

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460389

研究課題名(和文) がん細胞と間質細胞との相互作用ががんの浸潤・転移を制御する新たな分子機構

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms that regulate tumor invasion and metastasis by association of cancer cells with surrounding stroma cells

研究代表者

扇田 久和 (Ogita, Hisakazu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50379236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん死の大部分を占めるがんの浸潤・転移に関して、そのモデル環境を構築し、その環境下でがん細胞において発現量が有意に増加している遺伝子をDNAマイクロアレイ法でゲノム網羅的に探索した。有意に発現量が増加していた遺伝子の内、細胞表面に発現している遺伝子を1つ選んで検討を行った結果、この遺伝子の発現増加により、がん細胞の運動能が亢進し、マウスを用いた実験で浸潤・転移が増加することを見出した。この遺伝子が細胞運動を亢進させるシグナル伝達機構も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I focused on the tumor invasion and metastasis that is a major course of cancer death, and constructed the model to reflect this pathological condition in vitro. Using this model, I conducted the genome-wide analysis by DNA microarray assay to identify the genes of which expression was significantly increased in target cancer cells. After this analysis, I could select one gene. The gene product (molecule) is reported to localize on the plasma membrane of cancer cells. I found that the molecule remarkably promoted cancer cell motility, and that tumor invasion and metastasis was highly observed in the mice in which the cancer cells overexpressing the molecule were implanted. Furthermore, the signal transduction mechanism to facilitate cancer cell motility by this molecule was revealed successfully.

研究分野：生化学

キーワード：細胞接着 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

現在の日本においてがん（悪性新生物）による死亡は全死亡の約30%を占め、死亡原因の第1位である。がんが生命を脅かす最大の要因は、がんの浸潤・転移にある。実際、原発巣が原因で死亡するがん患者はがん患者全体の約10%程度にすぎず、残り約90%のがん患者はがんの浸潤・転移で亡くなっている。したがって、**がん死をより効果的に抑制するためには、がんの浸潤・転移のメカニズムについて詳細に理解し、それを制御できるようにすることが重要である。**

がんの進展および浸潤・転移の様態は、多段階プロセスであることが広く受け入れられている。すなわち、がん細胞の1) 原発巣からの離脱、2) 周囲組織（間質）への浸潤、3) 血管あるいはリンパ管内への侵入と管内での移動、4) 転移臓器での血管あるいはリンパ管からの脱出、5) 転移臓器での生着と再増殖、というプロセスを経てがんの転移巣が形成される。このような転移巣の形成は、臓器の機能低下・喪失を招き、個体にとって危機的な状態に陥る。このがんの浸潤・転移プロセスのうち、初期段階である2)の段階では、がん細胞と間質細胞の相互作用が生じる。この相互作用に関しては大きく、a) それぞれの細胞から分泌される液性因子を介した間接的な相互作用と、b) 両者の細胞間での接触・接着による直接的な相互作用とに分類できる。これまで国内外では a) の研究が多く行われてきたが、b) の研究についての報告は現在のところあまり多くなく、研究すべき余地が大きく残されている。

申請者は最近、**浸潤したヒト前立腺がん細胞とその周囲の間質細胞との接触・接着によってもたらされる直接的な相互作用が、どのようにがん細胞の遺伝子発現に影響するのか、その影響を特異的に解析する新しい実験系を確立している。**この実験系を用いて、前立腺がん細胞と間質細胞との相互作用により影響を受けた遺伝子を、DNAマイクロアレイによりゲノムワイドに解析した結果、有意に発現増加している遺伝子が55個、逆に、有意に発現減少している遺伝子が8個存在するを見出した。

本研究で、これら発現量に変化した遺伝子に着目し機能解析を行うことで、**がんの浸潤・転移の全容解明の一助となり、今後の新しいがん治療法開発、特に、“がんの浸潤・転移の抑制”を目標としたがん治療の開発につなげられるような知見を提供できるようにする。**

