

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07165

研究課題名（和文）CDCP1細胞外ドメインを標的とした癌転移の新規治療法開発の基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on the development of new therapeutic methods for cancer metastasis targeting the CDCP1 extracellular domain

研究代表者

上北 尚正 (Uekita, Takamasa)

防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授

研究者番号：50373402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：CDCP1細胞外ドメインを標的とした癌転移の新規治療法開発において、膜型セリンプロテアーゼMT-SP1によるCDCP1細胞外ドメインの切断が、CDCP1多量体形成を促進してSrc型キナーゼの活性化をする事を明らかにした。この制御は、CDCP1-PKCdeltaシグナルの促進に関与し、癌転移を制御している事が考えられた。

よって、これまで報告してきた細胞内のCDCP1-PKCdeltaシグナル遮断による癌転移治療法の開発に加えて、MT-SP1によるCDCP1の細胞外ドメインの切断を阻害し、多量体形成を抑制する治療薬の開発も有用であ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

これまでに明らかとなっていたCDCP1依存的な癌転移機構の制御は、細胞内のCDCP1-PKCdeltaシグナルであり、細胞内のシグナルを標的とした癌治療薬の基盤研究がおこなわれていたが、薬剤を細胞内に取り込む点で問題があった。しかし、今回の研究成果により、細胞外におけるMT-SP1によるCDCP1切断が細胞内シグナルの制御に重要である事を示す結果を得る事が出来たため、細胞外から細胞内シグナルを制御できる可能性が示唆された。これにより、CDCP1依存的な癌転移に関して、新たに細胞外領域を標的とする治療薬開発の基盤研究も進める事が可能となり、治療薬開発の幅が広がった。

研究成果の概要（英文）：In the development of a novel therapy for cancer metastasis targeting the CDCP1 extracellular domain, we found that cleavage of the CDCP1 extracellular domain by the membrane-type serine protease (MT-SP1) promotes CDCP1 Homophilic complex formation and activation of Src family kinases. This regulation may be involved in the promotion of CDCP1-PKCdelta signaling and regulate cancer metastasis.

Thus, in addition to the development of a treatment for cancer metastasis by blocking intracellular CDCP1-PKCdelta signaling, it may be useful to develop a target of therapeutic targets that inhibits the cleavage of the extracellular domain of CDCP1 by MT-SP1 and suppresses its complex formation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん転移 CDCP1 膜型セリンプロテアーゼ 多量体形成 シグナル伝達 Src型キナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の転移能(浸潤能・細胞運動能・足場非依存性能)は、正常細胞には無い癌の特性を含んでいる。それゆえに、この特性の抑制を治療標的とすれば、正常細胞に影響を及ぼさず副作用の少ない新規の癌治療法の開発が期待できると考えられている。申請者の継続的な研究課題であるCDCP1による癌転移能の制御機構の解明と他の研究者による報告から、CDCP1は癌転移における分子標的として有望な因子と認識されていた。これまでに、細胞膜でのSFK-CDCP1-PKCdelta複合体による細胞内のチロシンリン酸化シグナルが癌細胞の細胞運動能や足場非依存性能の制御に重要である事が示されてきた(参考文献1)。さらに最近の研究により、CDCP1細胞外ドメインが同種多量体形成し、癌転移の制御に関与する可能性も報告された(参考文献2)。近年、膜型セリンプロテアーゼMT-SP1がCDCP1細胞外ドメインを切断にすると報告がされているが、(参考文献3)、それが癌転移能に関与するかは明らかになっておらず、CDCP1細胞外ドメインを介した癌転移能の制御が存在する可能性が考えられた。

よって、CDCP1細胞外ドメインを標的とした癌転移能の制御機構の解明が癌転移の新規治療法開発に貢献すると考えられた。

参考文献1: Uekita T et al.; Mol. Cell. Biol., Vol.27, No.21, pp.7649-7660 (2008)

参考文献2: Sawayama T, Uekita T et al.; Oncol. Rep. Vol.42, pp.1507-1516 (2019)

参考文献3: Casar B et al.; Oncogene Vol.31, No.35, pp.3924-3938 (2012)

2. 研究の目的

CDCP1細胞外ドメインを介した多量体形成機構と細胞内シグナル制御機構を明らかにするために、CDCP1細胞外ドメインに着目し、細胞外からの癌転移能の制御機構を解明する事を目的とした。

