

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07219

研究課題名（和文）新規標的分子PLEKHA5を介したMet特異的ながん悪性化シグナル機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Met specific signaling for cancer malignancy mediated by a novel target molecule PLEKHA5

研究代表者

山口 英樹（Yamaguchi, Hideki）

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長（移行）

研究者番号：10345035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Metは受容体型チロシンキナーゼの1つであり、様々ながんで異常な活性化がみられる。Metは特に浸潤転移、再発、治療抵抗性などがん悪性化に深く関わる。我々は以前、Met遺伝子増幅を持つスキルス胃がんのリン酸化プロテオミクス解析により、機能未知なタンパク質PLEKHA5を同定しスキルス胃がん細胞の増殖、浸潤、転移に関わることを見出した。本研究では、PLEKHA5がMetの下流でリン酸化され、Met依存的なスキルス胃がん細胞の生存能を制御することを明らかにした。従って、PLEKHA5は新規のMet下流シグナル分子であり、スキルス胃がんの新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Metは様々ながんで異常がみられるがん原遺伝子であり、現在多くのMet阻害剤が開発されている。しかし薬剤耐性が問題になっており、Metの下流で働く新たな治療標的の同定は重要な課題である。また、スキルス胃がんは日本に多い難治がんであり、特に腹腔内に種を播くように転移する腹膜播種を起こすことが、治療を困難にしている。本研究では、Metの新規下流分子としてPLEKHA5という分子を同定し、PLEKHA5がMet異常を持つスキルス胃がんの悪性化に必要なことを見出した。従って、本研究の成果は、スキルス胃がん含むMet異常を持つ様々ながんの新たな治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Met is a receptor tyrosine kinase and its aberrant activation has been found in a variety of carcinomas. Met has been implicated in tumor malignancy, including metastasis, recurrence, and drug resistance. We previously identified a protein called PLEKHA5 with unknown function by phosphoproteomic analysis of scirrhous gastric carcinoma (SGC) cells possessing Met gene amplification. We also revealed that knockdown of PLEKHA5 suppresses the growth, invasion, and metastasis of SGC cells. In this study, we found that PLEKHA5 is tyrosine-phosphorylated downstream of Met and regulates the survival of SGC cells with Met gene amplification. These results indicate that PLEKHA5 is a novel downstream effector of Met and may be a novel therapeutic target of SGC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Met PLEKHA5 スキルス胃癌 腹膜播種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Met は肝細胞増殖因子 (HGF) をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼであり、形態形成や組織再生における細胞増殖、生存、運動、上皮間葉転換を制御する。Met は様々ながんで遺伝子異常により活性化されるが、他の受容体型チロシンキナーゼと異なり、未分化性、浸潤転移能、治療抵抗性の獲得など、特にがん悪性化に深く関わる。従って、Met にはユニークな下流シグナル伝達経路が存在すると考えられるが、その詳細は分かっていない。

申請者は Met 遺伝子増幅を持つスキルス胃がんのリン酸化プロテオミクス解析を行い、PLEKHA5 を同定した。PLEKHA5 は、タンパク質間相互作用に関わる WW ドメインと coiled-coil ドメイン、イノシトールリン脂質に結合する PH ドメインを持つことから (図 1A)、シグナル伝達を担うアダプター分子であると推測されるが、その機能は不明である。また先行研究により、PLEKHA5 が Met 依存的にチロシンリン酸化され (図 1B)、発現抑制により Met 遺伝子増幅を持つスキルス胃がん細胞 58As9 の増殖、運動、浸潤、転移が抑制されることを見出した。従って、PLEKHA5 は新規 Met 下流シグナル伝達分子であり、がんの悪性化を抑制することが強く示唆された。さらに、PLEKHA5 の発現抑制は Met 遺伝子増幅を持たないがん細胞や正常細胞の増殖、一般的な受容体型チロシンキナーゼの下流シグナル (Ras/Erk, PI3K/Akt, Stat3) には影響を与えなかったことから、PLEKHA5 は Met 特異的かつ未知の下流シグナル伝達経路を制御している可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では Met の新規標的タンパク質と考えられる PLEKHA5 に着目し、その詳細な機能解析からがん悪性化を担う Met 特異的な新規シグナル伝達機構を解明することを目的とした (図 2)。主にスキルス胃がん細胞株を用いて、Met によるチロシンリン酸化の機序と意義、PLEKHA5 が関わる Met 下流シグナル伝達経路、臨床サンプルを用いた PLEKHA5 の病理機能の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) PLEKHA5 のリン酸化機構とその意義の解析

