

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590401

研究課題名 (和文) 癌治療標的としてのTOPKの基礎的検討

研究課題名 (英文) Basic studies on TOPK as a target molecule of cancer

研究代表者

阿部 康人 (ABE YASUHITO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30184229

研究成果の概要 (和文)：

MAPKK 様の蛋白キナーゼである TOPK は癌細胞の増殖や移動に深く関与している。一方、抗 Her2 モノクローナル抗体が臨床応用されていて、それは EGF レセプターから MAPK あるいは PI3K 系にシグナルが伝達される系に働く。Raf 蛋白はこのシグナル系に深く関与しており、さらに Raf 蛋白は TOPK に結合する事が知られている。この研究では乳癌細胞を使って TOPK と Raf のシグナルの関連を調べる事によって、癌治療標的としての TOPK の意義を検討した。免疫染色による検討で、TOPK の発現性は乳癌の悪性度である Histologic Grade と相関した。リン酸化実験等によって Raf は TOPK のスレオニン 198 番をリン酸化する事が示され、Raf が TOPK のリン酸化活性を上昇させ、Raf-TOPK 結合能を上昇させることが明らかとなった。TOPK は癌とりわけ乳癌細胞において EGF/Her2 のシグナル系において重要な役割を示している事が示され、結果、TOPK は癌治療標的として有用である可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

Purpose: A MAPKK-like mitotic protein kinase, TOPK, plays a pivotal role in the growth and movement of cancer cells. As is evidenced by clinical application of anti-HER2-monoclonal antibody, EGF-R/HER2 mediates an important signaling in the proliferation and invasion of breast cancer cells through MAPK- and PI3K- signaling. Raf, an imperative member of MAPK signaling, binds to TOPK, although, significance of this interaction has not been elucidated. In this study, we analyzed expression of TOPK and investigated biological significance of TOPK-Raf interaction using breast cancer cells.

Experimental Design: We analyzed the expression of TOPK in the clinical breast cancer tissues and investigated MAPK-signaling from the aspect of TOPK and Raf in breast cancer cells.

Results: Immunohistochemical analysis revealed that the peak-expression intensity of TOPK correlated with the Histologic Grade of human invasive ductal carcinoma of breast. Our results suggested that Raf phosphorylates TOPK at Thr-198, a critical residue for kinase activity of TOPK and that TOPK enhances MAPK signaling by upregulating Ras binding to Raf.

Conclusions: TOPK is indicated to play an important role in the malignant potential of breast cancer via EGF-R/HER2 signaling. This study suggests that TOPK can be a molecular target for breast cancer therapy in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：TOPK、乳癌、増殖、悪性度

1. 研究開始当初の背景

T-LAK cell Originated Protein Kinase (TOPK)は腫瘍免疫エフェクター細胞である T-cell/T-LAK cell の活性化関連遺伝子として私たちが T-LAK サブトラクションライブラリーからクローニングした蛋白キナーゼである。このキナーゼは他に family member の存在しないユニークな蛋白であるが、その配列上 MAPKK 類縁であり、細胞のアポトーシスや増殖活性などを司る p38 をリン酸化して T-cell や各種エフェクター細胞などの免疫系細胞、成長発達過程における神経細胞など各種細胞の増殖や分化に関与している。一方、正常組織において TOPK は精巣にのみ極めて高く発現していることから cancer testis antigen としても注目されている。最近このキナーゼが、乳癌や大腸癌の増殖に重要な働きをしていることが報告された。とりわけ乳癌細胞では TOPK の発現性が高く、TOPK をノックダウンした乳癌細胞株は増殖が顕著に抑制されたことから、TOPK の乳癌細胞増殖における直接的な関与が示唆されている。最近私たちは臨床的な乳癌組織そのものにおいても TOPK が発現し、TOPK 発現性は、乳癌の悪性度を示す Histologic grading と相関しているとの予備データを得た。またこれまで多くの臨床組織検体で TOPK の免疫染色を行い、TOPK が細胞増殖活性マーカー MIB-1 とは異なった新たな増殖活性マーカーとして有用であることを見出している。

