

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700883

研究課題名（和文） 癌転移抑制蛋白質による制御細胞分子の同定

研究課題名（英文） Identification of new target proteins for metastasis suppressor protein Nm23-H1

研究代表者

村上 雅尚 (MURAKAMI MASANA0)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：80571017

研究成果の概要（和文）：癌転移抑制蛋白質 Nm23-H1 の新規細胞内標的分子を見出すため、標的分子を質量分析法（MALDI-TOFMS 解析法）による同定を試みた。そして細胞骨格形成分子 8 種、細胞接着関連分子 4 種、情報伝達分子 20 種、その他機能不明分子 12 種を標的分子候補として見出した。このうち研究協力が得られた 3 種 8 分子は種々の実験を行い直接結合すること、細胞内での局在性の一致等を確認し新規標的分子が同定されたと結論づけた。また SPATA13 分子については分子機能への影響も検討した（投稿中）。

研究成果の概要（英文）：Nm23-H1 is known as the suppressor of tumor metastasis. To find the potential target of Nm23-H1 in epithelial cell, we used matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) analysis and N-terminal sequence analysis. We obtained 73 candidate proteins as a cellular target of Nm23-H1 including previous reported molecules. Those are categorized 4 groups which are involved in 8 cell structure proteins, 4 cell adhesion molecules, 20 signal molecules, and 12 cell constitution protein/unknown function molecules. One of candidates spermatogenesis associated 13 (SPATA13) that is also known as adenomatous polyposis coli (APC)-stimulated guanine nucleotide exchange factor 2 (Asef2) observed in several tumors and associated with a decrease of cell to cell adhesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：胃癌、転移抑制、Nm23-H1、MALDI-TOFMS

1. 研究開始当初の背景

nm23 遺伝子は癌転移抑制遺伝子として初めて同定され、今日までに 8 種類の癌転移抑制遺伝子が知られている。癌においてこの遺伝子の翻訳蛋白 Nm23-H1 の発現低下と癌転移

との関係が相次いで報告されるようになった。特に乳癌、メラノーマなどの癌では発現低下が顕著であることが知られる一方で、発現が増加している癌として神経芽腫、膵臓癌が報告されている。癌や腫瘍の転移と

Nm23-H1 の発現との相関関係や予後との相関関係についての評価報告はあるが、癌や癌転移抑制における Nm23-H1 の機能：分子メカニズムはほとんど未知の状態であった。Nm23-H1 は細胞内においてホモ六量体、もしくは相同性の高い Nm23-H2 とヘテロの六量体を形成し、Nm23-H1 は主に細胞質に特異的に局在している。Nm23-H1 は NDPK (nucleoside diphosphate kinase) 活性を有し、Nm23-H2 は DNA と結合したり、c-Myc の transcription 活性があることや、transcription 制御で知られる PuF と同一であるという報告がある。

研究代表者らは腫瘍ウイルスの一つである EB ウイルスの核抗原 (EBNA3C, EBNA1) が Nm23-H1 と結合し Nm23-H1 による癌細胞の運動性を回復させることや、発現局在を細胞質から核内へと変えることを発見した。これは腫瘍ウイルスがヒトに癌を起こす以外で癌の悪性に関与する機能として初めての報告となった。この報告以降他のグループから EB ウイルス以外のその他の腫瘍ウイルス抗原による Nm23-H1 の制御と癌転移についての報告がなされた。またこれら *in vitro* 系で明らかにされた癌細胞の運動性回復の結果はマウスを用いた実験で検証し癌転移の抑制とウイルス抗原による癌の転移能回復を証明した。

我々は更に EB ウイルス感染のないびまん性大細胞 B リンパ腫より見出された onco-protein Db1-1 が Nm23-H1 と結合し、EB ウイルス抗原と同様に腫瘍細胞の運動性を回復させることを見出した。リンパ腫細胞において Db1-1 からのシグナルは Rho family 蛋白 Cdc42 や Rac1 に伝えられ、リンパ球細胞の運動性 (浸潤) が亢進する。しかし、Nm23-H1 が発現すると、細胞の運動性に変化が生じることを発見した。つまり、腫瘍ウイルスの感染後発現されるウイルス抗原や onco-protein は、本来細胞が保持する癌転移抑制蛋白質 Nm23-H1 と直接結合することで細胞情報伝達を乗っ取り、細胞の運動性制御を不能にしていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