網羅的なリン酸化解析結果を含むデータベースの解析により、チロシンリン酸化部位の候補を抽出した。チロシンをフェニルアラニンに変換した変異体を作製し、スキルス胃がん細胞内で Met 依存的なリン酸化が変化するか、免疫沈降及びウェスタンブロットにより確認した。リン酸化特異的抗体を作製し、リン酸化変異体も利用して PLEKHA5 のチロシンリン酸化の Met 特異性、細胞内の同存在や機能について詳細に検討した。

(2) PLEKHA5 結合タンパク質の探索

Met 遺伝子増幅を持つスキルス胃がん細胞株 58As9 に Dox 誘導型の PLEKHA5-Flag コンストラクトを発現させた。Flag 抗体、PLEKHA5 抗体を用いた Tandem Affinity Purification (TAP) 法により、PLEKHA5 と結合タンパク質を精製した。SDS-PAGE 及び銀染色を行い、Dox 添加の有無により量が変動するバンドを切り出して、質量分析を行い、PLEKHA5 結合タンパク質を同定した。

(3) PLEKHA5 が関わる Met 下流シグナル伝達経路の解析

Met 遺伝子増幅を持つスキルス胃がん細胞株 58As9 に PLEKHA5 の siRNA を導入して発現抑制を行い、total RNA を抽出した。DNA マイクロアレイを用いて、PLEKHA5 の発現抑制により発現が変動する遺伝子群を抽出した。得られた遺伝子群についてエンリッチメント解析を行い、PLEKHA5 が関わるシグナル伝達経路の同定を行った。また PLEKHA5 の発現抑制を行った細胞の抽出液を使用し、抗体アレイを用いて PLEKHA5 が関わるシグナル伝達経路の同定も試みた。

(4) PLEKHA5 と胃がんの臨床病理学的特徴及び予後との関係

既存のデータベース解析により、PLEKHA5 の発現やリン酸化と胃がんの臨床病理学的特徴及び

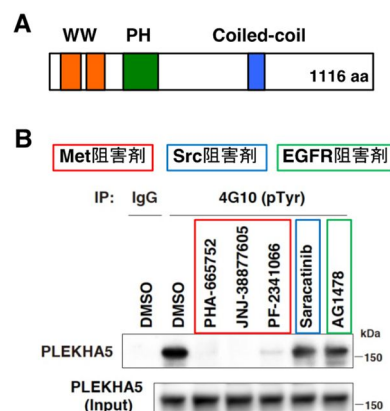


図1. PLEKHA5の構造とリン酸化

A) PLEKHA5のドメイン構造。
B) Met遺伝子増幅を持つスキルス胃がん細胞よりチロシンリン酸化タンパク質を免疫沈降し免疫ブロットングによりPLEKHA5を検出した。

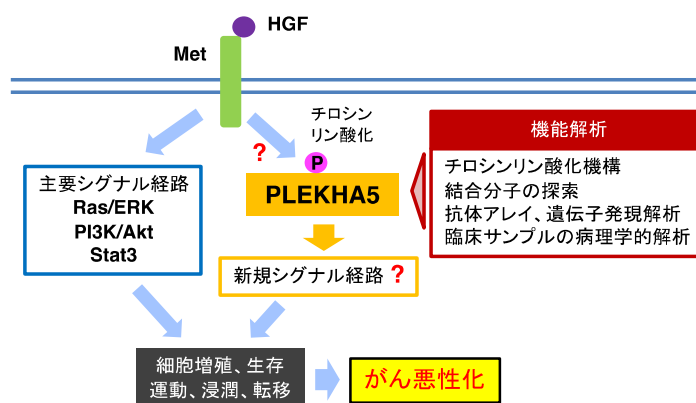


図2. Metシグナル伝達におけるPLEKHA5の機能と下流シグナルの解析

予後との関係を解析した。また胃がんの臨床サンプルを用いて免疫組織化学染色を行い、同様の解析を行った。さらに Met の発現やリン酸化、遺伝子増幅との関係性について検討を行った。