最近私と米国の共同研究者らならびに国内の別の研究グループは TOPK が Histone のリン酸化を介して細胞分裂に関与してい

ることを明らかにした。さらに私たちは TOPK が cdk1/cyclin B1 の活性を補助する形で cdk1/cyclin B1 基質のひとつで PRC1 と呼ばれる microtubule 関連蛋白質のリン酸化を促進して細胞質分裂を支えていることも明らかにした。このように、TOPK は複数の基質に対してリン酸化活性のみならず、リン酸化活性の関与しない生物学的活性も有していることなどが次第に明らかとなってきた。

これまで TOPK のリン酸化基質として明らかにされているものには上記の p38 や Histone が存在するが、最近私と米国の共同研究者らは細胞の増殖活性において広く重要な働きを果たしている MAPK のひとつである ERK がその基質となってリン酸化され、大腸癌の増殖において重要な働きを担っていることを示した。この研究で TOPK は ERK と相互にリン酸化するという特殊なリン酸化パターンを示し ERK の活性コントロールに深く関与しているということも明らかとなった。

2. 研究の目的

この研究は、TOPK が ERK 活性の調節機構においてどのような働きを演じているのかについて TOPK と Raf キナーゼとの関連性に着目して研究を進めようとしている。Raf は EGF-R などの Receptor 型 Tyrosine kinase の下流において Ras 蛋白のコントロール下に存在して MAPKKK として働き、MEK1 および MEK2 の活性化を介して ERK 活性をコントロールしているが、TOPK はこの経路において上流のキナーゼである Raf 蛋白に結合する蛋白として同定し報告された。しかし、その TOPK と

Raf 結合の意義については未だ明らかにされていない。

TOPK は、ERK を直接基質として活性化することからもわかるように Ras-Raf-MEK-ERK 系と深い関わり合いを持つ。従って TOPK と Raf が結合するという意義が大変興味深い。私たちのこれまでの検討では TOPK は Pull-down 法のみならず、免疫沈降法でも c-Raf と強く結合する。さらに TOPK の Raf 結合部位は TOPK の親水性の高い特有の部位に存在し、TOPK 結合蛋白である α チュブリン、cdk1 や PRC1 結合部位と重複していることも明らかとなっている。しかし当初の予想に反し、MAPKKK である Raf キナーゼは MAPKK 類似キナーゼである TOPK を基質としてリン酸化するものではないという結果が出た。そのため、Raf-TOPK-ERK という新たな MAPK 経路の形成は存在しないものと考えられる。言い換えれば TOPK は Ras-Raf-MEK-ERK シグナリングに深く関与するにもかかわらず、TOPK と Raf の結合の生物学的意義が不明であるということである。この研究の目的は Raf-MEK-ERK 経路に密接な関連を持った TOPK が、その結合蛋白 Raf に対してどのような生物学的活性を持っているかを明らかにすることによって、TOPK が ERK シグナルに及ぼす影響の検討を行い、癌細胞増殖においていかなる役割を果たしているのかを明らかにして、乳癌や大腸癌など TOPK 発現性の高い癌の治療標的分子としての TOPK の有用性を基礎的に検討することにある。

3. 研究の方法

組織と細胞

対象症例は 19 例の女性で、浸潤性乳管癌である (42 - 79 才; 65.5 ± 11.7 : mean \pm SD). この研究は愛媛大学病院の臨床研究指針に基づいている。乳癌の Histologic Grade は Bloom-Richardson Grade に基づいて、Grade I to III の素点 (3 - 9 点) を評価に用いた。これは 1 名の病理医によって検鏡された。

この研究で用いた細胞は COS-7 monkey SV-40 transformed fibroblast 細胞 (ATCC CRL-1651), HeLa ひと子宮頸癌細胞 (ATCC CCL-2) and MCF-7 ひと乳癌細胞 (ATCC HTB 22) である。これら細胞は 10%ウ

シ胎児血清と抗生物質添加の Dulbecco's modified Eagle's 培地 (以下 10% DMEM) で 5% CO₂ 存在下に 37 度で培養した。MCF-7 細胞は 10% DMEM に 10 μ g/ml インスュリン (Nakarai Tesuque, Tokyo, Japan) を添加して培養した。指示した箇所において細胞は EGF (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ), を 10 ng/ml を添加して 15 min 分間刺激した。