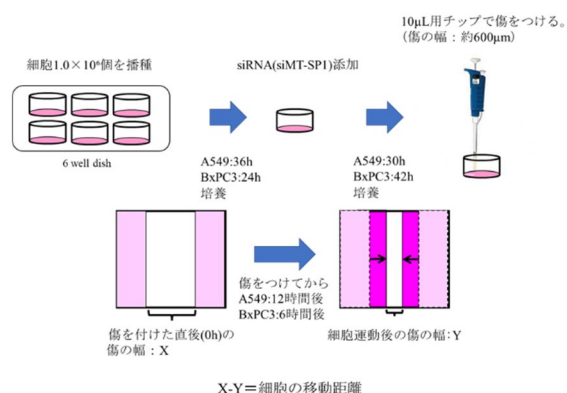
3. 研究の方法

(1)細胞培養と遺伝子導入:細胞は、接着細胞培養用dish(90mm dishおよび6well dish)を用いて、90 mm dishには10 mL、6 well dishには2 mLの培地を使用し、37℃、5% CO₂条件のCO₂インキュベータ内で培養した。各種癌細胞株はRPMI1640培地を用いた。細胞への遺伝子導入において、細胞用蛋白質発現プラスミドにはLipofectamine2000試薬を、細胞内蛋白質抑制に使用するsiRNAにはRNAiMax試薬を用いた。

蛋白質の可溶性画分の回収には、細胞溶解溶液PLC Lysis bufferを用い、セルスクレーパーで細胞を剥がして回収し、チューブを振とう機に1分間設置して細胞を完全に溶解させた後、4℃、20,630 xgで20分間の遠心分離をおこない、上清を蛋白質の可溶性画分として回収して細胞試料とした。

(2)ウエスタンブロッティング:細胞試料は、Bicinchoninic Acid(BCA)法により濃度測定をし、30 mg - 50 mgの細胞試料をアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、分離した質はPolyvinylidene difluoride(PVDF)膜に転写した。その後、PVDF膜をBlocking One試薬で1時間ブロッキングして標的蛋白質の1次抗体を5% Blocking One/TBS溶液で任意の濃度に希釈し、室温で60分間振とうした。TBS-Tween20(TBS-T)溶液で5分間の洗浄を3回おこない、5% Blocking One/TBSで1:4,000に希釈した2次抗体溶液に浸し、室温にて30分間振とうした。その後、2次抗体溶液を除去し、PVDF膜をTBS-T溶液を用いて5分間隔で2回洗浄し、TBSで5分間1回の洗浄の後、化学発光による標的蛋白質の検出を検出用試薬(Western Lightning Plus-ECL)でおこなった。検出バンドの濃さの定量にはNIH ImageJ ver.1.46解析ソフトを用いた。

(3)運動能評価試験(Wound healing assay):各種癌細胞株の運動能評価は、Wound healing assayによって検証した。それぞれの癌細胞株を6well dishに 1.0×10^6 個播き、細胞がdish底面を全て覆う状態にした。次に、20 μ Lピペットチップの先端でdishの中央付近に幅約600 μ mの傷をつけ、剥がれた細胞を2 mLのPBS(-)で洗浄して取り除いた。傷をつけた部分にdishの裏側から黒のマーカーペンで印をつけて観察する場所を特定し、蛍光顕微鏡で0時間の画像を取得し、一定の時間により同じ場所の画像を取得した。その後、細胞運動による傷の幅の回復状況(傷の幅が狭くなることを運動能の高さの指標とする)を画像から解析して運動能の評価をおこなった。



4. 研究成果

(1) CDCP1 と MT-SP1 の発現量と予後不良：CDCP1 と MT-SP1 の mRNA 発現量と癌患者の予後不良との相関を Kaplan-Meier データベース (<https://kmpplot.com/analysis/>) を使用して、生存曲線を取得し、高発現群と低発現群での 50% 生存率を解析した。肺癌および膵臓癌患者の生存曲線を調べると、肺癌患者の CDCP1 mRNA が高発現群で 50% 生存率が 40 カ月、低発現群の患者で 53 カ月と長くなり、膵臓癌患者では、高発現群で 50% 生存率が 20 カ月、低発現群の患者で 72 カ月と顕著に生存期間が長くなり、MT-SP1 と同様の傾向を示した。Log rank P の値も肺癌では 0.00011、膵臓癌では 0.00025 と有意に生存期間が短くなっていた (図 1)。よって、肺癌および膵臓癌において MT-SP1 および CDCP1 mRNA が高発現である方が癌の悪性度に関与していることが示唆された。

