

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20013050

研究課題名（和文）

スキルス型癌の間質浸潤におけるリン酸化蛋白質の解析

研究課題名（英文）

Identification of tyrosine phosphorylated proteins in scirrhous cancer

研究代表者

田中 正光 (TANAKA MASAMITSU)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

研究成果の概要（和文）：

スキルス型胃癌に対する治療標的分子を選別するため、癌細胞が腹膜播種してゆく過程でチロシンリン酸化が亢進している蛋白質を精製し、Ossa/C9orf10、CDCP1、ARAP3 などの分子を同定した。そのなかで Ossa は癌細胞が酸化ストレスを受けた際に誘導される Src ファミリーキナーゼの新規活性化因子で、活性酸素の産生に応じて Src/PI3-キナーゼ経路を活性化し、抗アポトーシスシグナルを誘導する事を示し、癌細胞がストレスに抵抗して生存する機構のひとつを解明した。またスキルス胃癌のヌードマウスにおける腹膜播種を抑制する効果が、Ossa、CDCP1 の発現抑制、および ephrin-B1 の合成ペプチドにより確認された。

研究成果の概要（英文）：

In an attempt to identify phosphotyrosine containing proteins binding to Src family kinases (SFKs) in gastric scirrhous carcinoma, we identified Ossa/C9orf10, CDCP1 and ARAP3. Among them, Ossa, designated as Oxidative stress-associated Src activator is a novel RNA-binding protein that guards cancer cells from oxidative stress-induced apoptosis by the activation of PI3-kinase/Akt signaling through SFKs. Dissemination of intraperitoneally transplanted scirrhous gastric cancer cells was suppressed by reduced expression of Ossa or CDCP1, or treatment with synthetic peptide derived from ephrin-B1 carboxyl-terminus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,000,000	0	9,000,000
2009 年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：スキルス、胃癌、リン酸化、Src、チロシンキナーゼ、ephrin、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

癌のなかでもスキルス型癌は間質組織への浸潤性がきわめて高く、腹膜播種をおこす難治性の癌である。ヒトスキルス型胃癌由来の培養細胞は、他の浸潤性の低い胃癌細胞株に比較してチロシンリン酸化されている蛋白質が多くみられた。また同じスキルス胃癌細胞であっても、通常の培養状態に比較してマウスの腹腔内に播種した実際の癌組織ではチロシンのリン酸化レベルが亢進している蛋白質が複数認められた。そこでヌードマウスの腹腔内移植によって形成された癌の腹膜播種組織において、特異的にチロシンリン酸化レベルの亢進している蛋白質を同定し、治療標的分子の候補を選別しようと考えた。それと並行して同アプローチでこの時まで既にいくつかの分子を同定しており、それらのスキルス胃癌の進展との関連性を確認し、細胞生物学的機能を解明しようとした。

またこれまでの解析から受容体型チロシンキナーゼ Eph ファミリーに対するリガンドである ephrin ファミリーは、ヒト消化管の癌で高頻度に発現しており、とくに ephrin-B1 は浸潤性の高い腫瘍細胞で発現レベルが亢進していた。Ephrin-B1 が癌細胞の組織浸潤や腹膜播種におよぼす作用について解析を進めてきたところ、ephrin-B1 はそのリン酸化を介した経路と C 末を介した信号経路によってスキルス胃癌の播種を促進する機能を有していた。これらの経緯から、スキルス型癌の進展に対する分子標的治療の対象として ephrin-B1 に焦点を当て、スキルス型癌の進展阻止に適したツールを開発しようとした。

2. 研究の目的

本申請の目的は、主にスキルス型胃癌でその浸潤能と相関して活性化されている信号経路を蛋白質のリン酸化を指標として同定し、その信号経路を遮断することをスキルス型癌の治療に応用することである。ヌードマウスの腹腔内移植によって形成された癌の腹膜播種組織において、特異的にチロシンリン酸化レベルの亢進している蛋白質を選別、精製し、質量分析による同定をこれまでの経緯でおこなってきた。このアプローチをさらに展開するとともに、既に同定したいくつか