TOPK-knock down 細胞の増殖活性は以下のごとく測定した: siRNA をトランスフェクションしたのちに、10⁵ 個の細胞を 48-穴培養プレートに培地とともにまいた。PBS で先勝した後、指定した日において細胞を 70% ethanol で 5 min 固定した。細胞を PBS で洗浄した後、Crystal violet を使って染色した。統計的計算は Student t-test. を使用した。

ウエスタンブロッティング

細胞のトランスフェクションは TransFast reagent (Promega, Madison, WI) を用いて行った。細胞は f=60 mm の培養プレートにまいて一晚培養した。Opti-MEM (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて、18 μ l of TransFast transfection を 6 μ g のプラズミドの混合物を細胞に添加した。次いで 4 ml の 10% DMEM を添加して 2 日間培養した。蛋白濃度は RC DC protein assay kit (BioRad) を用いて測定した。

TOPK と c-Raf の発現をおさえるために HP Validated siRNA を QIAGEN (Tokyo, Japan). より購入して用いた。siRNA は HiPerFect transfection reagent (QIAGEN) をもちいて MCF-7 細胞に導入した。細胞はインシュリン添加 10% DMEM を用いて培養してのち実験に用いた。

ウエスタンブロッティングは polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 membrane (Millipore, Bedford, MA) と ECL detection system (GE Healthcare) を用いておこなった。サンプルを SDS-PAGE 電気泳動した後、semi-dry blotter (BIO CRAFT, Tokyo, Japan) を用いて膜に転写させた。ついで転写膜は 5% skim milk 加の 0.1% Tween 20-PBS で室温 1 時間インキュベートした。次いで膜は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo, Tokyo, Japan) で抗体を希釈した液で 60 分間反応させた後、洗浄した。次

いで膜は抗マウスあるいは家兎 IgG 抗体-horseradish peroxidase 複合物に室温 1 時間反応させた。洗浄ののち、膜は ECL と X-ray フィルム (Hyper Film; BD Healthcare) をもちいて発色現像した。

免疫沈降は細胞溶解物を使用して次の通り行った:細胞を PBS で洗浄した後、1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM EDTA, Complete protease inhibitor cocktail set (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) よりなる溶解バッファーに溶かし、超音波処理の後、16,000g, 4°C で 12 分間遠心した。溶解物は 4°C で一晚抗体と反応させた後、Protein G Sepharose 4FF ゲルと 1 時間反応させた。ゲル沈殿物は溶解バッファーで洗浄した後、SDS-電気泳動にかけ、次いでウェスタンブロッティングを行った。

プルダウン分析は GST- あるいは MBP-融合蛋白を用いて次の通り行った:細胞溶解物をゲルに結合した GST あるいは MBP 融合蛋白と 4°C 一晚反応させた。溶解バッファーを用いて洗浄の後、サンプルバッファーを加えて処理した後、SDS 電気泳動とウェスタンブロッティングを行った。

免疫組織学的検討

抗 TOPK mouse monoclonal antibody

(Clone 31) を臨床材料の免疫染色に用いた。すべての組織切片はホルマリン固定の後パラフィン胞埋されたブロックを用いて作製した。切片を薄切の後、免疫染色を行った。顕微鏡写真はオリンパス製の BX-51 に CCD カメラを接続して撮影し、Photoshop 7.0 を用いて加工した。乳癌細胞の TOPK 染色は 2 つのパラメーターで評価した。すなわち、平均的な背景強度 (score0-3) とピーク発現性(score0-2) である。

4. 研究成果

TOPK のピーク発現性は乳癌の Histologic Grade と関連した

乳癌症例の TOPK 染色結果の代表例を図 1 A に示す。左のパネルは典型的な Peak 0-Back 0 染色パターンである。中央のものは Peak 1-Back 1 で、右は Peak 2-Back 2 である。総合結果判定を図 1 B に示す。

