

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～ 2009
 課題番号：20790253
 研究課題名 (和文) ラフト蛋白質 Cbp による Src のがん形質発現の抑制機構
 研究課題名 (英文) The lipid raft-anchored adaptor protein Cbp controls the oncogenic potential of c-Src
 研究代表者 小根山 千歳 (ONEYAMA CHITOSE)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：90373208

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、代表的ながん原遺伝子産物である Src によるがん化メカニズムを研究する過程で見出した脂質ラフトに局在するアダプター分子 Cbp (Csk-binding protein) のがん化抑制における役割を明らかにした。Cbp はヒトがん細胞や腫瘍組織において発現量が低下しており、ヒトがん細胞に Cbp を導入すると腫瘍形成が抑制されることを見出した。また、ラフトの構成成分であるコレステロールを添加・除去することでラフト自体の量を増減させると、SFK のがん化能がそれに応じて変化することを示し、がん化抑制の場としてのラフトの機能を証明した。

研究成果の概要 (英文)：

The tyrosine kinase c-Src is upregulated in various human cancers irrespective of its negative regulator Csk, but the regulatory mechanisms remain unclear. In this study, we show that a lipid raft-anchored Csk adaptor, Cbp/PAG, is directly involved in controlling the oncogenicity of c-Src. Using Csk-deficient cells that can be transformed by c-Src overexpression, we found that Cbp expression is markedly downregulated by c-Src activation and re-expression of Cbp efficiently suppresses c-Src transformation as well as tumorigenesis. Cbp-deficient cells are more susceptible to v-Src transformation than their parental cells. Upon phosphorylation, Cbp specifically binds to activated c-Src and sequesters it in lipid rafts, resulting in an efficient suppression of c-Src function independent of Csk. In some human cancer cells and tumors, Cbp is downregulated and the introduction of Cbp significantly suppresses tumorigenesis. These findings indicate a potential role for Cbp as a suppressor of c-Src-mediated tumor progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：Src, Csk, Cbp, トランスフォーメーション

1. 研究開始当初の背景

私はこれまでの研究で、Src を負に制御する Csk を欠損したマウス線維芽細胞(CskK0)は、正常細胞型 Src を発現させることによって(CskK0/Src)がん化することを見出した。この系は、細胞内蛋白質のリン酸化亢進が限定的であるにも関わらず、従来の研究に頻用されてきた活性型 Src と同等のがん形質を示し、がん化に最小限必要な Src 基質を見出すことが容易となっている。そこで、Src によるがん化とリン酸化あるいは発現の変動が関連している標的分子・遺伝子を探索したところ、Src によるがん化と発現が逆相関を示すものとして、細胞膜マイクロドメイン「ラフト」に局在する分子 Cbp(Csk-binding protein)を見出した。これまでに Cbp は Csk を細胞膜にリクルートすることによって間接的に SFK (Src family kinase) の活性制御に関与することが知られていたが、Csk 欠損細胞においても Cbp の発現によって Src 特異的ながん化の抑制が認められた。また Cbp はヌードマウスにおいて Src による腫瘍形成を顕著に抑制した。このモデル系を用いて Cbp の作用メカニズムを解析した結果、Cbp は Src のキナーゼ活性には直接作用せず、リン酸化チロシンを介して活性型 Src に結合しラフトに集積させることによって、細胞接着班などから発信されるがん化シグナル(FAK や Cas の活性化、STAT, ERK, AKT, JNK 経路の活性化)を遮断することを明らかにした。さらに、ラフトに強制的に移行させた Src はがん化を引き起こさなかった。これらのことから、Cbp は Src をラフトに局在化させることによってがん化を阻止すると考えられる。また Csk 存在下において Cbp は活性型 Src と Csk と別の作用点で結合し、それによって Src は Csk より効率的に不活性化しラフトから押し出

されることも明らかとなった。

2. 研究の目的

Src は代表的ながん原遺伝子とされ、大腸がんを始めとする多くのヒトがん細胞での発現及び活性の亢進が見られるなどがん化との関わりが示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。これまでは v-Src や恒常活性型 Src を用いて細胞のがん化を引き起こすチロシンリン酸化シグナルの研究が進められてきた。私は、Src の活性を負に制御している Csk を欠損したマウス線維芽細胞が、正常細胞型 Src によってがん化することを明らかにし、この系を活用して Src によるがん化の詳細な分子メカニズムを再考している。本研究では、様々な分子を集積させることで細胞内へ効率的にシグナルを伝達するプラットフォームと考えられている細胞膜マイクロドメイン「ラフト」に着目し、Src によるがん形質発現シグナル伝達機構を解析する。私はこれまでの研究で、Csk をラフトにリクルートする膜アダプター蛋白質 Cbp(Csk-binding protein)が Src によるがん化を直接抑制する働きがあることを明らかにしている。そこで本研究では、Src によるがん化メカニズムの解明を念頭に、「ラフト蛋白質 Cbp による Src のがん形質発現の抑制機構」についてその詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、これまでモデル系で行ってきた研究をもとに Cbp のがん抑制因子としての可能性を検証するとともに、ヒト細胞においてもモデル系同様のがん形質発現抑制機構が機能しているかを明らかにすることを目的として以下の研究を行った。

