

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34535
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460690
研究課題名(和文) Cablesが誘導する新たなアポトーシス機構

研究課題名(英文) Novel apoptotic mechanism induced by Cables

研究代表者

坂本 秀生 (Sakamoto, Hideo)

神戸常盤大学・保健科学部・教授

研究者番号：30225817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究者がヒトでの完全長クローニングに成功した「Cables」は、過剰発現すると細胞のアポトーシスを引き起こすこと、がん部位にCablesが無いことを報告してきた。このことから、Cablesは細胞が悪性化すると過剰発現し、悪性化細胞のアポトーシスを引き起こし、細胞のがん化を抑制すると推定し、Cablesには「がん抑制化機能がある」と仮説を立てた。

またCablesタンパク発現のスイッチである「プロモーター」ががん細胞でメチル化していたことより、プロモーター活性にも注目した。その結果プロテインキナーゼC経路がCablesプロモーター能力を遺伝子レベルで高めることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Previously, I reported that loss of Cables expression is observed in several tumors and high expression of Cables induced apoptosis. From these findings, I hypothesized that Cables is getting increased in early stage of tumor and cause cell death to prevent tumor. Evidence of hyper methylation of the Cables promoter was also observed in several tumors.

These findings suggested that Cables expression in tumor may be regulated the promoter activity. To evaluate the Cables promoter regulation, I evaluated Cables promoter activity in endometrial tumor derived culture cell lines. Cells were stimulated by Progesterone, Phorbol12-Myristate13-acetate (PMA) or Forskolin. As result, Cables promoter activity has increased in one of cell lines by PMA which is an activator of protein kinase C (PKC). This result suggest that Cables promoter regulation is depends on the cell type. The PKC regulation to Cables promoter is not clear, however it is one of strong regulator of Cables promoter activity.

研究分野：病態検査

キーワード：Cables アポトーシス プロテインキナーゼC

1. 研究開始当初の背景

研究者はこれまでに卵巣がんや大腸がんにおいて Cables 発現が減少していることを確認した。Cables 抑制の原因として、がん部位組織では 18 番染色体上で Cables が位置する付近での対立遺伝子の不安定が約 3 割の患者であったこと。また、ヒト Cables クローニングと同時に転写開始点とプロモーター領域の同定も行い、プロモーター領域には CpG アイランドが多数あり、Cables の発現が抑えられたがん組織においてプロモーター領域の CpG メチル化が高頻度に起こっている事実を報告した^{1,2}。

また、Cables は細胞周期に関わり、ヒト Cables 発現プラスミドを導入した卵巣がん由来培養細胞では、対照を導入した細胞より優位に増殖抑制される事も示してきた。興味深いことに Cables を過剰発現させるとアポトーシス特有の細胞死を示し、ヒト Cables 特異的 siRNA の導入でその細胞死が解除され、対照ベクターを同程度導入しても細胞死が起きなかったことより、ヒト Cables にはアポトーシス誘因作用があると報告した¹。

2. 研究の目的

研究の背景で述べた、これかでの成果よりヒト Cables には「がん抑制化機能」があり、そのメカニズムの一つとして、細胞が悪性化した際に Cables の過剰発現でアポトーシスを誘導し悪性化細胞を死滅化させると仮説をたて、実際に細胞内 Cables の過剰発現でアポトーシスを誘導することを培養細胞で証明してきた。

Cables が単独でアポトーシスを誘導するとは考えにくい。本研究では Cables によるアポトーシス誘導の機序について、他因子との関係も視野に入れながら、Cables が関与するアポトーシスメカニズムを明確にし、腫瘍検査学研究に役立てようとの着想に至った。

研究開始当初の背景で述べたように、がん組織で高頻度に Cables プロモーターがメチル化していた。この事実から Cables プロモーター調節機能の重要性が予測され、細胞内刺激でのプロモーター調整での Cables 発現調節を中心に研究を遂行し、生体内における Cables タンパク量の調整機構に関して基本的機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

細胞内での Cables 発現システムの構築

細胞内で Cables 遺伝子の発現調整を人工的に調整できるシステムの完成を目指し、テトラサイクリンによる目的遺伝子のタンパク質発現誘導システムを利用した。

培養細胞として細胞バンクより、株化された卵巣がん由来の JHOS-2 細胞および OVK18 細胞、転移性卵巣腺がんである Krukenberg 腫瘍細胞由来の HSKTC 細胞を入手し、テトラサイクリン濃度依存的に活性が増減する制御性活性化因子(Tet-on)を安