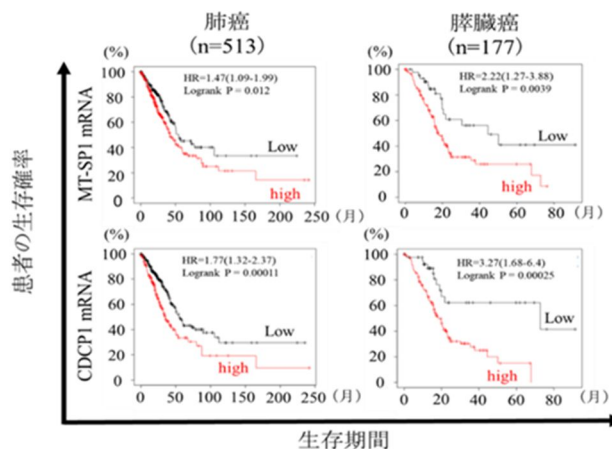


図 1 癌患者の CDCP1 および MT-SP1 mRNA の発現量と予後不良

(2) 癌細胞株における MT-SP1 の発現と切断型 CDCP1 の検出：MT-SP1 の発現と切断型 CDCP1 の検出の有無に相関性があるかを調べるために、肺癌細胞株 6 種類および膵臓癌細胞株 4 種類を用いてウエスタンブロットにより検証した。肺癌細胞株 PC3, PC10, PC14, H157, H322 および A549 において、MT-SP1 の発現量が高い株 A549, H322, PC14 では、135 kDa の CDCP1 と共に 70 kDa の切断型 CDCP1 が観察された。MT-SP1 の発現が確認出来ない H157 細胞株では、切断型 CDCP1 がほとんど検出されなかった。その他、MT-SP1 発現が確認されるが切断型 CDCP1 がほとんど検出されない肺癌細胞株 PC3 と PC10 や CDCP1 発現の無い膵臓癌細胞株 SUIT4 も存在した (図 2)。これらの結果から、CDCP1 切断には主に MT-SP1 が関与する事が示唆されたが、MT-SP1 依存的でない CDCP1 切断も存在する事が明らかとなった。

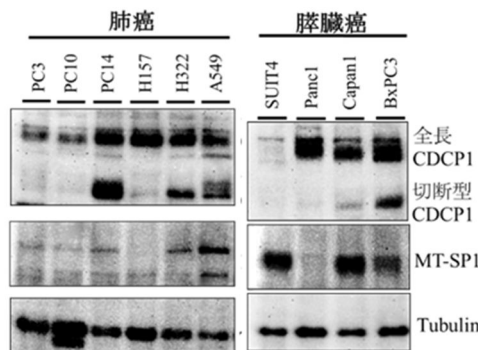


図 2 各癌細胞株における MT-SP1 発現と切断型 CDCP1 の検出

(3) MT-SP1 を介した CDCP1 細胞外ドメインの切断と細胞内シグナル：癌転移において、Src 型キナーゼによる CDCP1 および PKCdelta との複合体を介した下流シグナルの増強が報告されている [引用文献 1]。そこで MT-SP1 を介した CDCP1 細胞外ドメインの切断が CDCP1-SFK-PKCdelta シグナルの制御に関与している可能性について MT-SP1 蛋白質の発現を抑制する siRNA 法を用いて検証をおこなった。肺癌細胞株 A549 を用いた siRNA 法の実験において、コントロール (siControl) を 36 時間添加した時の MT-SP1 蛋白質の発現量を 100% とした時、MT-SP1 蛋白質を抑制する siRNA (siMT-SP1) で処理して 24 時間後、36 時間後の A549 細胞では、MT-SP1 発現量の相対値が各々 41.44% および 17.55% にまで抑制され、48 時間後には 94.38% まで回復していた。この時の切断型 CDCP1 の検出量の割合は、MT-SP1 の蛋白質発現量における相対値の減少と同様に 24 時間後と 36 時間後で 54.87% および 26.81% まで検出量の相対値が減少しており 48 時間後には 164.47% まで回復していた。さらに、活性化の指標となるリン酸化 Src 型キナーゼのバンドを測定すると、siMT-SP1 処理して 24 時間後、36 時間後において、siControl (100%) と比較して各々 77.46% および 69.28% まで減少していることが確認され、48 時間後には 96.98% まで回復していた [図 3]。以上の結果から、MT-SP1 が CDCP1 の切断に関与し Src 型キナーゼの活性化に影響を及ぼすことが示唆された。これにより、MT-SP1 による CDCP1 細胞外ドメインの切断が、癌転移能に関与する CDCP1-PKCdelta シグナルを制御する事が考えられた。

