

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830096

研究課題名(和文) スキルス胃がんの浸潤及び腹膜播種に關与する新規チロシンリン酸化タンパクの同定

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of phosphotyrosine proteins in scirrhous gastric cancer

研究代表者

白木原 琢哉 (Shirakihara, Takuya)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30548756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃がんの進展に關与するチロシンリン酸化タンパク質を新規に同定することを目標に実験を進めた。当初は胃がんと周辺細胞との共培養によるリン酸化タンパク質を探索したが検出することができなかった。そこでびまん性胃がんでの遺伝子増幅が高頻度に認められているFGFR2とMetに着目し、下流のリン酸化標的タンパク質を探索した。抗受容体抗体と抗リン酸化抗体で段階的に精製したタンパク質を質量分析法で解析した結果、各々の細胞株から約200の候補タンパク質を同定した。検出スコアや細胞株間比較から絞り込んだ候補タンパク質は、スキルス胃がんの増殖や運動に深く關与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify some novel phosphotyrosine proteins related to development of Scirrhous gastric cancer. Although coculture of gastric cancer cells with surrounding cells was performed, none of apparent phosphorylation depend on coculture were detected. So next we tried to reveal downstream effectors of receptor tyrosine kinases such as Met or FGFR2 in diffused type gastric cancers. Proteins purified using anti-receptor antibody and anti-phosphotyrosine antibody, then identified by mass spectrometry. Finally, some data of functional analysis indicates these identified proteins have important roles in malignancy of Scirrhous gastric cancer.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：スキルス胃がん チロシンリン酸化 受容体型チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃がんの進行例では高頻度に腹膜内に浸潤し、腹膜表面に点在して広がる腹膜播種が見られる。腹膜播種は臨床上、手術で取り除くことが難しく覆水貯留や腸管の機能障害を引き起こし、生活の質的低下のみならず生命予後にも深く関わる。しかし、胃がん細胞がどのようにして胃壁から腹膜へ向けて浸潤を開始する能力を獲得するのか、また腹膜の中皮細胞や基底膜と相互作用をして増殖するのかについての理解は未だ極めて乏しい。

申請者らの研究室では、以前にスキルス胃がん細胞株をヌードマウス腹腔内に移植して腹膜播種から回収したタンパク質の生化学的解析を行った。その結果、足場非依存性に関与する CDCP1 のリン酸化亢進などが認められ、原発巣とは異なる周辺環境の存在が胃がん細胞の性質に大きく影響を及ぼしていることが示唆された。

そこで、本研究ではよりシンプルな *in vitro* の共培養系を出発点として、スキルス胃がんと周辺微小環境の相互作用に迫り、新規のチロシンリン酸化タンパク質の同定を通じて浸潤と腹膜播種の更なる理解を試みることを考えた。

2. 研究の目的

微小環境との相互作用等によるスキルス胃がんの特徴的なチロシンリン酸化タンパク質を同定し、がん悪性化に対する新しい治療標的を示す。

3. 研究の方法

(1)スキルス胃がん細胞とがん微小環境の相互作用で誘導されるシグナル変化を探索する。

胃がん細胞が間質組織中で増生して浸潤

能を獲得する段階と、腹腔内に散在した胃がん細胞が腹膜上の中皮細胞に接着して増殖する段階をそれぞれ調べるために、CaF (がん関連線維芽細胞) や中皮細胞とスキルス胃がん細胞株を様々な条件下で共培養する。

単独培養と共培養の細胞成分をそれぞれ抽出し、共培養特異的にチロシンリン酸化するタンパク質を探索する。銀染色にて目的バンドを確認できたなら質量分析法を用いてタンパク質の同定を行う。

(2)浸潤及び腹膜播種の場合で同定した新規リン酸化タンパク質の作用機序を解析する。

同定された複数のチロシンリン酸化タンパク質の中から生化学的に意義のあるもの、つまりスキルス胃がんの浸潤や腹膜播種を促進するシグナルに関与するものを選抜するための検証実験を行う。スキルス胃がん細胞株と非スキルス胃がん細胞株を比較して、特にスキルス胃がんにて高リン酸化が認められるタンパク質を選択する。

RNAi を用いた機能欠損及びリン酸化部位の変異体を用いてチロシンリン酸化状態ががん悪性化に関わるタンパク質を候補中から選別する。

候補タンパク質が *in vivo* においてもリン酸化を受けて腫瘍の進展に寄与していることを、マウスモデルを用いながら確認する。

(3)見出したリン酸化タンパク質とそのシグナル経路の治療標的としての評価を行う。

候補タンパク質のチロシンリン酸化を阻害する方法について阻害剤キット等を利用してしながら検討する。

候補タンパク質のリン酸化阻害剤がスキルス胃がん進展の予防や治療の足がかりになることをマウス移植モデルで検討する。

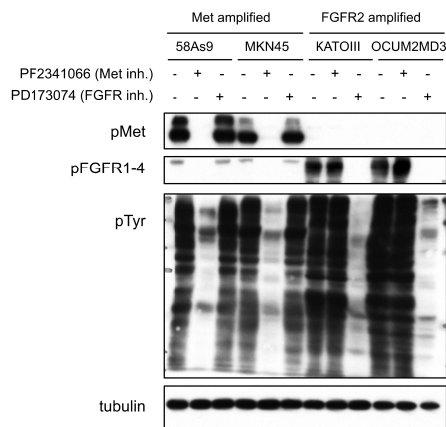
4. 研究成果

(1) スキルス胃癌細胞株と CaF との共培養の条件検討

スキルス胃癌細胞株と線維芽細胞・中皮細胞の共培養を行う際の種々の条件について検討を行った。具体的には、用いる細胞株の種類、単層培養や三次元培養などの培養方法、混在させる細胞比率と細胞密度、培養時間、血清濃度、剥離方法などを変えながらタンパク質回収を行い、抗リン酸化チロシン抗体を用いて共培養特異的リン酸化タンパク質を探索した。しかし、再現性良くリン酸化が認められる新規タンパク質を発見することができなかった。