2. 研究の目的

(1) 浸潤を開始したがん細胞とそれを取り巻く間質細胞に着目して、この両細胞間での直接的な細胞どうしの接触による相互作用が、がん死の最大の原因であるがんの浸潤・転移のメカニズムをどのように制御しているのか、その新たな分子機構を明らかにすること。

(2) (1)の解析を通して、がんの浸潤・転移の抑制を目標とした、これまでとは異なるコンセプトに基づく、将来の新しいがん治療開発への基礎医学的基盤を構築すること。

3. 研究の方法

(1) 下記“4. 研究成果”で述べる細胞表面に発現する3遺伝子について、ヒトがん細胞から抽出したRNAをもとに、RT-PCRを行ってcDNAを合成した。これらのcDNAをGFPやFLAGタグ付きの哺乳類発現ベクターに挿入してプラスミドを精製し、哺乳類細胞に導入してその遺伝子産物（タンパク質）を発現させた。

(2) 細胞運動能の解析として、ポイデンチャンバーアッセイを行った(図1)。ポアサイズ8.0 μmのフィルターを持つチャンバー(Becton Dickinson社製)を使用した。

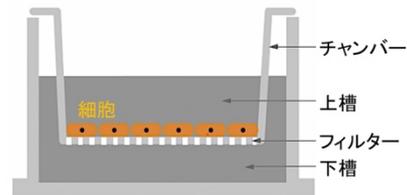


図1: ポイデンチャンバーアッセイの概略
下槽に移動する細胞が多いほど、運動能が亢進していることになる

(3) Mol-1 結合分子の探索 (Mol-1 については、“4. 研究成果”の項を参照) : Mol-1の細胞内ドメインをペプチド合成し、ビーズに固相化した後、カラムに充填した。このカラムにヒト前立腺がん LNCaP 細胞の抽出液を流し、結合したタンパクを SDS-電気泳動で分離した。コントロールと比較して有意に検出された8つのバンドについて質量分析を行い、Mol-1へ結合するタンパク質 (Mol-1-BP) を同定した。

(4) Rac1 活性化解析実験 : 細胞抽出液に GST 融合 PAK-CRIB タンパク質を加えて、冷温下でゆっくりと回転混合した。その後、グルタチオンアガロースビーズを添加して、活性化した GTP 結合型 Rac1 のみビーズに結合させた。ビーズに結合した Rac1 は抗 Rac1 抗体 (BD Transduction社製) で検出した。

(5) ノードマウスへのがん細胞移植実験 : 1×10⁶個のコントロールまたは Mol-1 過剰発現 LNCaP 細胞をオスノードマウス前立腺に移植し、5週間飼育後、安楽死させ、前立腺、リンパ節および肺などの臓器を摘出して原発巣および転移巣について顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

“1. 研究開始当初の背景”で述べた、DNAマイクロアレイ解析で得られた結果 (有意に発現増加している遺伝子が55個、有意に発現

減少している遺伝子が 8 個) について、詳細に検討を行った。これらの遺伝子の内、がん細胞での機能が不明であり、かつ、細胞表面に存在する遺伝子に絞ったところ、3 遺伝子を選択できた。

これら 3 遺伝子について、LNCaP 細胞に発現プラスミドを導入して遺伝子産物を過剰発現させ、細胞応答を解析したところ、その内の一つ(仮称 Mol-1)に細胞運動を促進させる働きがあることが、ボイデンチャンバーアッセイで分かった(図 2)。Web 上での解析結果より、Mol-1 は 4 回膜貫通型の細胞表面分子であり、細胞接着能を有する可能性が示唆された。