Nm23-H1 が癌転移を抑制するメカニズムの解明に向け、我々はリンパ球細胞を用いた研究が主であった。しかし、動物実験で確認した乳癌の転移を Nm23-H1 単独で抑制できたことや、細胞の先端において actin network の構築に重要な役割を担っている Rho family 蛋白分子 Cdc42 と Rac1 が活性化され細胞運動能が亢進されるのに対し、Nm23-H1 がその活性化を抑制しているという点から、actin network は上皮系細胞に於いてより発達していることからリンパ球より大きな細胞質を持つ上皮細胞内には Nm23-H1 の未知作用標的

分子が存在すると考えた。新規標的分子の同定により癌転移・腫瘍浸潤のメカニズムの理解が進むとともに、癌転移に対する新規治療薬、治療法の開発に於いて有用であると思われる。更に、腫瘍ウイルス関連疾患や EB ウイルス感染症においてウイルスにより阻害されるシグナル経路の同定やそのメカニズムなどの解明など幅広い分野において理解と治療へ展開できると期待される。

3. 研究の方法

EB ウイルス抗原が Nm23-H1 分子に影響を与えることから、EB ウイルスが感染しておらず、高転移性を示す上皮系癌としてスキルスタブ胃癌を用いて Nm23-H1 分子の新規標的分子の検索を行うこととし、細胞株 HSC39, HSC57, HSC58 を準備した。細胞株のセルラートおよび大腸菌にて合成された GST-Nm23-H1 を用いて共沈実験を行った。共沈産物は質量分析 (MALDI-TOFMS 解析) を行い、新規標的分子の検索には Mascot search engine を使用した。新規標的候補分子は *in vitro* および *in vivo* に於いて binding assay を行った。

4. 研究成果

GST-Nm23-H1 と共沈したバンドを MALDI-TOFMS 解析により各バンドを解析した (Fig. 1)。324 スポット中 73 スポットが有効なスコアのもと検索結果として得た。

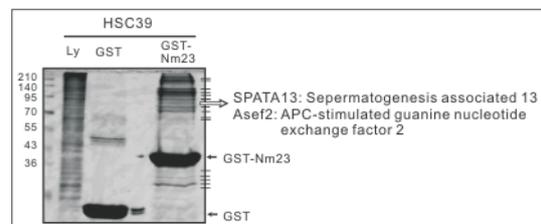


Fig1. HSC39 細胞可溶化物と GSTNm23 の共沈より対照である GST で認められないバンドを切り出し MALDI-TOFMS 解析を行った。矢印は解析により明らかとなった SPATA13 分子。

この 73 蛋白分子うち既報告の分子や重複した分子を除いたところ 62 分子が新規細胞標的候補として挙げた。これらを分類すると、細胞骨格形成分子 8 種、細胞接着関連分子 4 種、情報伝達分子 20 種、その他機能不明分子など 12 種であった (table1)。

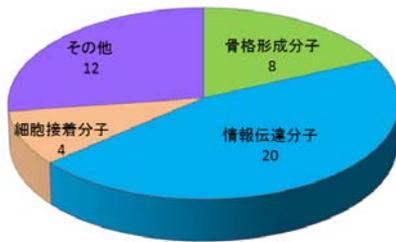


Table1 MALDI-TOFMS 解析により Nm23-H1 分子の標的分子群。ファミリー分子、サブユニット分子は1種として示した。

これらの候補分子のうち3種8分子について確認実験を行ったところ、いずれも Nm23-H1 分子と直接結合することを確認した。この3種のうちで癌細胞における発現や細胞接着の減少に関与することが知られる SPATA13(別名 Asef2) 分子に注目し、Nm23-H1 との関係を検討した。①互いの分子は直接結合し(Fig. 2)、②Nm23-H1 は Asef2 分子の PH ドメインに於いて特異的に結合することを明らかにした。③更に、Asef2 分子のファミリー分子である Asef1 に於いても同様の結果が得られた。

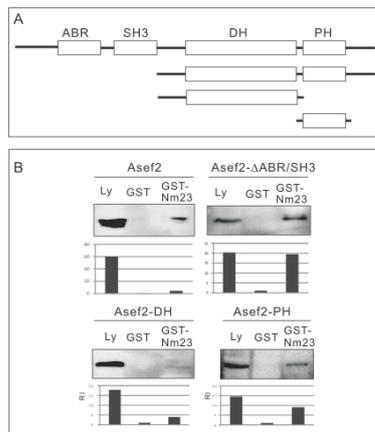


Fig. 2 A) Asef2 分子のドメイン構造を示す。B) Asef2 分子と Nm23-H1 の結合の証明および結合ドメインの決定。Nm23-H1 は Asef2 の C 末 PH ドメインと結合する。