(2) 受容体型チロシンキナーゼの標的タンパク質の探索

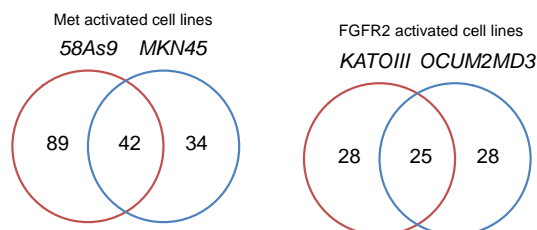
未分化型胃癌の細胞では、受容体型チロシンキナーゼの遺伝子増幅が高頻度に観察されることが知られている。Met の増幅している 58As9 細胞と MKN45 細胞に対して Met 阻害剤である PF2341066 を処理したところ、チロシンリン酸化タンパク質のほとんどでリン酸化レベルが劇的に低下した。一方、FGFR2 の増幅している KATOIII 細胞と OCUM2MD3 細胞に対して FGFR 阻害剤である PD173074 を処理すると同様に細胞内のチロシンリン酸化レベルが低下した。このことから Met、FGFR2 の遺伝子増幅している胃癌細胞株では細胞内のチロシンリン酸化タンパク質の大半がこの受容体型チロシンキナーゼによって制御を受けていることが明らかになった。また、阻害剤を処理すると増殖阻害や細胞死、運動抑制が強力に誘導されることからチロシンリン酸化タンパク質を介したシグナル経路ががん進展に極めて重要であることが示唆された。



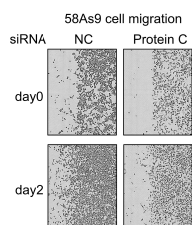
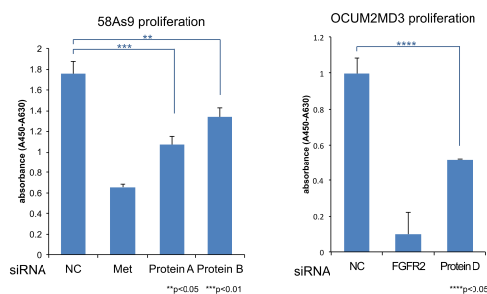
Met, FGFR の活性阻害によるチロシンリン酸化レベルの変化

研究開発当初の目標であった胃癌細胞と周辺細胞の相互作用による活性化ではないが、スキルス胃癌を含む未分化型胃癌細胞に特徴的なチロシンリン酸化のシグナル経路を明らかにすることで本態解明を目指すことを考えた。

Met 活性型胃癌細胞株の 58As9 細胞、MKN45 細胞と FGFR2 活性型胃癌細胞株の KATOIII 細胞、OCUM2MD3 細胞からそれぞれ細胞内総タンパク質を抽出し、抗受容体抗体と抗リン酸化チロシン抗体の二段階免疫沈降法によるタンパク質精製を行った。銀染色で検出したバンドを切り出して質量分析法で同定した結果、それぞれの細胞株から約 200 の候補タンパク質を得た。検出スコアの閾値を上げて細胞間比較を行い、Met 活性型は 42、FGFR2 活性型は 25 の候補タンパク質まで絞り込んだ。なお、Met 型と FGFR2 型の候補で共通するタンパク質は同定されなかった。



(3)同定した新規リン酸化タンパク質の評価
Met 活性化型に共通する 42 タンパク質と FGFR2 活性化型に共通する 25 タンパク質について、受容体への結合とチロシンリン酸化を確認したのに対してがん進展への寄与について評価を行った。siRNA によるノックダウンを行い、増殖、生存、足場非依存性、運動、浸潤、幹細胞性、薬剤耐性などを評価した。その結果、数種類の候補タンパク質で細胞増殖と細胞運動への関与が認められた。現在これらのタンパク質に対してリン酸化の意義を含めた詳細な機能解析を進行中である。また、マウスモデルを用いた造腫瘍能や腹膜播種に対する影響について解析を行うことを計画している。



候補タンパク質の細胞増殖、細胞運動に対する影響

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

白木原琢哉, 山口英樹, 堺隆一. スキルス胃癌における活性化受容体結合タンパク質の同定と機能解析, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月, 名古屋

白木原琢哉, 山口英樹, 堺隆一. スキルス胃癌の浸潤・腹膜播種に關与する活性

化受容体結合タンパク質の解析, 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2015 年 7 月, 大阪

白木原琢哉, 堺隆一. スキルス胃癌の浸潤・腹膜転移への FGF シグナルの關与, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月, 横浜

白木原琢哉, 堺隆一. スキルス胃癌の浸潤・腹膜転移への FGF シグナルの關与, 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2014 年 7 月, 金沢

6 . 研究組織

(1)研究代表者

白木原 琢哉 (SHIRAKIHARA, Takuya)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 30548756