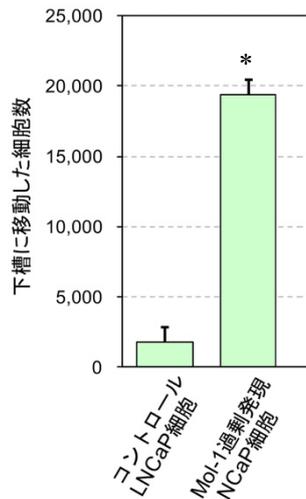


図2: ボイデンチャンバーアッセイの結果
*p<0.05 vs コントロール

次に、Mol-1 による細胞運動促進のメカニズムを解明するため、Mol-1 に結合する分子を探索した結果、Mol-1-BP (仮称) を質量分析法で同定した。さらに、Mol-1-BP が Mol-1 と結合する領域を明らかにした。Mol-1 による細胞運動促進が、Mol-1-BP を介しているかどうか調べるために、Mol-1-BP をノックダウンした LNCaP 細胞を作製し(図 3)、ボイデンチャンバーアッセイを行った。その結果、Mol-1 の過剰発現による細胞運動の亢進が、Mol-1-BP のノックダウンにより抑制された。このことより、Mol-1→Mol-1-BP のシグナル伝達系により、LNCaP 細胞の細胞運動が正に制御されていると考えられた。

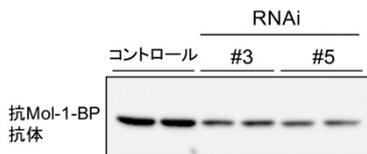


図3: Mol-1-BPに対するRNAiの結果
RNAi #5でより効率よくMol-1-BPの発現が抑制されている

Mol-1 が Mol-1-BP を介して細胞運動を促進させているシグナル伝達系を詳細に検討した。Mol-1 を過剰に発現した LNCaP 細胞では、コントロールの LNCaP 細胞と比較して、チロシンリン酸化酵素 Src の活性化が上昇していた(図 4)。さらに、低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性も上昇していた。Rac1 は運動している細胞の進行方向

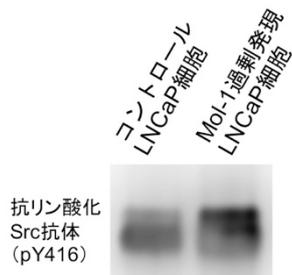


図4: Mol-1によるc-Srcの活性化

にラメリポディアという細胞突起の形成を促し、細胞運動を亢進させることが知られている。Src や Rac1 の活性化は Mol-1-BP のノックダウンにより抑制された。また、活性化した c-Src がどのように Rac1 を活性化しているのか検討したところ、Src が Rac1 の GDP/GTP 交換因子 Vav2 をリン酸化して活性化していることが明らかになった。Mol-1 による細胞運動の亢進と Src、Rac1 の活性化は、LNCaP 細胞だけでなく、ヒト乳がん細胞株でも見られた。これらのことから、Mol-1 は上記の細胞内シグナル分子を活性化し、様々ながん細胞の運動能を亢進させ、がんの浸潤・転移に関わっていると考えられた(図 5)。

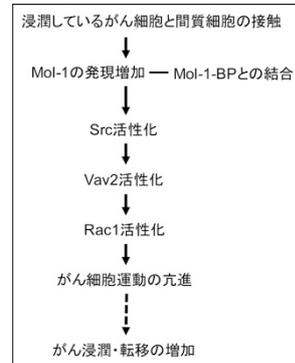


図5: 今回の研究で明らかになったがん浸潤・転移を促進するシグナル伝達機構

最後に、マウスを用いた *in vivo* 実験を行った。Mol-1 を過剰に発現した LNCaP 細胞をオスヌードマウスの前立腺に移植したところ、5 週間後に肺への転移巣が複数確認された。コントロールの LNCaP 細胞を注入してもそのような転移巣は見られなかった。

