藤聡子、浜口道成
Role of SHP-2 in v-Src-induced MMP-2
production and cell invasion
学会名 IUBMB International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology
発表年月日 平成18年6月21日
発表場所 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜口 道成 (Hamaguchi Michinari)
名古屋大学・大学院医学系研究科・総長
研究者番号：90135351

(2) 研究分担者

千賀 威 (Senga Takeshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80419431