4. 研究成果

(1) PLEKHA5 のリン酸化機構とその意義の解析

まず PLEKHA5 のチロシンリン酸化部位変異体を Met と共発現させて、リン酸化の変化を調べた。その結果、Met による PLEKHA5 のリン酸化が顕著に抑制される変異体を同定した。そこで、リン酸化部位を含むペプチドを合成し、リン酸化特異的な PLEKHA5 抗体を作製した。作製した抗体を用いて、免疫沈降およびウェスタンブロットによる解析を行った結果、Met 活性依存的にリン酸化される主要なチロシンであることが確認された。

次に、リン酸化変異体をスキルス胃がん細胞に発現させ、局在への影響を調べた。野生型の PLEKHA5 は形質膜および細胞内の膜小胞様構造に局在した。一方、リン酸化変異体ではそのような局在は失われ、細胞質全体に存在していた。以上の結果から、Met によるリン酸化は PLEKHA5 の細胞膜への局在を制御すると考えられた。

(2) PLEKHA5 結合タンパク質の探索

TAP 法により、スキルス胃がん細胞内で PLEKHA5 と結合するタンパク質の探索を行った。その結果、複数の結合タンパク質を同定することに成功した。その中には、細胞間接着やシグナル伝達に関わる分子が多く存在していた。いくつかの分子については、免疫沈降や細胞内の局在解析から、実際に PLEKHA5 と結合し機能していることが確認された。

(3) PLEKHA5 が関わる Met 下流シグナル伝達経路の解析

PLEKHA5 のノックダウンにより発現が変動する遺伝子群の解析を行った。その結果、アポトーシスに関連する遺伝子群の発現が増加し、代謝に関連する遺伝子群が減少することが明らかになった。実際に、PLEKHA5 をノックダウンしたスキルス胃がん細胞では、糖代謝に異常が生じており、ストレス応答シグナルの活性化によりアポトーシスが誘導されることを見出した(図2)。

(4) PLEKHA5 と胃がんの臨床病理学的特徴及び予後との関係

胃がん患者の生存率と PLEKHA5 の発現との関連をデータベースにより解析した。スキルス胃がんを含むびまん性 (Diffuse-type) 胃がんにおいては、PLEKHA5 高発現群において有意に生存率が低いことが明らかになった(図4)。一方、腸管型 (Intestinal-type) 胃がんにおいては、有意な差が認められなかった。

以上の結果から、PLEKHA5 は Met 遺伝子増幅を持つスキルス胃がんにおいて、生存シグナルを担う重要なシグナル分子であり、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

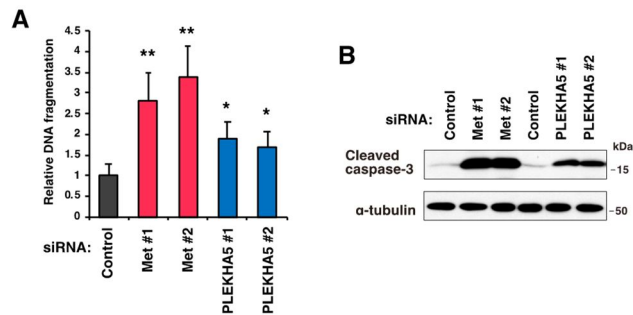


図3. PLEKHA5の発現抑制によるアポトーシスの誘導

Met遺伝子増幅を持つスキルス胃がん細胞にMetおよびPLEKHA5のsiRNAを導入し、アポトーシスの誘導を検出した。A) DNA断片化。B) Caspase-3の切断。

