

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592016

研究課題名(和文)一酸化窒素(NO)によるRTKリン酸化制御機構の分子生物学的解析と癌治療への応用

研究課題名(英文)Proteomic analysis for RTK regulation by nitric oxide and its application to cancer therapy

研究代表者

杉田 裕樹(SUGITA, Hiroki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：30398218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：NOによるIGFシグナル制御のメカニズムを解明するために、IRS-1蛋白と結合する蛋白がIRS-1の発現およびリン酸化を制御するという仮説の下、Yeast two hybrid assayを行った。IRS-1をbaitとし、これをYeastにて発現させcDNA libraryを遺伝子導入し発現させた未知の蛋白を釣り上げた。これにより、8個の蛋白が候補に上がった。これらの蛋白のほとんどが細胞膜近くにて増殖シグナルに関与すると思われるものであった。これらの蛋白の一つはIGFシグナルを制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of insulin-like growth factor(IGF) signaling regulated by nitric oxide, we performed Yeast Two Hybrid Assay which can search a protein binding to insulin receptor substrate(IRS)-1. Screening for cDNA library was performed. Eight proteins were selected as candidate of regulator of IRS-1. We found out that one of them bind to IRS-1 and regulated IGF signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：RTK 一酸化窒素(NO) IGF-iR IRS-1 PI3-K/Akt Yeast two hybrid assay 膵癌

1. 研究開始当初の背景

NOはIRS-1蛋白のコピキチン化とそれによる蛋白分解を誘導し、これによりIGF/insulinシグナルを抑制し膵癌細胞の増殖および浸潤制御に寄与することを報告してきた (Sugita H *et.al. Mol Cancer Res.* 2010;8(8):1152-63. Epub 2010 Jul 27.)。これまでの研究でNOがIGF-I/insulin receptorおよびEGFRのリン酸化をも抑制することを確認したがそのメカニズムについてはいまだ解明されていない。本研究においては、これらの分子生物学的メカニズムを解明すると同時に、*in vivo*においてNOドナーによる癌治療の有効性とそのメカニズムについて検証する。

2. 研究の目的

NOによる癌細胞増殖抑制のメカニズムを分子生物学的手法を用いて、網羅的に解明することである。特に、NOによるIGF-IR, EGFRの翻訳後修飾 (post-translational modification)によるリン酸化の制御のメカニズム (プロテオーム解析)を中心に研究する予定である。さらにNOを用いた治療 (NOおよびMEK-I併用療法)の有効性をヌードマウスに膵癌細胞 (MIAPaCa-2)を移植した担癌動物モデルにて検討する。

3. 研究の方法

(1) IRS-1をbaitとしたYeast Two Hybrid Assay: IRS-1 constructを発現ベクターpGBKT7にサブクローニングし、Yeastに遺伝子導入しGAL4-IRS-1 fusion proteinを発現させる。またpGAD/cDNA libraryも同じYeast内で発現させ、特定のアミノ酸欠損培地にて培養することで、IRS-1に結合する蛋白釣り上げた。

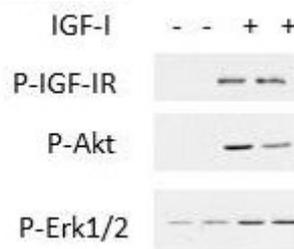
(2) protein binding assay: 膵癌細胞MIAPaCa-2のCell lysateにてIRS-抗体を用いた免疫沈降 (IP)、その後immunoblottingを行う。