の分子についてスキルス胃癌の進展との関連性を確認し、細胞生物学的機能を解明するべく下流標的蛋白質の同定を行う。

またスキルス型癌で、その浸潤能と相関して活性化されている ephrin-B1 のシグナル経路をさらに解明するとともに、その経路の遮断をスキルス型癌の治療に応用する。そのための基礎実験として、ephrin-B1 の C 末を介した信号経路を遮断するツールを製作し、その効果をこれまでに行ったヌードマウスの腹膜播種のアッセイを主に用いて、スキルス型（高浸潤型）胃癌細胞株に対して評価する。

3. 研究の方法

ヒトスキルス型胃癌の播種に連結してチロシンリン酸化されている蛋白質の単離、同定：国立がんセンター研究所で樹立されたスキルス型胃癌由来の細胞株で、マウスへの正所性の移植実験で腹膜播種をおこし、高い浸潤能をもつことが既に確認されているものを用いた。チロシンリン酸化蛋白質の同定は、抗リン酸化チロシン抗体カラムで第一段階の精製をした後、Src のリン酸化チロシン結合ドメインによる第二段階の精製を行い、目的蛋白質をゲル上で分離して質量分析法により同定した。特に、ヌードマウスで腹膜播種した癌組織において通常の培養状態よりチロシンリン酸化レベルの亢進している蛋白質を上記のアプローチにより選別した。

得られた候補分子につき、それぞれの特異的抗体でスキルス癌組織における発現状態、リン酸化レベルの亢進を確認した後、細胞生物学的機能の検索を行った。

Ephrin-B1 の信号伝達遮断ツール：

ephrin-B1 の C 末部位に対応するペプチドを設計し、細胞内に導入するために HIV などの細胞膜透過シグナルを付加した融合ペプチドを合成した。同ペプチドを培地中に添加する事で細胞に作用させ、ephrin-B1 の C 末部位を介したシグナル伝達を阻害する。その効果を判定するために、同じ配列をスクランブルにしたペプチドを対照として、細胞内にとりこまれたペプチドの持続時間やその細胞内局在性を検討した。スキルス癌の in vivo での進展に対する効果を評価するため、ヌードマウス腹腔内に同ペプチドを注入するこ

とで、あらかじめ腹腔内に移植したスキルス癌細胞への導入効率を検討し、腹腔内播種が軽減されるかを評価した。

4. 研究成果

スキルス胃癌細胞が腹膜播種してゆく過程でチロシンリン酸化が亢進している蛋白質を複数同定した。そのなかでOssaは、癌細胞が血流の変化や放射線、化学療法などによる酸化ストレスに曝された際に、それに抵抗して生存する機構に関する事を発表した。

Ossa (Oxidative stress associated Src activator) は細胞が酸化ストレスを受けた際に誘導されるSrcファミリーキナーゼの新規活性化因子で、活性酸素の産生に応じてSrc/PI3-キナーゼ経路を活性化し、抗アポトーシスシグナルを誘導した。またOssaのC末部分はIGF-II mRNAと結合し、IGF-II蛋白質の分泌を促進する機構も有していた。さらにOssaに結合する蛋白質として、PDCD2Lを得た。Ossa/PDCD2Lは協調してシスプラチンなどによる酸化ストレスに対して抵抗性を示し、癌細胞の抗アポトーシス作用を増強した(投稿準備中)。Ossaはヒトスキルス胃癌手術症例でも、正常胃粘膜に比較し癌部で高い発現がみとめられ、その発現抑制はヌードマウスでのスキルス胃癌細胞株の腹膜播種に対して阻止効果がみられた。

CDCP1 (CUB domain containing protein 1)は1型膜貫通蛋白質でSrcキナーゼの基質であることが知られているが、そのチロシンリン酸化レベルはスキルス癌組織において著明な亢進がみられた。CDCP1はスキルス型胃癌細胞の移動能と足場非依存性増殖を促進しており、CDCP1の発現抑制により同スキルス型胃癌細胞の腹膜播種が阻害される事を発表した。