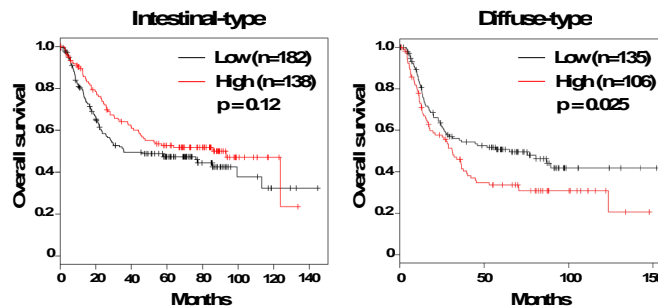


図4. PLEKHA5の発現と胃がん患者の予後との関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagamura Yuko, Miyazaki Makoto, Nagano Yoshiko, Yuki Masako, Fukami Kiyoko, Yanagihara Kazuyoshi, Sasaki Kazuki, Sakai Ryuichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 PLEKHA5 regulates the survival and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells with Met gene amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 25 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00314-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Tatsuya et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced Malignant Phenotypes of Glioblastoma Cells Surviving NPe6-Mediated Photodynamic Therapy are Regulated via ERK1/2 Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3641 ~ 3641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12123641	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoneda Atsuko, Kanemaru Kaori, Matsubara Ai, Takai Erika, Shimozawa Makoto, Satow Reiko, Yamaguchi Hideki, Nakamura Yoshikazu, Fukami Kiyoko	4. 巻 527
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1050 ~ 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyagawa T, Hasegawa K, Aoki Y, Watanabe T, Otagiri Y, Arasaki K, Wakana Y, Asano K, Tanaka M, Yamaguchi H, Tagaya M, and Inoue H	4. 巻 218
2. 論文標題 MT1-MMP recruits the ER-Golgi SNARE Bet1 for efficient MT1-MMP transport to the plasma membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 3355-3371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201808149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi S, Fujii T, Izumi Y, Fukumura Y, Han M, Yamaguchi H, Akita T, Yamashita C, Kato S, and Sekiya T	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification and characterization of a novel adenomatous polyposis coli mutation in adult pancreaticoblastoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 10818-10827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto S, Nagamura Y, Nakabo A, Okabe A, Yanagihara K, Fukami K, Sakai R, and Yamaguchi H	4. 巻 495
2. 論文標題 Aberrant alternative splicing of RHOA is associated with loss of its expression and activity in diffuse-type gastric carcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Comm.	6. 最初と最後の頁 1942-1947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.067.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Tomiyama A, Sasaki N, Yamaguchi H, Shirakihara T, Nakashima K, Kumagai K, Takeuchi S, Toyooka T, Otani N, Wada K, Narita Y, Ichimura K, Sakai R, Namba H, and Mori K	4. 巻 495
2. 論文標題 Intracellular cholesterol level regulates sensitivity of glioblastoma cells against temozolomide-induced cell death by modulation of caspase-8 activation via death receptor 5-accumulation and activation in the plasma membrane lipid raft.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Comm.	6. 最初と最後の頁 1292-1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎允、宮本真吾、柳原五吉、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングを用いたスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎允、中坊彩花、宮本真吾、柳原五吉、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 結城雅子、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 がん細胞による浸潤突起形成を指標としたハイスループットスクリーニング系の確立と阻害剤の探索
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎允、中坊彩花、宮本真吾、柳原五吉、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種巣の形成機構の解析
3. 学会等名 第29回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎允、宮本真吾、柳原五吉、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングを用いたスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本真吾、宮崎允、柳原五吉、八代正和、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 スキルス胃癌と間質線維芽細胞の直接的な相互作用に関わる分子の探索
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎允、宮本真吾、柳原五吉、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本真吾、宮崎允、柳原五吉、八代正和、堺隆一、田中正人、山口英樹
2. 発表標題 スキルス胃癌と間質線維芽細胞の直接的な相互作用に関わる分子の探索
3. 学会等名 第28回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎允、中坊彩花、宮本真吾、柳原五吉、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第28回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本 真吾、鱧屋隆博、小宮雅美、藤井元、武藤倫弘、山口英樹
2. 発表標題 ApcMin/+マウス腸ポリープ由来上皮細胞のオルガノイド形態に着目した大腸がん悪性化機構の解明
3. 学会等名 第26回 日本がん予防学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本真吾、中坊彩花、深見希代子、柳原五吉、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 びまん性胃癌におけるRhoAのsprayリング異常とそれに伴う発現および活性の低下
3. 学会等名 第77回癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中坊彩花、深見希代子、山口英樹
2. 発表標題 マルチカラー蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種機構の解析
3. 学会等名 第77回癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本真吾、中坊彩花、深見希代子、柳原五吉、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 びまん性胃癌細胞にみられたRhoAのsprayリング異常とそれに伴う発現および活性の消失
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本真吾、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 スキルス胃癌と間質線維芽細胞の直接的な相互作用に関わる分子機構の解明
3. 学会等名 第27回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐々木研究所ホームページ http://www.sasaki-institute.org 公益財団法人佐々木研究所附属佐々木研究所ホームページ http://www.sasaki-institute.org/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今井 俊夫 (Imai Toshio) (20342884)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・施設長 (82606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------