定的に発現する細胞を作成した。

Tet-on 恒常発現細胞株を作製する間、Tet-on 量によって目的遺伝子発現を調節可能なテトラサイクリン応答エレメント(TRE)と目的遺伝子を同時に発現するプラスミドに、目的遺伝子として Cables 遺伝子を導入し TRE- Cables プラスミドを作製した。

TRE- Cables プラスミド完成後、Tet-on 恒常発現細胞クローンに TRE- Cables プラスミドをトランスフェクションし、Tet-on と TRE- Cables の二種類種類の遺伝子が恒常発現する多重遺伝子発現細胞を作成した。

他因子との関連

Cables が過剰発現をするとアポトーシスを起こすことを以前の研究で明らかにしているが、Cables 単独で直接アポトーシスを起こすとは考えにくい。そこでアポトーシスでもっとも重要な働きをする p53 に着目し、Cables が直接アポトーシスを起こすのか、それとも p53 を介して Cables がアポトーシスを起こすのか、または Cables と p53 の間にさらに他の物質を通しての可能性を含め、研究を遂行した。

具体的に関与を明らかにしようとした対象はアポトーシス誘導にかかわる修飾として、p53 のリン酸化、Cables と結合が観察された p300/CBP による、p53 のアセチル化である。

Cables と p53 の両方発現している細胞を用いて研究を進めるため、まず Cables と p53 の発現確認を行った。卵巣がん由来の OVK-18、細胞バンクの情報から p53 が発現していると報告されている、副腎髄質由来の GOTO、乳がん由来の MCF-7、腺がん由来の LOVO、副腎髄質由来の NH-12、子宮内膜がん由来の HEC-151、HEC-108、HEC-265 を入手し Cables と p53 の発現スクリーニングを行った。

Cables プロモーター活性の変動

生体内でのタンパク増加には、目的遺伝子の発現調節も重要である。すでに述べたように、がん組織では高頻度に Cables プロモーターがメチル化しており、この結果から Cables プロモーター調節機能の重要性が予測され、プロモーター調整での Cables 発現調節を中心に研究を遂行した。

具体的には Cables と p53 を共に発現する子宮内膜がん由来の HEC-151 と HEC-265 に、Cables プロモーター領域を有すレポーターベクターを導入し、プロモーター活性を確認した。賦活剤として各種遺伝子のプロモーター活性に影響を与えると報告されている、プロテインキナーゼ C(PKC)を特異的に活性化する Phorbol 12- Myristate13-acetate (PMA)、細胞外からプロテインキナーゼ A(PKA)を活性化し、細胞内 cAMP を上昇する Forskolin、性ホルモンのプロゲステロンを用い、Cables プロモーター活性の変化から、発現調節機構の解明を行った。

4. 研究成果

細胞内での Cables 発現システムの構築

Tet-on 恒常発現細胞の作製に時間を要したが、最終的に JHOS-2 細胞クローンから、Tet-on 恒常発現する細胞株として作製できた。具体的には目的遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を有す Tet One-Luc プラスミドをトランスフェクションしてルシフェラーゼを一過性に発現させ、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン (Dox) 1 μg/mL を培養細胞中に添加し 48 時間後に細胞を回収し、ルシフェリンを基質として発光量をルミノメーターで測定した。Dox 非添加細胞を対象とし、対象との発光量を比活性として表示した結果を図 1 に示すが、比活性が極めて高い細胞クローンとして、JHOS2 細胞のクローン 12 を選択した。

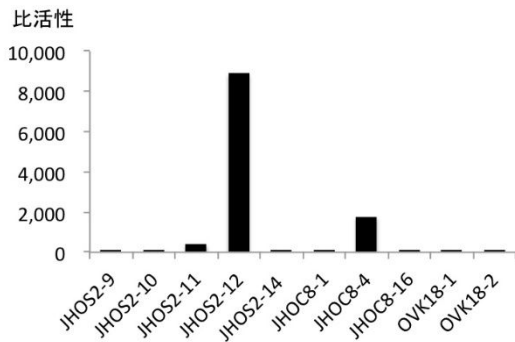


図 1 ドキシサイクリンによる Tet-on 恒常発現細胞確認

続いて Tet-on 恒常発現 JHOS2 を用い、TRE-Cables も恒常的に発現する細胞作成に取り組んだ。まず、TRE-Cables プラスミドの作成を行った。完成した TRE-Cables プラスミドを制限酵素の XbaI で処理した。確認として TRE エンプティプラスミドでは 0.9kbp と 4kbp でバンドが検出され (図 2 レーン 1)、Cables 遺伝子入りプラスミドでは 3kbp と 2kbp でバンドを確認し、プラスミドマップ通りに検出された (図 2 レーン 2)。これを参照に作成したクローンを確認し、レーン 4 と 5 で TRE と Cables をあわせた 6kbp のバンドを確認し TRE-Cables プラスミドとして、Tet-on 恒常発現 JHOS2 へトランスフェクションした。