(3)膵癌細胞MIAPaCa-2にて増殖アッセイ: IIGFシグナルを制御する蛋白を刺激した状態にてMTTアッセイを行う。

4. 研究成果

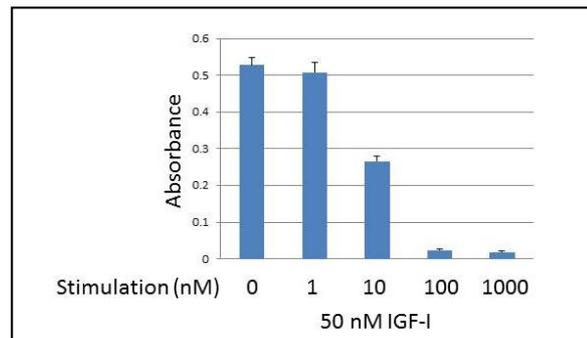
Yeast Two Hybrid Assayにて陽性であったクローンからcDNAの遺伝子配列をシークエンスすると8個の遺伝子/蛋白が候補に上がった。GeneBankにて検索すると、これらの蛋白のほとんどが細胞膜近くにて増殖シグナルに関与すると思われるものであった。その内1つの膜蛋白は、binding assayにてIRS-1結合した。また、膵癌細胞MIAPaCa-2にてこの蛋白を活性化させるとIGFシグナルが抑制された。またこれと同時に増殖アッセイにて増殖を抑制した (Fig 1, Fig 2)。

Fig. 1



蛋白の活性によりP-Aktの発現は抑制される

Fig. 2



蛋白の活性化により膵癌の増殖は抑制された。

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7件)

Ishikawa S, Hayashi H, Kinoshita K, Abe M, Kuroki H, Tokunaga R, Tomiyasu S, Tanaka H, Sugita H, Arita T, Yagi Y, Watanabe M, Hirota M, Baba H: Statins inhibit tumor

progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2013 Dec 17. [Epub ahead of print] 査読有
DOI: 10.1002/ijc.28672.

Furuhashi S, Sugita H, Takamori H, Horino K, Nakahara O, Okabe H, Miyake K, Tanaka H, Beppu T, Baba H: NO donor and MEK inhibitor synergistically inhibit proliferation and invasion of cancer cells. *Int J Oncol*. 2012 Mar;40(3):807-15. 査読有
DOI: 10.3892/ijo.2011.1243.

Sugita M, Sugita H, Kim M, Mao J, Yasuda Y, Habiro M, Shinozaki S, Yasuhara S, Shimizu N, Martyn JA, Kaneki M. Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 2012 Jan;61(1):127-36. 査読有
DOI: 10.1016/j.metabol.2011.06.001.

Sugita H, Kinoshita Y, Baba H: The duration of SIRS before organ failure is a significant prognostic factor of sepsis. *Int J Emerg Med*. 2012 Dec 31;5(1):44. 査読有
DOI: 10.1186/1865-1380-5-44.

Hirota M, Hashimoto D, Ishiko T, Satoh N, Takamori H, Chikamoto A, Tanaka H, Sugita H, Sand J, Nordback I, Baba H: Distal pancreatectomy using a no-touch isolation technique. *Scand J Surg*. 2012;101(3):156-9. 査読有
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22968237>

Furuhashi S, Sugita H, Takamori H, Horino K, Nakahara O, Okabe H, Abe S, Tanaka H, Beppu T, and Baba H: The combination of NO donor and MEK inhibitor synergistically inhibits proliferation and invasion of Cancer cells. *Int J Oncol* 2012 Mar; 40(3): 807-15. 査読有
DOI: 10.3892/ijo.2011.1243.

Sugita M, Sugita H, Kim M, Mao J, Yasuda

Y, Habiro M, Shinozaki S, Yasuhara S, Shimizu N, Martyn JA, Kaneki M: Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 2012 Jan;61(1):127-36. 査読有
DOI: 10.1016/j.metabol.2011.06.001.

〔学会発表〕(計3件)

杉田裕樹、「外科的手術が施行された残胃癌の予後についての検討」、第114回日本外科学会、2014年4月3日、国立京都国際会館(発表確定)

杉田裕樹、「絞扼性イレウスに対する腹腔鏡下イレウス解除術についての経験」、第26回日本内視鏡外科学会、2013年11月28日、福岡国際会議場

Sugita H, Furuhashi S, Baba H: The role of nitric oxide in growth factor signaling of cancer cells. 2nd World DNA and Genome Day, 2011.4.28. Dalian, China.

〔図書〕(計1件)

Sugita H, Furuhashi S, Baba H: *Intech, Pancreatic Cancer*, chapter: Nitric oxide regulates growth factor signaling in pancreatic cancer. 2012; 89-102.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田 裕樹 (SUGITA, Hiroki)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師
研究者番号：30398218

(2)研究分担者

高森 啓史 (TAKAMORI, Hiroshi)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師
研究者番号：90363514