

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670677

研究課題名(和文)肉腫や癌浸潤の細胞運動におけるContact Inhibition喪失の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for loss of contact inhibition in the cell motility of sarcoma and cancer invasion

研究代表者

高橋 克仁(Takahashi, Katsuhito)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：40211338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト乳癌では50症例中30%にCnn2発現を認め、triple negativeやhigh grade症例に多く発現していた。線維形成性小円形細胞腫瘍と悪性中皮腫組織ではすべての症例でCnn2は高い発現を示した。1D motility assay chipと位相差顕微鏡タイムラプスを用いて、マウス血管平滑筋とヒト明細胞肉腫細胞で、1D-Collision Assayを評価する実験系を確立した。マウスCnn2遺伝子のプロモーター解析から転写開始点の上流でCArG Boxを含む188bpがCnn2の発現に必須であり、この領域を含む転写開始点の上流239bpがマウスとヒトで最もよく保存されていた。

研究成果の概要(英文)：Cnn2 expression was examined in human breast cancer tissue microarrays and surgically resected tissues from human desmoplastic small round cell tumors (DSRCT) and malignant mesothelioma. Cnn2 was expressed in 30% of the 50 tissues samples of breast cancer, predominantly in the triple negative and high grade tumors. It was also highly expressed in all DSRCT and malignant mesothelioma tissues examined. 1D-Collision Assay system was established in mouse vascular smooth muscle and human clear cell sarcoma cells using the 1D motility assay chips and microscopic time lapse analyses. A 188bp-region containing CArG box upstream from transcription start site in the mouse Cnn2 gene was identified as an essential promoter region for Cnn2 expression. The 239bp-region upstream from the transcription start site containing the above 188bp-region was most highly conserved in the human Cnn2 gene.

研究分野：腫瘍医学

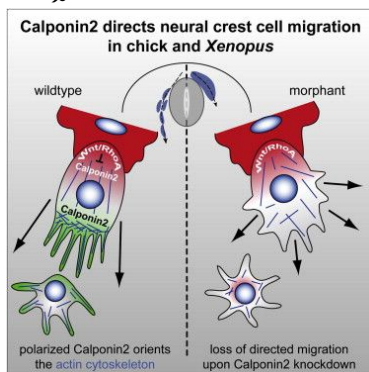
キーワード：カルボニン 上皮間葉系転換

1. 研究開始当初の背景

がんには上皮から生じる「癌」と筋肉や骨、臓器の間質などを構成する可動性の間葉系細胞から生じる「肉腫」がある。一方、癌は上皮の形態から肉腫に似た間葉系細胞の形態に変化する上皮間葉系転換(EMT)がおこると運動性が高まり、浸潤転移能を獲得するとともに「肉腫」のように治療に抵抗性となる。癌の「肉腫化」ともいえるこの分子メカニズムには未だ不明な点が多く、その解明は肉腫の病態を理解する上でも重要である。研究代表者らはアクチン細胞骨格に結合し平滑筋の収縮や細胞運動を調節し肉腫にも多く発現するカルポニン(Cnn)を発見し命名した。最近、発生過程の神経堤細胞の EMT において Cnn が細胞の極性形成と細胞運動の Contact Inhibition(接触阻止)に必須の役割をもつことが明らかにされた。

Cnn は、Cnn1,2,3 の 3 つの異なる遺伝子でコードされるアイソフォームからなる。Cnn1 は平滑筋に特異的で、Cnn2 と Cnn3 は肉腫を含む間葉系細胞に発現している (Takahashi et al. J. Biol. Chem. 1991, 1995, J. Physiol. 1994, 2000, 2006, Cancer Res 2001a, 2001b, Cancer Sci.2007)。

2013 年 3 月ドイツの Blum らは Wnt シグナルで起こる神経堤細胞の EMT に伴って Cnn2 が発現誘導され、それに続く平面細胞極性(Planar Cell Polarity)の獲得と偽足形成、遊走、細胞運動の接触阻止現象が Cnn2 を欠失させることにより消失することを明らかにし、これまで全く予想されていなかった Cnn の役割を明らかにした (Ulmer B. et al. Calponin 2 acts as an effector of noncanonical Wnt-mediated cell polarization during neural crest cell migration. Cell (Reports)3, 615-621, 2013)。



