

平成 2 6 年 6 月 1 2 日現在

機関番号 : 3 1 2 0 1

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2012 ~ 2013

課題番号 : 2 4 7 0 1 0 3 2

研究課題名 (和文) 大腸癌の新規治療標的としての G A T A - 6 分解システムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of proteolytic mechanisms of GATA-6 as novel molecular target of chemotherapy for colorectal cancer

研究代表者

牛島 弘雅 (Hironori, Ushijima)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号 : 9 0 5 0 9 0 4 3

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要 (和文) : GATA-6は初期胚の分化・増殖に必須の転写因子である。近年では消化器系の癌の増殖や生存に關与することが知られている。本研究では、『癌化学療法における分子標的として、GATA-6分解系はどの程度有効であるか』を明らかにしたいと考え、具体的に2つの課題：(1)GATA-6の分解を誘導するシグナル伝達経路の解明、及び(2)GATA-6分解誘導による抗癌作用の検証、を設定した。課題(1)では、種々のリン酸化酵素（キナーゼ）のスクリーニングを行い、新規な分解経路を見出した。課題(2)では、GATA-6の分解誘導薬によって、大腸癌細胞の細胞周期を分裂期で停止させ、増殖を抑制する作用が認められた。

研究成果の概要 (英文) : GATA-6 is transcription factor essential for differentiation or proliferation of early embryonic cells. Recently it is reported that GATA-6 involved proliferation and surviving of gastrointestinal tumor cells. In this study, I configured the research theme, "How effective is the degradation of GATA-6 as novel molecular target of chemotherapy for colorectal cancer". Especially I focused on two issues, (1) Identification of signal transduction pathway for degradation of GATA-6, and (2) Estimation of effectiveness of degradation of GATA-6 as novel anti-tumor chemotherapy. Experiment for (1) resulted that novel kinase pathway activating JNK involved degradation of GATA-6 via nuclear export pathway. The other experiment for (2) showed that JNK activator inducing proteolysis of GATA-6 arrested the cell cycle at G2/M phase, and suppressed proliferation of colorectal cancer cells.

研究分野 : 総合領域

科研費の分科・細目 : 臨床腫瘍学

キーワード : GATA-6 転写因子 大腸癌 PKA JNK

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子 GATA-6 は、初期胚の時期に発現が誘導され、中胚葉・内胚葉への分化およびその後の細胞増殖に必須の因子と考えられている。分化した細胞ではその発現量は一定のレベルにまで減少し、臓器特異的な遺伝子発現を調節している。一方、消化器系の多くの癌（臨床サンプル）では、GATA-6 の発現量が著しく増加していることが、近年相次いで報告され、抗癌剤耐性との関わりも示唆されている。

(2) 我々の研究室では、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1 細胞)を用いて、GATA-6 を安定に発現する細胞を作製し、GATA-6 の分解を誘導する分子機構について解析を進めてきた。

(3) この分解誘導機構が癌細胞においても同様に存在するのか否か、癌細胞の生存・増殖に影響を与えるのか否かに興味を持ち、これを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

『癌化学療法における分子標的として、GATA-6 分解系はどの程度有効であるか』を明らかにしたいと考え、具体的に 2 つの課題を設定した。

(1) 癌細胞において GATA-6 の分解を誘導するシグナル伝達経路の解明

細胞内の A kinase が活性化されると、タンパク質分解装置であるプロテアソームによって GATA-6 は分解される。しかしながら、A kinase が直接的に GATA-6 をリン酸化しているわけではなく、他のキナーゼの関与が示唆された。この分解シグナルネットワークに関与するキナーゼのスクリーニングすることを目的とした。

(2) GATA-6 分解誘導による抗癌作用の検証

癌細胞における GATA-6 の過剰発現は、主に消化器系の癌で報告されており、種々の癌細胞を比較した場合に、GATA-6 を高発現している細胞では、抗癌剤投与によるアポトーシスが起これにくいことが知られている。このことから、GATA-6 分解誘導による抗癌効果を検証し、癌化学療法における分子標的としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GATA-6 の分解を誘導するシグナル伝達経路の解明

GATA-6 を安定発現させた CHO-K1 細胞を使用した。A kinase の活性化には dbcAMP(ジブチリルサイクリック AMP)を

使用した。A kinase 活性化時に機能するキナーゼを探索するために、キナーゼ阻害剤キット(化学療法基盤支援活動、標準阻害剤キット)を使用した。薬剤を作用させた後、細胞を回収し、タンパク質サンプルを調製後、ウェスタンブロット法により GATA-6 の発現量を比較検討した。この方法では、キナーゼ阻害剤の添加により GATA-6 の分解が抑制された場合、その阻害したキナーゼが、A kinase とクロストークしている可能性が考えられる。以上の方法で候補キナーゼをピックアップし、濃度依存性などを個別に検討した。