1) Cbp の有無による正常細胞の Src がん化感受性の変化を調べる。

- 2) K5-Cre Csk/Cbp コンディショナルノックアウトマウスにおけるがん化感受性を調べる。
- 3) ヒトがん細胞における Src の活性化と Cbp の発現量の相関を調べる。
- 4) ヒトがん細胞のがん形質発現に対する Cbp の役割を明らかにする。
- 5) ラフトの量的・質的变化による Src の制御とヒトがん細胞形質に対する役割を明らかにする。

4. 研究成果

本研究において Cbp の作用メカニズムを解析した結果、Cbp は Src のキナーゼ活性には直接作用しないが、リン酸化チロシンを介して活性型 Src に結合しラフトへ集積させることにより、Src によるトランスフォーム活性を抑制することが明らかとなった。さらにラフト移行性を付与した改変 Src はトランスフォーマーメーション能を失うことも明らかとなった。また Src の活性が高いヒトがん細胞において Cbp の発現が低下しており、ヒト大腸癌由来上皮細胞株（ヒト癌細胞の中でも特に Src が活性化していることで知られる）に Cbp を導入すると腫瘍形成が抑制されることを見出した。さらに、Src ファミリーチロシンキナーゼ（SFK）の制御の場としてのラフトの意義を調べるために、8種の SFK（c-Src, Fyn, c-Yes, Lyn, Lck, Hck, c-Fgr, Blk）について、がん化能と細胞内局在とを調べた。その結果ラフトへの局在しやすさとがん化能が強く関連していることを見出した。また、ラフトの構成成分であるコレステロールを添加・除去することでラフト自体の量を増減させると、SFK のがん化能がそれに応じて変化することを示し、がん化抑制の場としてのラフトの機能を証明した。本研究の知見をもとに、ラフトを制御する方法が見出されれば、今後ラフトを標的とした新たながんの予防や治療法への発展が期待できる。

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6件）

1. Oneyama C, Iino T, Saito K, Suzuki K, Ogawa A, Okada M. Transforming potential of

Src family kinases is limited by the cholesterol-enriched membrane microdomain. *Mol Cell Biol*, 29,6262-6272 (2009) 査読有

2. Inoue K, Sone T, Oneyama C, Nishiumi F, Kishine H, Sasaki Y, Andoh T, Okada M, Chesnut JD, Imamoto F. A versatile non-viral vector system for tetracycline-dependent one-step conditional induction of transgene expression. *Gene Therapy*, 16(12), 1383-1394 (2009) 査読有

3. Enomoto M, Hayakawa S, Itsukushima S, Ren DY, Matsuo M, Tamada K, Oneyama C, Okada M, Takumi T, Nishita M, Minami Y. Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene*, 28(36), 3197-3208 (2009) 査読有

4. Oneyama C, Hikita T, Enya K, Dobenecker MW, Saito K, Nada S, Tarakhovskiy A, Okada M. The lipid raft-anchored adaptor protein Cbp controls the oncogenic potential of c-Src. *Mol Cell*, 30(4), 426-36 (2008) 査読有

5. 小根山千歳、岡田雅人、細胞膜マイクロドメイン「ラフト」を介する Src がん化シグナル制御機構 蛋白質核酸酵素, 54(3), 201-211, 2009 共立出版 査読有

6. 小根山千歳、岡田雅人、チロシンキナーゼシグナルとがん形質発現 実験医学増刊号「シグナル伝達 2008-2009」, 26(15), 41-48, 2008 羊土社 査読無

〔学会発表〕（計2件）

1. 第32回日本分子生物学会年会 横浜 細胞膜マイクロドメイン“ラフト”における Src ファミリーの制御とがん形質発現 (2009.12/10)

小根山千歳、飯野琢也、斎藤一伸、鈴木慶、岡田雅人

2. BMB 2008 神戸 ラフトにおける Src ファミリーの制御とがん形質発現 (2008.12/11)

小根山千歳、疋田智也、塩谷健悟、岡田雅人

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/oncogene/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小根山 千歳 (ONEYAMA CHITOSE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90373208

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：