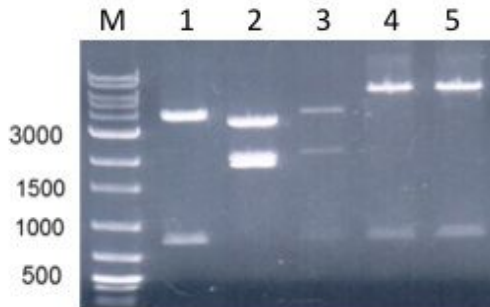


図 2 TRE-Cables プラスミドの作成確認

Tet-on 恒常発現細胞作成ではネオマイシン耐性遺伝子を有す Tet-on プラスミドのトランスフェクション選択にジェネティシンを用いており、この細胞にハイグロマシン耐性遺伝子を有す TRE-Cables プラスミドをトランスフェクションし、ハイグロマシンとネオマイシンの混在下で、Tet-on 及び TRE-Cables 恒常発現 JHOS2 細胞の作成を行い、作成したクローンに対し 1 μg/mL Dox を 4 8 時間投与した。

ウエスタンブロット法にて Cables タンパクを確認したところ、図 3 に示すようにクローン # 1 でのみ Cables の 63kDa 付近にバンドが確認でき、Dox による細胞内 Cables 誘導システムの確立を確認できた。

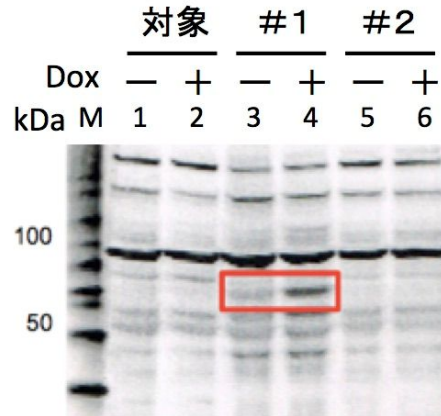


図 3 ドキシサイクリンによる Cables 発現誘導システムの確認

他因子との関連

細胞内で Cables を発現させ、アポトーシス関連物質として、p53 及び p53 がアポトーシスに関与すると報告されている 46 番目のセリン (p53 s46) のリン酸化の有無、Cables と結合が知られる p300/CBP による p53 で 120 番目のリジン (p53 k120) のアセチル化の有無を確認した。予備実験では p53 s46 で明確なリン酸化を確認したが、本実験では条件を変更し繰り返し確認を行ったが、p53 s46 で明確なリン酸化、p53 k120 のアセチル化を確認することができなかった。

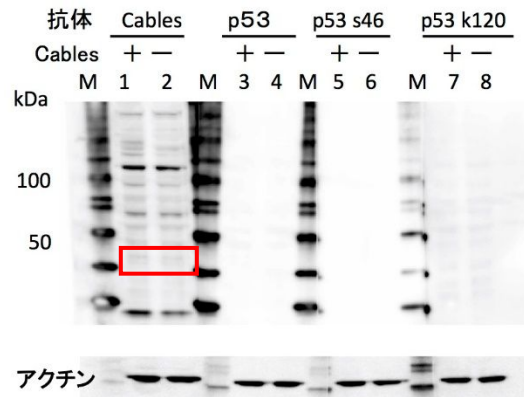


図 4 Cables と p53 及び p53 修飾との確認

Cables と p53 の発現スクリーニング

Cables と p53 の両方を発現している細胞を用い、さらに実験を進めるため、Cables と p53 の発現スクリーニングを続けて行った。卵巣がん由来の OVK-18、細胞バンクの情報から p53 が発現していると報告がある、副腎髄質由来の GOTO、乳がん由来の MCF-7、腺がん由来の LOVO、副腎髄質由来の NH-12、子宮内膜がん由来の HEC-151、HEC-108、HEC-265 を入手し Cables と p53 の発現スクリーニングをウエスタンブロット法にて行った。