同じくスキルス胃癌組織からチロシンリン酸化蛋白質として同定されたARAP3は、低分子量G蛋白質のArfとRhoに対するGAPであるが、胃癌組織ではむしろ腫瘍部は正常粘膜上皮より発現が低下している傾向があり、前2者とは異なった作用が考えられた。内在性にARAP3がほとんど発現していない胃癌細胞に、外来性にARAP3を導入すると同細胞のマウスでの腹膜播種は抑制され、その播種抑制効果はRho-GAPの活性に依存するという結果を得ている(共同研究者により投稿準備中)。また上記以外にも解析途中の分

子が同定されており、チロシンリン酸化を指標としてスキルス胃癌細胞の様々な特性にリンクした分子が同定可能であった。

一方、ephrin-B1はこれまでの解析でスキルス癌の進展に寄与する事をみてきたが、そのC末部位のペプチドによる癌の腹膜播種に対する治療効果を発表した。HIVウイルス由来の細胞膜透過性ドメイン(PTD)を付加したephrin-B1のC末ペプチド(PTD-EFNB1-C)は、培地中への添加により、効率よくほぼすべての培養細胞内にとりこまれ、また同ペプチドはスキルス型胃癌細胞においてメタロプロテアーゼの分泌促進やArfの活性化など、これまでに報告したephrin-B1に基づく細胞内シグナル経路をブロックした。また腫瘍細胞のマウス腹腔内移植後に同ペプチドを連続的に腹腔内に投与したところ、スキルス胃癌細胞の腹膜播種が抑制された。すなわち、腸間膜や壁側腹膜などに転移した腫瘍の数、大きさがコントロール群に比較し、有意に低下した。一方、この腹腔内へのペプチドの注入によって、癌細胞以外の正常組織に対する大きな影響は特に認められなかった。これらのことにより、ephrin-B1のC末を介したシグナルを遮断するPTD-EFNB1-Cペプチドが、実際のスキルス胃癌の進展を効果的に抑制する事が示され、今後、同ペプチドの構造と類似した低分子化合物などが、実際の治療に有用であると考えられる。

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3件)

①Tanaka M, Kamata R, Yanagihara K, Sakai R.

Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide.

Cancer Science 101, 87-93, 2010

②Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Yanagihara K, and Sakai R.

A novel RNA-binding protein Ossa/C9orf10 regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative-stress induced apoptosis.

Mol Cell Biol 29, 402-413, 2009

③Uekita T., Tanaka M., Takigahira M., Miyazawa Y., Kanai Y., Yanagihara K. Sakai R.

CDCP1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhou carcinoma.

American Journal of Pathology 172, 1729-1739, 2008

[学会発表] (計 5件)

①田中正光

The physical interaction of ephrin-B1 with Dishevelled promotes cancer cell dissemination

第61回 日本細胞生物学会大会

2009年6月2日 名古屋国際会議場

②田中正光、堺 隆一

Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1 derived peptide

第68回 日本癌学会学術総会

2009年10月2日 パシフィコ横浜

③八木玲子、田中正光、堺隆一

ARAP3 inhibits intraperitoneal dissemination of gastric cancer cell through the regulation of cell adhesion signals

第68回 日本癌学会学術総会

2009年10月3日 パシフィコ横浜

④Tanaka M., Kamata R., Sasaki K., Sakai R. Identification of tyrosine phosphorylated proteins binding to Src family kinases in gastric scirrhou carcinoma

第67回 日本癌学会学術総会

2008年10月28日 名古屋国際会議場

⑤田中正光、鎌田礼子、堺隆一

スキルス型癌の間質浸潤におけるリン酸化蛋白質の解析

第97回 日本病理学術総会

2008年5月16日 石川県立音楽堂

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/dat/cgi/koza.php?koza=seika2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正光 (TANAKA MASAMITSU)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：