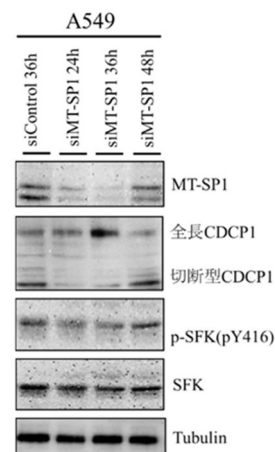


図 3 MT-SP1 抑制による切断型 CDCP1 およびリン酸化 Src 型キナーゼの変化

(4) MT-SP1 を介した CDCP1 細胞外ドメイン切断による癌転移能の制御: siMT-SP1 を導入した肺癌細胞株 A549 を用いて Wound healing assay による運動能評価をおこない, 癌転移能への関与を調べた(図4A). siControl を導入した細胞では $326.19 \pm 58.72 \mu\text{m}$ と処理をしていない A549 細胞と同程度の移動距離であったが, siMTSP1 No.1 を導入した細胞では $148.10 \pm 31.18 \mu\text{m}$ と算出され, MT-SP1 発現の抑制が有意に A549 細胞の運動能を減少させることが示唆された(図4B).

さらに, 先のウェスタンブロット(図2)による各因子の発現パネルから, MT-SP1 が発現し, 切断型 CDCP1 が確認される細胞株として肺癌細胞株 A549 と膵臓癌細胞株 BxPC3 を, MT-SP1 発現が無く, 切断型 CDCP1 が検出されない細胞株として肺癌細胞株 H157 と膵臓癌細胞株 Panc1 を選択し, 細胞運動能の評価をおこなったところ, A549 と BxPC3 細胞株では, 傷を付けてから各々の細胞の培養時間が経過した後に傷が回復し細胞間の幅が縮小することが観察された. 一方, H157 と Panc1 細胞株では, 細胞間の幅の回復が少なくなっていた(図4C).

したがって, MT-SP1 が発現しており, 切断型 CDCP1 が検出される肺癌細胞株および膵臓癌細胞株は MT-SP1 が発現せず, 切断型 CDCP1 が検出されない癌細胞株と比較して, 細胞運動能が高い傾向にあることが示唆され, MT-SP1 を介した CDCP1 細胞外ドメインの切断がある癌細胞株の方が, 癌転移能が高い可能性が示唆された.

これら結果から, MT-SP1 による CDCP1 細胞外ドメインの切断が, 癌転移能の制御に関する事が示唆され, CDCP1 の細胞外ドメインが癌転移における治療標的となり得る可能性が示された.

(5) CDCP1 の細胞外ドメイン標的とした癌転移治療薬の可能性: 本研究において, MT-SP1 による CDCP1 細胞外ドメインの切断が Src 型キナーゼ活性化に関与する事を明らかにした. これまでに Src 型キナーゼの活性化には CDCP1 の同種多量体形成が関与する事が報告されている[引用文献2]. これら結果を踏まえると, MT-SP1 による CDCP1 細胞外ドメインの切断が, CDCP1 の同種多量体形成の制御に関与している事が示唆され, 細胞内の CDCP1-PKCdelta シグナルの制御に細胞外での MT-SP1 および CDCP1 細胞外ドメインが関与している可能性が示された. つまり, CDCP1 を介した細胞内シグナルを細胞外から制御できる可能性が示された事で, CDCP1 細胞外ドメインを標的としたこれまでとは異なる治療薬開発の可能性を本研究で示す事が出来た(図5).

<引用文献>

1. Uekita T. et al. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis, Cancer Science Vol.102, No.11, (2011) pp1943-1948
2. Sawayama T. et al. Homophilic complex formation of CDCP1 via the extracellular CUB2 domain facilitates SFK activation and promotes cancer cell migration, Oncology Reports Vol. 42, No.4, (2019) pp1507-1516.