その結果、表 1 に示すように子宮内膜がん由来の HEC-151、HEC-108、HEC-265 にて Cables と p53 の両方を発現していることを確認し、以後は Cables が比較的強く発現している、HEC-151 と HEC-265 を用いて研究を進めた。

	Cables	p53
OVK-18	-	-
GOTO	+	-
MCF-7	-	-
LOVO	+	-
NH-12	+	-
HEC-108	+	+
HEC-151	++	+
HEC-265	++	+

表 1 Cables と p53 の発現スクリーニング

Cables プロモーター活性の変動

本研究の以前に子宮内膜がん、子宮がん等の組織で Cables が失活し、高頻度で Cables プロモーターがメチル化していることを確認した。この事実から Cables プロモーター調節機能の重要性が予測される。そこで、Cables と p53 の両方を発現している細胞を用い Cables プロモーター調節について解析を開始した。

子宮内膜がん由来の HEC-151、HEC-265 細胞は表 1 に示すように Cables と p53 を発現するが、その生育状況と外見的な形態が異なる。そこで両細胞の違いから Cables 発現調節に関する情報を得ようと、自身が作成した Cables プロモーター遺伝子を含むレポーターベクターを用い、レポーター遺伝子アッセイを行った。

具体的には Cables プロモーター遺伝子を含むレポーターベクターを導入した培養細胞へ、プロモーター活性に影響を与えると予想される性ホルモンのプロゲステロン(P4)、プロテインキナーゼ C(PKC)を特異的に活性化する Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)、プロテインキナーゼ A を活性化する Forskolin を投与し、レポーター活性の変動を観察した。コントロール (Medium) として薬剤溶解に用いた溶媒を同量添加した。

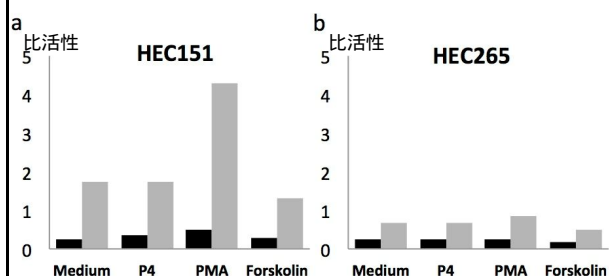


図 5 Cables プロモーターレポーター遺伝

その結果、図 5 に示すように両細胞共にプロテインキナーゼ A を活性化する Forskolin や性ホルモンである P4 では Cables プロモーター活性に影響がなかった。興味深いことに HEC-151 は HEC-265 に比較し、プロモーター活性が高いだけでなく、PKC を特異的に活性化する PMA にてプロモーターレポーター活性の上昇を確認した。

PMA による Cables プロモーター活性は濃度依存的に上昇することも確認した(図 6a)。PMA による Cables プロモーター活性の上昇が PKC 経路の刺激によるものか確認のため、PKC を特異的に阻害する薬剤として GF 109203X (GF) を用い、PMA 経路の阻害化実験を行った。その結果、5 μ g/mL PMA による Cables プロモーター活性の上昇を 10 μ M GF が完全に抑制することを確認した(図 6b)。これらのことより、HEC-151 細胞では PMA が Cables プロモーター活性に関わる事が明らかとなった。

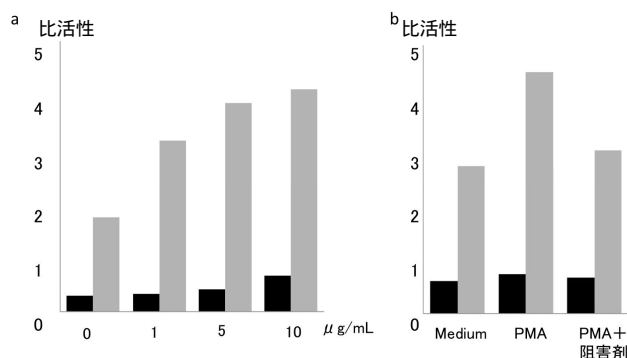


図 6 HEC-151 細胞における、PMA 濃度依存的 Cables プロモーター活性の確認

考察

本研究では、生体内における Cables タンパク量の調整機構に関して基本的機序の解明を目的とし、研究を進めてきた。

その結果、子宮内膜がん由来培養を用いた実験から、同じがんであっても由来培養により Cables プロモーター活性が異なること、一部の細胞では PKC により Cables プロモーターの活性化を行うことを明らかにした。