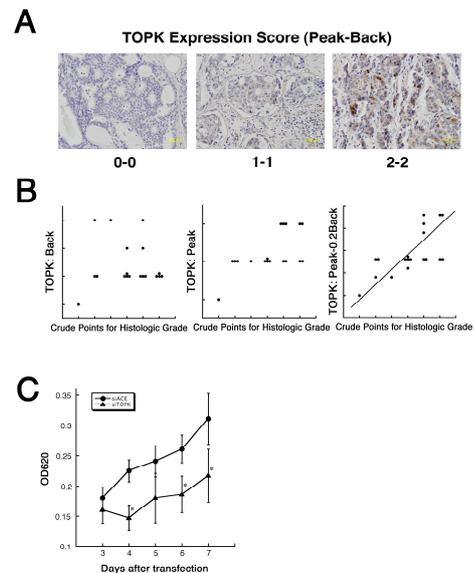


図 1

バックグラウンド TOPK 発現性は乳癌の悪性度とは相関は示さなかった (図 1 B 左)。一方、ピーク発現性は 3 から 9 の悪性度と相関性を示した (図 1 B 中央)。ここで TOPK のピーク発現性からバックグラウンド発現性をもちいて (0.2 x Back score) しよりしてやると、TOPK の発現性は Histologic Grade とさらに高く相関した (図 1 B 右)。

TOPK-knock down MCF-7 乳癌細胞の増殖活性

TOPK をノックダウンした MCF-7 乳癌細胞の増殖活性の変化を図 1 C に示した。増

殖活性は図のごとく明らかに抑制された。すなわち、乳癌細胞の増殖において TOPK は重要な活性を有することが示された。

TOPK は c-Raf と結合する

HER2/EGF-R2 を経由する細胞内シグナルは乳癌の増殖で重要な役割を果たしている。セリンスレオニンキナーゼである Raf は MAPK シグナル系において HER2 or EGF-R の下流で重要な働きを演じている。最近 TOPK が Raf に結合する可能性があることが報じられた。しかし、実際の結合データの詳細とその解析はなされていない。そのため TOPK と Raf の結合性について検討した。始めに Raf 蛋白と TOPK の結合性について免疫沈降法を用いて検討した (図 2 A)

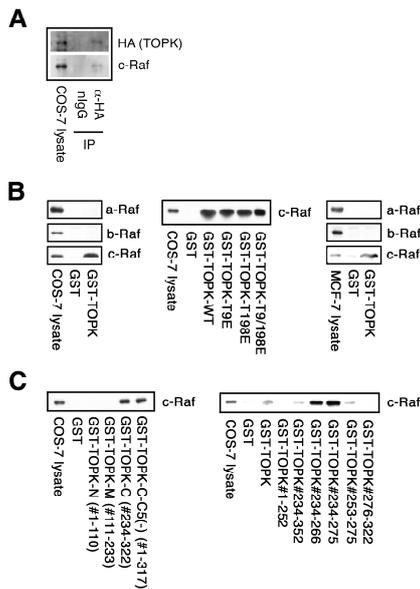


図 2

図に示すごとく、細胞内において TOPK は c-Raf と結合した。一方、TOPK は a-Raf および b-Raf には結合しなかった。この結果

は以前の yeast two-hybrid システムを利用して示された結果とは異なっていた。

プルダウン解析をリコンビナント GST-TOPK を用いて行った (図 2 B)。

c-Raf は GST-TOPK に結合したが、a-Raf および b-Raf はやはり結合しなかった。このデータは免疫沈降法によるものと一致した。TOPK の重要なリン酸化部位である Thr-9 や Thr-198 のリン酸化は TOPK との結合性に影響を与えなかった。フラグメントを使った結合解析では、C-terminal ペプチドがこの結合に必須であり、N-terminal あるいは中間部分は必要ないことが示された (図 2 C)。C-terminal の 5 アミノ酸は TOPK の PDZ-binding に相当するが、この結合には関与していなかった。さらに詳細な分析の結果、TOPK フラグメントの #234-266 がこの結合に必須であり、#234-275 が重要な部分であることが示された (図 2 C)。

ATUxgTz @ Z 4UXZ L! Z ; TeTZhM \Z E! Z
 > \gbZ >! Z >hfTaTZ \Z L! Z <gbZ @
 FXeh Tag \zC7 <? \$? ThgbTag \UbW Tf T abi X
 Te Xe Ybe XaWb Xge \bf \f
 9Xeg \gl TaWfXg \gl , ' - % (% % (* Z
 % S #
 f\$fl
 458 LAFH <GB
 &#S+ ' % % ~ ~ ~