神経堤細胞

の EMT におけるカルポニン 2 (Cnn2) の役割

一方、前立腺癌で米国の Heemers らはアンドロゲンによって転写因子である SRF に依存して発現誘導され、悪性化に関与する 158 個の遺伝子を同定した。これは前立腺癌細胞においてアンドロゲン誘導全遺伝子の 6% に相当する。158 個の遺伝子の中に Cnn2 遺伝子が含まれていた。SRF はア

クチンなど肉腫タンパクの発現に必須の転写因子であるが、最近前立腺癌、胃癌、乳癌、食道癌において EMT に伴って発現し腫瘍の間葉系細胞への転換とそれに伴う悪性化、浸潤、転移能の獲得に関与することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は肉腫の細胞運動や癌の EMT における接触阻止現象の喪失における Cnn の役割を検証することであり、Cnn の発現レベルや機能領域の解明は、肉腫や癌の浸潤や転移に対する新たな治療標的の同定につながる意義がある。

肉腫や癌細胞の接触阻止現象の喪失の分子メカニズムを解明することは、浸潤や転移、EMT に対する治療薬開発のための新しい分子標的を提供するものである。また、癌細胞における「肉腫遺伝子」Cnn の発現は、正常な上皮組織にはないため、早期診断や予後診断に利用できる可能性がある。がん細胞の細胞運動の接触阻止現象の喪失や EMT は、悪性化と予後不良に関わる指標であり、現在最も重要で困難な治療標的と考えられているため、早期診断法や新治療法開発につながる本研究の意義は大変大きい。EMT の治療対象は肉腫によく似た間葉系細胞の形態をとる腫瘍細胞である。本研究は十分な肉腫研究の実績をもつ研究グループが、これまでに試みられたことのない独創的な方法で、謂わば「癌を肉腫研究から攻める」ものである。

3. 研究の方法

1) 肉腫、前立腺癌、乳癌、について各種組織マイクロアレー (BIOMAX.US 社) と臨床検体を用いて免疫組織化学により Cnn2 の発現解析を行う。Cnn2 抗体は Cnn2 に特異的な抗原ペプチドに対してウサギで作成したポリクローナル抗体であり、Cnn1 と Cnn3 に交差しない。

2) 培養肉腫細胞および癌細胞の EMT に伴う Cnn2 の発現を、DNA microarray、qRT-PCR、Western blot 等を用いて検討する。Cnn 遺伝子の発現レベルの変化が細胞の運動や浸潤能に及ぼす影響を検討する。

細胞運動の接触阻止現象の喪失を定量的に評価する方法は、ロンドン大学の Roberto Mayor らの技術協力を得て、Mayor らが最近発表した Time Lapse Cinematography を用いた 1D-Collision Assay 法を用いて解析する。

3) 肉腫の細胞運動や癌細胞の EMT に伴う Cnn2 の発現誘導に必要な最少プロモーター領域を決定する。

4. 研究成果

1) Cnn2 蛋白の発現

Cnn2 は研究代表者らが 1996 年にヒト心筋組織からはじめて cDNA クローニングし、その構造を決定した (J. Biochem. 120, 415-424, 1996). その塩基配列をもとにヒト Cnn2 特異的な C 末端のペプチド配列に対して作成した Cnn1,3 と交叉しないウサギポリクローナル抗体を用いて、ヒト乳癌組織マイクロアレーおよび中皮に由来する悪性腫瘍である線維形成性小円形細胞腫瘍 (DSRCT) と悪性中皮腫瘍組織の免疫組織化学を検討したところ、乳癌では 50 症例中 30% に Cnn2 の発現を認め、予後の悪い triple negative や high grade の症例に多く発現する傾向が認められた。ヒト前立腺癌組織マイクロアレーでは、骨転移腫瘍で Cnn2 の発現が低下していた。また、ヒト DSRCT と悪性中皮腫瘍組織では調べたすべての症例で Cnn2 は極めて高い発現を示した。