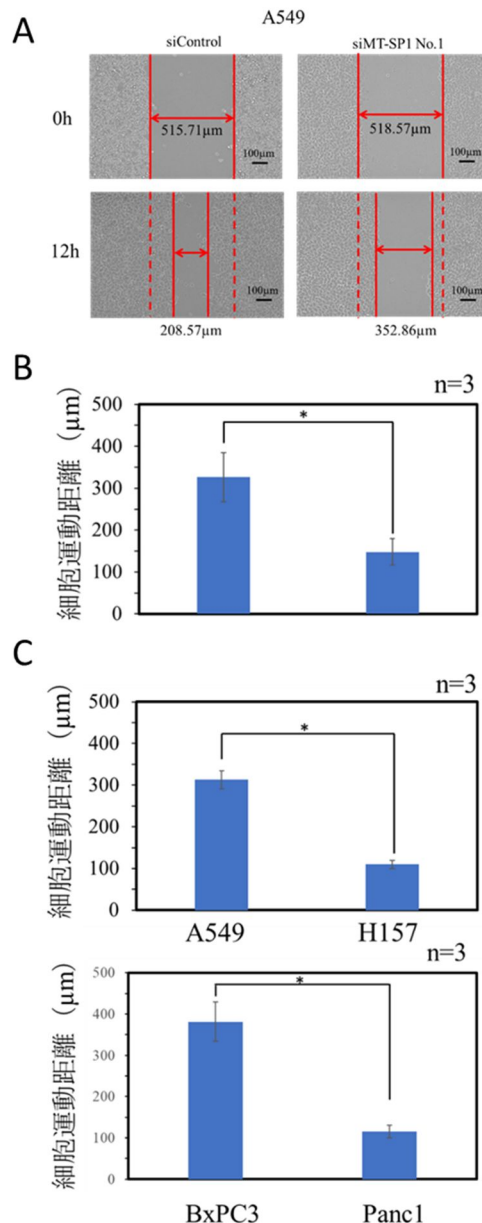


図4 MT-SP1によるCDCP1細胞外ドメイン切断と細胞運動能

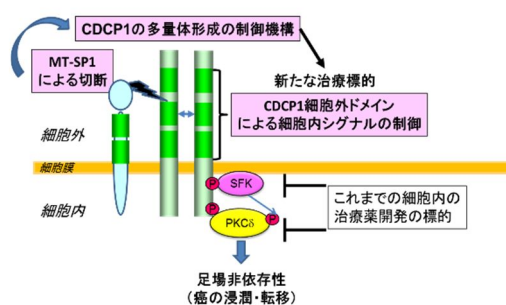


図5 CDCP1細胞外ドメインを標的とした新規の治療薬研究基盤

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tozawa Takafumi, Matsunaga Kohichi, Izumi Tetsuro, Shigehisa Naotake, Uekita Takamasa, Taoka Masato, Ichimura Tohru	4. 巻 17
2. 論文標題 Ubiquitination-coupled liquid phase separation regulates the accumulation of the TRIM family of ubiquitin ligases into cytoplasmic bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0272700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0272700	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 Taoka Masato, Kamei Kota, Kashima Akiko, Nobe Yuko, Takekiyo Takahiro, Uekita Takamasa, Ichimura Tohru	4. 巻 683
2. 論文標題 An ionic liquid-assisted sample preparation method for sensitive integral-membrane proteome analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115349 ~ 115349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2023.115349	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 Hirahara Masanari, Iwamoto Aki, Teraoka Yuto, Mizuno Yuki, Umemura Yasushi, Uekita Takamasa	4. 巻 63
2. 論文標題 Ruthenium Pyrazole Complexes: A Family of Highly Active Metallodrugs for Photoactivated Chemotherapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1988 ~ 1996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.inorgchem.3c03716	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 Uekita Takamasa, Yagi Reiko, Ichimura Tohru, Sakai Ryuichi	4. 巻 29
2. 論文標題 C9orf10/Ossa regulates the bone metastasis of established lung adenocarcinoma cell subline <sc>H322L B04</sc> in a mouse model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 290 ~ 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13103	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上北尚正、浅見佳紀
2. 発表標題 Regulatory mechanism of cancer metastasis via CDCP1 cleavage by membrane-type serine protease MT-SP1
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会が駆出集塊・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上北尚正、八木玲子、市村徹、堺隆一
2. 発表標題 C9orf10/Ossa regulates bone metastasis of established lung adenocarcinoma sub-line H322L-B04 cells in mouse model
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅見佳紀、上北尚正
2. 発表標題 MT-SP1によるCDCP1同種2量体形成の制御機構の解析
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y.Asami, T.Uekita
2. 発表標題 Analysis of regulatory mechanism of cancer metastasis via CDCP1 cleavage by MT-SP1.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅見佳紀、上北尚正
2. 発表標題 膜型セリンプロテアーゼMT-SP1によるCDCP1切断を介した癌転移制御機構の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Asami, T. Uekita
2. 発表標題 Analysis of the control mechanism of cancer metastasis though CDCP1 cleaved by membrane serine protease MT-SP 1.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Asami, T. Uekita
2. 発表標題 Analysis of the control mechanism of CDCP1 homophilic complex formation by MTSP1
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅見佳紀、上北尚正
2. 発表標題 MT-SP1によるCDCP1同種2量体形成の制御機構の解析
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------