以上の結果より、Mol-1 の作用を阻害する化合物や特異抗体などを見出すことで、がんの浸潤・転移を抑制する新たな抗腫瘍薬開発を展開できる可能性がある。今後は、このような阻害物質を Mol-1 高発現腫瘍を有する実験動物に投与することで、実際に浸潤・転移が減少するかを、トランスレーショナル研究として行っていく予定である。

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 9 件)

- ① Sato A, Ogita H. Pathophysiological implications of dipeptidyl peptidases. *Curr Protein Pept Sci*. 2017; in press. 査読有
DOI:10.2174/1389203718666170329104936
- ② Zankov DP, Shimizu A, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Ogita H. Protective effects of intercalated disk protein afadin on chronic pressure overload-induced myocardial damage. *Sci Rep*. 2017; 7: 39335. 査読有
DOI: 10.1038/srep39335
- ③ Muraki S, Ueyama H, Tanabe S, Yamade S, Ogita H, Ohji M. Novel mutations in the L visual pigment gene found in Japanese men with protan color-vision

- defect having a normal order L/M gene array. *Ophthalmic Genet.* 2016; 37: 471-472. 査読有
DOI: 10.3109/13816810.2015.1120319
- ④ Pang X, Shimizu A, Kurita S, Zankov DP, Takeuchi K, Yasuda-Yamahara M, Kume S, Ishida S, Ogita H. Novel therapeutic role for dipeptidyl peptidase III in the treatment of hypertension. *Hypertension.* 2016; 68: 630-641. 査読有
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07357.
- ⑤ Kuniyoshi K, Muraki S, Ueyama H, Toyoda F, Sakuramoto H, Ogita H. Irifune M, Nakao A, Yamamoto S, Iwata T, Ohji M, Shimomura Y. Novel mutations in the gene for α -subunit of retinal cone cyclic nucleotide-gated channels in a Japanese patient with congenital achromatopsia. *Jpn J Ophthalmol.* 2016; 60: 187-197. 査読有
DOI: 10.1007/s10384-016-0424-6
- ⑥ Ueyama H, Muraki S, Tanabe S, Yamade S, Ogita H. A new subset of deutan color-vision defect associated with an L/M visual pigment gene array of normal order and -71C substitution in the Japanese population. *J Biochem.* 2015; 158: 197-204. 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvv034
- ⑦ Kurita S, Takeuchi K, Hayashi Y, Ueyama H, Zankov DP, Pang X, Otsuka T, Ohkubo I, Ogikubo O, Ogita H. Significance of serum Zn- α 2-glycoprotein for the regulation of blood pressure. *Hypertens Res.* 2015; 38: 244-251. 査読有
DOI: 10.1038/hr.2014.165
- ⑧ Zankov DP, Ogita H. Actin-tethered junctional complexes in angiogenesis and lymphangiogenesis in association with vascular endothelial growth factor. *Biomed Res Int.* 2015; Article ID 314178. 査読有
DOI: 10.1155/2015/314178
- ⑨ Maeda T, Takeuchi K, Pang X, Zankov DP, Takashima N, Fujiyoshi A, Kadowaki T, Miura K, Ueshima H, Ogita H. Lipoprotein-associated phospholipase A2 regulates macrophage apoptosis via the Akt and caspase-7 pathways. *J Atheroscler Thromb.* 2014; 21: 839-853. 査読有
DOI: 10.5551/jat.21386
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Hisakazu Ogita. Significance of dipeptidyl peptidase III as a novel anti-hypertensive therapeutics. 日本循環器学会 2017年3月18日・ホテル日航金沢 (石川県・金沢市)
- ② Hisakazu Ogita, Dimitar P. Zankov. Myocardial afadin attenuates chronic pressure overload-induced cardiac damage via transforming growth factor β receptor-mediated signaling. **American Heart Association** 2016年11月14日・New Orleans (USA)
- ③ Dimitar P. Zankov, Akio Shimizu, Hisakazu Ogita. Myocardial afadin critically oppose myocardial injury during chronic pressure overload in mice. 日本生化学会大会 2016年9月27日・仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ④ 清水昭男、Xiaoling Pang、栗田宗一、竹内圭介、石田哲生、扇田久和 Dipeptidyl peptidase III によるアンジオテンシン II 分解の生化学的解析と高血圧マウスモデルにおける降圧作用の検討 日本生化学会近畿支部例会 2016年5月21日・神戸薬科大学 (兵庫県・神戸市)
- ⑤ Xiaoling Pang, Akio Shimizu, Souichi Kurita, Keisuke Takeuchi, Tetsuo Ishida, Hisakazu Ogita. A novel therapeutic role of dipeptidyl peptidase III in the treatment of hypertension. 日本循環器学会 2016年3月18日・仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ⑥ Xiaoling Pang, Hisakazu Ogita. Significance of serum Zn- α 2-glycoprotein for the regulation of blood pressure. **BIT's 7th Annual International Congress of Cardiology** 2015年12月4日・Shanghai (China)
- ⑦ 清水昭男、Xiaoling Pang、栗田宗一、竹内圭介、石田哲夫、扇田久和 Dipeptidyl peptidase III のアンジオテンシン II 分解における生化学的特性の解明と新しい高血圧治療薬としての可能性 日本生化学会・分子生物学会合同大会 2015年12月1日・神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑧ 上山久雄、村木早苗、田邊詔子、山出新一、扇田久和 スプライシングでのエキソンスキッピングによる先天性覚異常 日本生化学会・分子生物学会合同大会 2015年12月1日・神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑨ 栗田宗一、竹内圭介、上山久雄、扇田久和 Zn- α 2-glycoprotein の血清中濃度と血圧の相関およびその分子機構 日本生化学会近畿支部例会 2015年5月16日・立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県・草津市)
- ⑩ Dimitar P. Zankov, Hisakazu Ogita. Myocardial afadin is a critical regulator for cardiac function in response to chronic pressure overload. 日本循環器学会 2015年4月24日・大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ⑪ Hisakazu Ogita, Dimitar P. Zankov.