④また両分子は細胞内での局在性も一致していることを確認した。⑤癌細胞の運動能は Asef2 単独及び変異型 APC (adenomatous polyposis coli) との共発現下では細胞運動能の亢進を示したが、⑥Nm23-H1 分子との共発現下では 40-50%の運動能の減少を確認した(Fig. 3)。

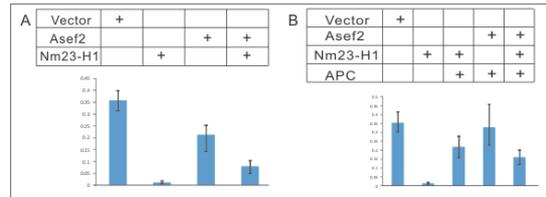


Fig. 3 細胞運動能の検討。Nm23-H1 単独では高転移性を示す細胞株の細胞運動能を抑制、Asef2 単独では若干の細胞運動能の低下が見られるが、Asef2—Nm23 同時発現では細胞運動能は大きく抑制された。また、Asef2 を活性化する APC は Asef2 単独に比べ細胞運動能を亢進させるが、Nm23 の発現で運動能は半減した。

現在これらの成果は学術雑誌に投稿中である。

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 8 件)

- ① Masayuki Imajoh, Yumiko Hashida, Masanao Murakami, et al. Characterization of Epstein-Barr virus BZLF1 gene promoter variants and comparison of cellular gene expression profiles in Japanese patients with infectious mononucleosis, chronic active EBV infection, and EBV-associated hemophagocytic lymphocytosis. J. Med. Virology. 査読有, 84(6), 2012, 940-946
- ② Yumiko Hashida, Yuiko Nemoto, Masayuki Imajoh, Masanao Murakami, 他 4 名, Promoter methylation of the bone morphogenetic protein 6 gene in multiple myeloma. Oncol. Rep. 査読有, 27(3), 2012, 825-830
- ③ Masanao Murakami 他 8 名, Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. J. Clin. Virology. 査読有, 50(1), 2011, 327-341
- ④ Abhik Saha, Masanao Murakami 他 (8 名中 6 番目), Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C facilitates G1-S transition by stabilizing and enhancing the function of the cyclin D1. PLoS Pathogen. 査読有, 7(2), 2011, e1001275, doi:10.1371
- ⑤ Jie Lu, Masanao Murakami, Subhash C. Verma, Rajeev Kaul, Erle S. Robertson. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1

- regulates survivin expression. Virology. 査読有, 410(1), 2011, 64-75
- ⑥ Abhik Saha, Adebowale Bamidele, Masanao Murakami, Erle S. Robertson. EBNA3C attenuates the function of p53 through interaction with inhibitor of growth family protein 4 and 5. J. Virology. 査読有, 85 (5), 2011, 2079-2088
- ⑦ Abhik Saha, Rajeev Kaul, Masanao Murakami, Erle S. Robertson. Tumor viruses and cancer biology: Modulating signaling pathways for therapeutic intervention. Cancer Biology & Therapy. 査読無, 10(10), 2010, 961-978
- ⑧ Tathagata Chouduri, Masanao Murakami, Rajeev Kaul, et. al. Nm23-H1 can induce cell cycle arrest and apoptosis in B cells. Cancer Biology & Therapy. 査読有, 9(12), 2010, 1065-1078

[学会発表] (計 9 件)

- ① 村上雅尚, 他8名, PCR array analysis in Japanese chronic active Epstein-Barr virus infection patients. The 60th conference of Japanese Society for Virology 2012. 11/13-15, 大阪
- ② Masanao Murakami, Yasutaka Senda, 他9名, Identification of new target for Nm23-H1 which is an adenomatous polyposis coli stimulated guanine nucleotide exchange factor 2. International congress on oncogenic herpesviruses and associated diseases: The 15th biennial meeting of the international symposium on Epstein-Barr virus and associated diseases and The 15th annual international workshop on Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related agents. 2012. 8/1-4. Philadelphia. PA. USA
- ③ 村上雅尚, Pathogenic Microbe infection and mechanism of cancer development. 日本生化学大会, 日本分子生物学会年会合同学会, 2010. 12/7-10. 神戸
- ④ 村上雅尚, Multiple oncogenic viruses identified in Ocular surface squamous neoplasia in HIV-1 patients. 日本ウイルス学会, 2010. 11/7-9. 徳島
- ⑤ 村上雅尚, Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. 日本癌学会, 2010. 9/22-24. 大阪
- ⑥ 村上雅尚, 転移抑制蛋白質 Nm23-H1 と EBV, B ウイルス感染症研究会・血球貪食症候群研究会, 2010. 3/6. 東京

[その他]
ホームページ等
http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_mcrbi/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 雅尚 (MURAKAMI MASANA0)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：080571017