これらの現象についての詳細はまだ明らかになっておらず、今後はこれらの機序解明を通し、Cables が関わる新たなアポトーシス機構の解明をさらに進めていく。

参考文献

1. Sakamoto H, Friel AM, Wood AW, Guo L, Ilic A, Seiden MV, Chung DC, Lynch MP, Serikawa T, Munro E, Oliva E, Orsulic S, Kirley SD, Foster R, Zukerberg LR, Rueda BR. Mechanisms of Cables 1 gene inactivation in human ovarian cancer development. *Cancer Biol Ther.* 2007 Nov 15;7(2) 180 - 188.
2. Park DY, Sakamoto H, Kirley SD, Ogino S, Kawasaki T, Kwon E, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Chung DC, Rueda BR, Zukerberg LR. The cables gene on chromosome 18q is silenced by promoter hypermethylation and allelic loss in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 2007, 171(5):1509-19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. 災害医療と臨床検査 被災地への臨床検査の物資および人的支援. 坂本秀生, 谷直. *臨床病理* 65(3) 291-297. 2017
2. POCT を在宅医療の現場で利用する際の課題. 坂本秀生. *臨床検査*. 61(3) 272-277. 2017
3. 臨床検査技師の国際化へよせる思い. 坂本秀生. *臨床検査学教育*. 9(1). 13-20. 2017
4. 地域医療, 災害医療で活躍する臨床検査. 坂本秀生. *臨床検査*. 60(1). 22-28. 2016
5. 今知りたい臨床検査技師の国際資格制度. 松尾英将, 坂本秀生. *Medical Technology* 43(4). 407-415. 2015
6. POCT のクオリティマネジメント. 坂本秀生. *臨床病理*. 63(2). 238-241. 2015
7. 組織として POCT を運用する目的. 坂本秀生. *医療と検査機器・試薬*, 37(3), 307-310. 2014

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Prospect of the Mobile Health Check Car with POCT devices. Sakamoto H, Sawamura T 他 15 名. 14th Asian and Pacific Federation of Clinical Biochemistry Congress. Taipei. Nov. 26 - 29, 2016
2. POCT だからこそ出来ること. 坂本秀生. 第 64 回日本職業・災害医学会学術大会. 2016 年 10 月 23 日 仙台
3. POCT の現状と望まれること. 坂本秀生. 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会. 2016 年 9 月 7 日 千葉
4. POCT is strong devices at the disaster relief activity. Experience from the laboratory medicine support after the

Great East Japan Earthquake. Sakamoto H. IFCC POCT International Symposium. Cancun, Mexico. Nov. 16 - 17, 2015.

5. Current Japanese Biomedical Laboratory Scientist Student Education. Symposium. Sakamoto H. KAMT Asia International. Goyang, South Korea. May 29, 2015.
6. 臨床検査技師制度の海外事情と技師のグローバル化. 坂本秀生. 第 64 回日本医学検査学会. 2015 年 5 月 16 日 福岡
7. Introduce the Mobile Health Check Car using POCT devices in Japan. Sakamoto H and Hata K. 他 14 名. AACC CPOCT 25th International Symposium. San Diego, CA. USA. Sep. 18-20, 2014.
8. Mobile Health Check system: The preventive medicine model, using Point-of-Care Testing in Japan. 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Sakamoto H and Hata K. 他 12 名. Istanbul, Turkey, Jun. 22-27, 2014.
9. POCT の活用法. 坂本秀生. 第 50 回日本赤十字社臨床検査技師業務研修会. 2014 年 6 月 15 日 東京
10. 大規模災害時における臨床検査の必要性. 坂本秀生. 日本臨床検査薬卸連合会年次総会. 2014 年 6 月 12 日 東京
11. POC 検査運用の実際と将来展望. 坂本秀生. 日本化学会 R&D 懇話会. 2014 年 2 月 7 日 東京

〔図書〕(計 3 件)

1. 在宅医療チームのための臨床検査. 小谷和彦, 宮島喜文(編)分担執筆 坂本秀生 在宅医療における臨床検査(特に POCT)の実態 35-46. じほう. 2016
2. Global Point of Care: Strategies for Disasters, Emergencies, and Public Health Resilience. Gerald J. Kost, (Ed) Sakamoto H AACC Press 445-451, 2015. 分担執筆
3. POCT が変える医療と臨床検査. 谷直人(編)分担執筆 坂本秀生 (総ページ数 137)在宅医療の検査 101-106, POCT の海外動向 117-128. じほう. 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 秀生 (SAKAMOTO, Hideo)
神戸常盤大学・保健科学部・教授
研究者番号: 30225817