Myocardial afadin prevents cardiac dysfunction in chronic pressure-overloaded mice. **Experimental Biology** 2015年3月30日・Boston (USA)

- ⑫ Hisakazu Ogita, Xiaoling Pang, Dimitar P. Zankov. Significance of Lipoprotein-associated Phospholipase A2-mediated Regulation of Akt and Caspase-7 Activity in Macrophage Apoptosis. **American Heart Association** 2014年11月17日・Chicago (USA)
- ⑬ Souichi Kurita, Keisuke Takeuchi, Hisao Ueyama, Iwao Ohkubo, Osamu Ogikubo, Hisakazu Ogita. Correlation of serum Zn- α 2-glycoprotein concentration with blood pressure and biochemical analysis on the correlation. **日本生化学会大会** 2014年10月18日・国立京都国際会館(京都府・京都市)
- ⑭ 上山久雄、村木早苗、田邊詔子、山出新一、扇田久和 Not a few Japanese men with congenital color vision defects have a normal genotype (gene orders are L-M as in color-normals). **日本生化学会大会** 2014年10月18日・国立京都国際会館(京都府・京都市)
- ⑮ Dimitar P. Zankov, Hisakazu Ogita. Myocardial afadin contributes to cardiac remodeling during chronic pressure overload. **日本心不全学会** 2014年10月10日・大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
- ⑯ 上山久雄、村木早苗、田邊詔子、山出新一、扇田久和 M 視物質遺伝子の L 型エキソン 2 は M 視物質の発現量を減少させる **日本生化学会近畿支部例会** 2014年5月17日・京都大学宇治キャンパス(京都府・京都市)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：高血圧症の予防又は治療用医薬
発明者：扇田久和、栗田宗一、逢暁玲
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-121371 号
出願年月日：2015年6月16日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇田 久和 (OGITA, Hisakazu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50379236