

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700364

研究課題名(和文)新規神経癌関連因子SKAP2を中心とした脳腫瘍悪性化機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of novel glioblastoma-suppressor SKAP2

研究代表者

島村 真太郎 (SHIMAMURA, Shintaro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：30547138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍の悪性化には細胞の浸潤が深く関わっている。浸潤に関連するSrcキナーゼの下流の因子で、癌細胞で特異的に機能するものを標的とすることを考え、SKAP2という、従来癌への関与がほとんど知られていなかった因子を同定した。高浸潤型の腫瘍組織U87F4と繊維芽細胞を用いた解析で、SKAP2と相互作用する因子としてWAVE2とcortactinを同定し、SKAP2が細胞移動に関するアクチン重合を制御することを証明した。このような制御によりSKAP2が細胞移動や癌の浸潤を制御することを証明した。以上の結果をまとめてTHE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRYで発表した。

研究成果の概要(英文)：In our attempt to screen for substrates of Src family kinases in glioblastoma, Src kinase-associated phosphoprotein 2 (SKAP2) was identified. we demonstrate that SKAP2 physically associates with actin assembly factors WAVE2 and cortactin and inhibits their interaction. SKAP2 suppresses actin polymerization mediated by WAVE2 and cortactin in vitro. Knockdown of SKAP2 in NIH3T3 accelerated cell migration and enhanced translocation of WAVE2 to the cell membrane, and those effects of SKAP2 depend on the binding activity of SKAP2 to WAVE2. Furthermore, reduction of SKAP2 in the glioblastoma promoted tumor invasion both in ex vivo organotypic rat brain slices and immune-deficient mouse brains. These results suggest that SKAP2 negatively regulates cell migration and tumor invasion in fibroblasts and glioblastoma cells by suppressing actin assembly induced by the WAVE2-cortactin complex, indicating that SKAP2 may be a novel candidate for the suppressor of tumor progression.

研究分野：神経解剖学・神経病理学

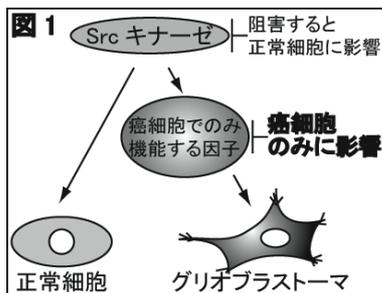
キーワード：癌の浸潤

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマ (神経膠芽腫) は、神経膠腫グリオーマの中で最も悪性度が高く、脳室内から髄膜・脊髄などへ転移し、手術適応外となりやすい。その悪性化の要因の1つに、細胞の浸潤能の高さがある。浸潤能には、細胞の移動能、間質細胞などへの接着能、ストレス抵抗性などが関与している。故に、グリオブラストーマの浸潤機構を解明し、標的分子を発見することが、脳腫瘍の治療への突破口になると考えた。

2. 研究の目的

癌細胞でのシグナル伝達として、細胞膜に存在するチロシンキナーゼ Src が細胞外の刺激を受け、複数の基質蛋白質がリン酸化され、下流にシグナルが伝わり悪性化を引き起こす経路がある (Yeatman, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, 470-480 (2004)). 本研究代表者が所属する研究室には Src 経路に関するバックボーンがあり、Src 経路は細胞の浸潤と関連が深いことから、この経路に着目した。臨床ではこれまで、チロシンキナーゼを標的分子とした治療が多く行われていたが、これは癌だけではなく正常細胞にも影響する危険があり、実際に副作用の問題があった。そこで、Src の下流の因子で、癌細胞では重要だが正常細胞にはあまり影響を与えない因子を見つけ、その因子を阻害する (逆にその因子が癌細胞の機能に負に働くものならば、促進させる) ことで癌の治療を行うという戦略のもと、そのような因子を探索することにした (図 1)。



実際に本申請者は、グリオブラストーマ低浸潤型細胞株 U87MG とより悪性の高浸潤型腫瘍組織 U87F4 の蛋白質抽出液に対して、Src 中の SH2 ドメインによるプルダウンと、抗リン酸化チロシン抗体によるクロマトグラフィーにより Src 基質蛋白質を精製した。これらを質量分析で解析したところ、U87F4 特異的因子の 1 つとして、SKAP2 (Src Kinase-Associated Phosphoprotein 2) が検出された。過去の報告で既に、SKAP2 が Src の基質で、インテグリンに関連した細胞移動・接着に影響を与えることは判っているが (参考: *Trends Cell Biol.*, 18 (10), 486-93, 2008, Review)、報告数自体少なく、未だ方向性は見えていない。また、SKAP2 の研究の多くは免疫細胞で行われており、癌での研究はあまり行われていない。以上より、SKAP2 は初歩的な解析はされていながら、癌からのアプローチは少ないという、チャンスの大きい因子であると考えた。