(2) GATA-6 分解誘導による抗癌作用の検証

GATA-6 を高発現している細胞株として、ヒト直腸癌の細胞株である DLD-1 細胞を用いた。DLD-1 細胞に GATA-6 分解を促進する薬剤である anisomycin を添加し、その後の細胞増殖を継続的に測定した。また、細胞周期の解析も同時に行った。最近では、培養ディッシュに播いた状態での、いわゆる平面培養法に加え、より生体に近いモデルと考えられている 3 次元培養(立体培養)の手法も検討されている。そこで本研究においても 3 次元培養条件下での GATA-6 分解の影響を解析した。3 次元培養の方法としては、3D-petridis によるスフェロイド (Spheroid) 培養の方法を採用した。

4. 研究成果

(1) GATA-6 の分解を誘導するシグナル伝達経路

方法に記したように、dbcAMP-A kinase 活性化により誘導される GATA-6 の分解に対して、キナーゼ阻害剤を加えた場合の影響を検討した。使用した細胞は GATA-6 を安定発現させた CHO-K1 細胞(表中の tc1-17a 細胞)で、用いたキナーゼ阻害剤は 95 種類である。このうち GATA-6 分解が抑制されたものを表 1. に示す。

Table 1. 6 kinase inhibitors strongly inhibited GATA-6 degradation

Compound	Category	MW	IC ₅₀ (enzyme)	Inhibition
Cdk1/2 inhibitor III	CDK	425.4	600 nM	+
TBB	CKII (casein kinase)	434.7	0.9 μM	++
SP600125	JNK	220.2	40 nM	++
LY-294002	PI3K	343.8	1.4 μM	+
Wortmannin	PI3K	428.4	5 nM	++
4-cyano-3-methylisoquinoline	PKA	168.2	30 nM	++
Bisindolymaleimide I	PKC	448.9	20 nM	-
VEGFR tyrosine kinase inhibitor II	VEGF	337.8	10 nM	-

tc1-17a cells were cultured for 24 hr in the presence (+) or absence (-) of 2 mM dbcAMP together with 1 μM inhibitors for various protein kinases. The nuclear extract was separated by SDS-PAGE, and GATA-6 was detected by Western blotting using antibodies recognizing the C-terminal of GATA-6.

表 1. GATA-6 分解を抑制したキナーゼ阻害剤

検討した結果、A kinase の阻害剤を加えた場

合と同等の分解抑制効果を示したものを5種類同定することができた。即ち、A kinase とのクロストークが示唆されるキナーゼとして、CDK (cyclin dependent kinase), CKII (casein kinase II), JNK (c-jun N terminal kinase), PI3K (phosphoinositide-3 kinase) の4つを見出した。

これらの4つのキナーゼのうち、直接的にJNK キナーゼを活性化する薬剤として使われていた anisomycin を購入し、JNK 経路単独でもGATA-6分解が誘導されるか否かの検討を行った。その結果、anisomycin 単独でも、GATA-6の分解が誘導されることがわかった。

薬剤投与によりGATA-6が分解される時間について検討したところ、A kinase を活性化させた場合に比べて、JNK を活性化させるとGATA-6の分解が3~6時間のうちに起きることが分かった。このことから、A kinase 活性化による分解機構とは異なる機構が示唆された。

GATA-6は核に局在してその機能を果たしているが、A kinase 活性化により細胞質へとその局在がシフトし、タンパク質分解を受けることが分かっている。そこで、anisomycin 添加後の挙動についても同様の解析を行った。その結果、GATA-6は核外輸送タンパク質CRM1により核外へと運搬され、細胞質でプロテアソームによる分解を受けることが分かった。GATA-6のアミノ酸配列には、核外輸送シグナルに相当するアミノ酸モチーフが存在しており、CRM1の認識配列に相当すると考えられる。図1.に今回明らかになった分解経路の模式図を示す。

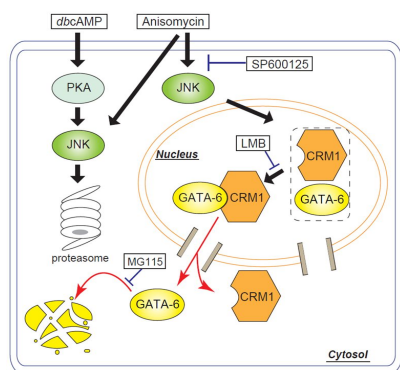


図1. A kinase 及び JNK 活性化によるGATA-6 分解機構

本研究により、GATA-6の分解機構にJNKが関与していることが明らかになった。また、転写因子の局在部位によって、その活性が調節されている可能性を示唆することができた。JNKの活性化は、主に紫外線や抗癌剤などの薬物によって起こり、細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。GATA-6が癌細胞の抗癌剤抵抗性を増強することを考慮すると、JNKの活性化剤は癌細胞のアポトーシス誘導、及び抗癌剤感受性を高めることが期待される。