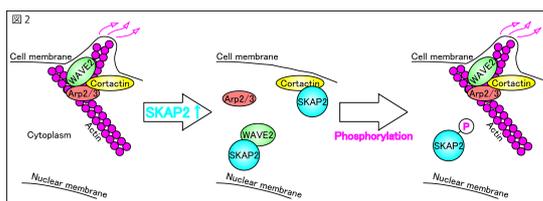
3. 研究の方法

SKAP2 が真の脳腫瘍抑制因子であることを調べるため、以下の実験を行った。

- ・ SKAP2 のノックダウン・過剰発現が細胞移動へ与える影響の解析
- ・ SKAP2 相互作用因子の探索
- ・ 分子レベルでの SKAP2 の機能解析
- ・ SKAP2 の個体マウスにおける癌の浸潤へ与える影響の解析
- ・ 脳以外の腫瘍組織における SKAP2 の役割の網羅的解析

4. 研究成果

ヒトグリオブラストーマU87MGをヌードマウスの脳室に移植し、飼育後に悪性化した腫瘍組織を採取し、また別のヌードマウスに移植することを4回繰り返した、高浸潤型の腫瘍組織U87F4を本研究に用いた。この細胞と繊維芽細胞を用いた解析で、SKAP2と相互作用する因子としてWAVE2とcortactinを同定した。これらの相互作用によりSKAP2が細胞移動に関するアクチン重合を制御することを証明した。このようなアクチン重合の制御により、SKAP2が細胞移動や癌の浸潤を制御することを、ノックダウンと過剰発現の両方の系で、細胞レベルと個体レベルで証明した。さらに、以上の全ての結果に対して、SKAP2のリン酸化の影響を検証した。2013年、以上の結果をまとめて、その論文をTHE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRYで発表した(図2)。



本研究ではSKAP2が脳腫瘍において癌抑制因子であることが示されたが、これに対して過去の報告では、SKAP2が細胞移動に正に働くことも示唆されている。このことから、SKAP2を臨床応用していくためには、SKAP2が癌抑制因子であるという土台を固めていくことが重要であり、そのために脳腫瘍以外の癌でSKAP2がどのような機能を持つか網羅的に検証した。その結果、特に乳腺の組織染色でSKAP2が癌に負に働くことを示唆する結果が得られた。そこで、乳癌に着目し、SKAP2との関係を細胞染色や生化学的な発現解析で調べ、乳癌に対してSKAP2が負の影響を持つことを示唆する結果を得た。さらに、乳癌細胞の移動やマウスにおける乳癌

の進行について、SKAP2が抑制的に働く結果が得られ、機能的な証拠が得られた。以上の結果を2014年日本癌学会学術総会で発表した。乳癌で得られた結果を脳腫瘍にフィードバックするための実験を行い、現在も進行中である。以上より、脳腫瘍を抑制する新規の因子としてSKAP2を同定し、その知見を複数の組織で検証し、抗癌剤開発に繋げるための基礎的な知見を得た。

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1件)

1. Shimamura S, Sasaki K, and Tanaka M: The Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and cortactin proteins. *The Journal of Biological Chemistry* (査読有り), vol. 288, no. 2, 1171-1183 (2013)

[学会発表](計4件)

1. 島村 真太郎, 田中 正光, SKAP2 suppresses breast cancer progression., 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

2. 島村 真太郎, 田中 正光, SKAP2-expressing macrophages lead the invasion of tumors., 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月5日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

3. 島村 真太郎, 佐々木 一樹, 田中 正光,
Srcキナーゼ基質蛋白質SKAP2のWAVE2と
Cortactinとの相互作用によるアクチン重合
への影響の解析, 第35回日本分子生物学会年
会, 2012年12月12日, マリンメッセ福岡(福
岡県・福岡市)

4. 島村 真太郎, 佐々木 一樹, 田中 正光,
A Src substrate SKAP2 regulates actin
assembly by interacting with WAVE2 and
Cortactin., 第 71 回日本癌学会学術総会,
2012年9月20日, 札幌市教育文化会館(北
海道・札幌市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

島村 真太郎 (SHIMAMURA, Shintaro)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号 : 30547138

(2)研究協力者

田中 正光 (TANAKA, Masamitsu)