(2) GATA-6 分解誘導による抗癌作用の検証
GATA-6 を高発現している癌細胞であるDLD-1 細胞に対して、JNK 活性化剤 anisomycin を作用させその抗癌作用を検証した。

その結果、0.5 ~ 1 μ M の anisomycin を作用させるとGATA-6の分解が確認できた。また、薬剤添加後24時間以降では細胞増殖が停止することがわかった。細胞増殖の抑制作用については、3D-petridishを用いた3次元培養の条件下でも検討を行った。通常の培養条件下では、スフェロイド (Speroid) と呼ばれる細胞塊を形成し大きくなるが、anisomycin 添加時では細胞増殖が抑制され、スフェロイドは小さいままであった(図2)。

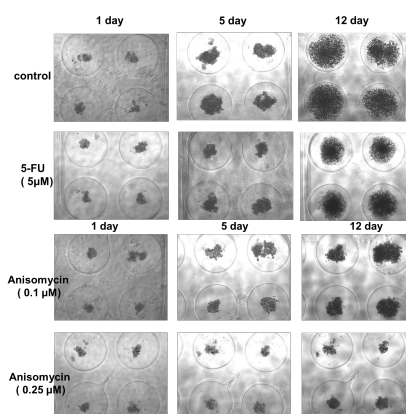


図2. Anisomycin によるスフェロイド形成の抑制

この抑制効果はGATA-6をノックダウンした場合にも確認されたことから、細胞塊の形成においてGATA-6が必要であることが示唆された。

Anisomycin 投与によって細胞増殖が抑制されたことから、細胞周期に対して影響を与えていると考えられた。そこで、フローサイトメーターを用いて、細胞の状態を詳細に解析した。

その結果、Anisomycin を作用させると、細胞周期はG2/M期(分裂期)で停止することが分かった。また、細胞死が起きているか否かについても検証したが、アポトーシス、ネクローシスともに確認できなかった。大腸癌細胞の特徴である、浸潤活性(癌転移に關与)の測定も行ったが、浸潤を抑制するような作用は認められなかった。

以上の結果、JNK 経路の活性化により、GATA-6の分解が起きることがヒト大腸癌細胞でも確認でき、細胞塊の形成を抑制することが分かった。大腸癌以外にも胃癌、食道癌、膵癌、肺癌などではGATA-6の高発現が認められることから、これらの癌細胞に対してもGATA-6分解の有効性が強く期待される。細胞死を誘導する作用は強いことを考慮すると、既にサイズが大きくなっている腫瘍に対しては他の抗癌剤との同時投与が望ま

しいと考えられる。

本研究の成果から、GATA-6 分解経路は大腸癌細胞の増殖抑制を導くことがわかった。一方で、GATA-6 が転写因子である点を踏まえると、細胞周期を分裂期で停止させている主たる因子は何か、癌抑制遺伝子の発現パターンはどうなっているのか等、GATA-6 によって支配されている遺伝子とその機能の解明が必要であると考えられる。そのようにして標的遺伝子をより明確にすることが、癌化学療法における分子標的を決定するのに必須であると考えられる。

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (計 2 件)

(1) Hironori Ushijima, Masatomo Maeda: c-AMP dependent proteolysis of GATA-6 is linked to JNK pathway., Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有り, 423, 2012, 679-683.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.013

(2) Hironori Ushijima, Masatomo Maeda: Inhibitors of protein kinases affecting cAMP dependent proteolysis of GATA-6., Advances in Biological Chemistry, 査読有り, 2, 2012, 411-415.
DOI: 10.4236/abc.2012.24051

学会発表 (計 5 件)

(1) 中目祐紀、荒木信、生島弘雅、前田正知：遺伝子破壊法による GATA-6 分解機構の解析、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台

(2) 生島弘雅、法霊崎明子、前田正知：JNK signaling promotes proteolysis of GATA-6 and suppresses growth of colorectal cancer cells., 第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 13 日、横浜

(3) Hironori Ushijima, Kimika Endo, Masatomo Maeda: Mechanism of anisomycin-induced nuclear export of GATA-6., FAOB Mini Symposium “Molecular Basis for Medical and Pharmaceutical Sciences”, 6 Apr, 2013, Iwate, Japan.

(4) 遠藤希美加、生島弘雅、前田正知：JNK シグナルを介した GATA-6 分解機構の解析、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012 年 10 月 12 日、青森

(5) Hironori Ushijima, Kimika Endo, Yuki Nakanome, Masatomo Maeda: Proteolytic mechanisms of GATA-6 facilitated by activation of JNK signaling pathway., The 26th Annual Symposium of The Protein Society, 5 Aug, 2012, San Diego, USA.

図書 (計 0 件)

該当無し

産業財産権 (計 0 件)

該当無し

その他

岩手医科大学・薬学部・分子生物薬学講座ホームページ

http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=47

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛島 弘雅 (Ushijima Hironori)

岩手医科大学・薬学部・分子生物薬学講座・助教

研究者番号：90509043

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し