2) Cytoo 社製の 1D motility assay chip と位相差顕微鏡タイムラプスビデオ撮影の技術を用いて、マウス Cnn1 欠失血管平滑筋細胞とヒト明細胞肉腫細胞の系で、1D-Collision Assay を評価する実験系を確立した。

3) マウスおよびヒト Cnn2 遺伝子の発現解析

129SV マウスゲノムライブラリーよりマウス Cnn2 遺伝子をクローニングしそのプロモーター領域の解析から、Cnn2 プロモーターは転写開始点の上流 68bp の位置に種を超えて保存された SRF の結合配列である CArG Box (CCTTATAAGG) をもつことがわかった。さらにマウス Cnn2 遺伝子のプロモーター解析から転写開始点の上流で CArG Box を含む 188bp が Cnn2 の発現に必須であることもわかった。また、この領域を含む転写開始点の上流 239bp がマウスとヒトで最もよく保存されていた。EMT に伴う発現誘導に必要な最少のプロモーター領域を決定するため、ヒト Cnn2 プロモーターを人工合成し、Luciferase または EGFP 標識遺伝子の upstream に連結した発現ベクターを構築した。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

(1) K. Takahashi, H. Yamamura, Y. Koike, H. Narahara, Y. Ooyama, S. Toyooka, R. Hatae, Y. Ono, J. Yashima, S. Teraoka. Clinical evaluation and treatment of leiomyosarcoma. The Japan-United States International Workshop for Sarcoma Research and Therapy (Honolulu), December 4-5th, 2014

(2) H. Narahara, K. Yasuda, K. Morita, N. Dan, R. Takeda, Y. Takeda, K. Yanagawa, J. Fukushima, H. Matsumoto, K. Matsunaga, S. Ueda, Y. Yasunaga, Y. Inui, S. Kawata, H. Yamamura, K. Takahashi. Pazopanib for metastatic soft tissue sarcoma (STS) with or without denosumab. The 39th Annual Meeting of The European Society of Medical Oncology (ESMO)(Madrid, Spain), September 26-30, 2014

(3) H. Yamamura, J. Yashima, S. Teraoka, Y. Ono, K. Kodama, Y. Tomita and K. Takahashi. Efficient Formation and Characterization of 3D-Multicellular Tumor Spheroids of Soft Tissue Sarcomas. 73rd Annual Meeting of The Japanese Cancer Association (Yokohama), September 25-27th, 2014

(4) 高橋克仁、稀少がん肉腫の新治療戦略; 水平分業型治療連携とパゾパニブ血管新生阻害剤による分子標的治療、臓器別シンポジウム、AYA 世代のがんをどう治療するか 第 52 回日本癌治療学会学術集会(横浜)平成 26 年 8 月 29 日(招待講演)

(5) H. Yamamura, Y. Ono, J. Yashima, S. Teraoka and K. Takahashi. High Throughput and Efficient Formation of 3D-Multicellular Tumor Spheroids of Soft Tissue Sarcomas; Implications for Silencing Mechanisms of

Pathogenic Fusion Gene Expression. 52nd Annual Meeting of The Japan Society of Clinical Oncology (Yokohama), August 28th, 2014

(6) H. Narahatra, K. Yasuda, K. Morita, N. Dan, R. Takeda, Y. Takeda, K. Yanagawa, J. Fukushima, H. Matsumoto, K. Matsunaga, S. Ueda, Y. Yasunaga, Y. Inui, S. Kawata, H. Yamamura, K. Takahashi. Systemic chemotherapy of pazopanib for advanced soft tissue sarcoma (STS) with or without denosumab. The 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology (Fukuoka), July 17, 2014

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 克仁(Takahashi Katsuhito)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立成人病センター(研究所)・その他部
局等・研究員
研究者番号：40211338

(2)研究分担者

山村 倫子(Yamamura Hisako)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立成人病センター(研究所)・その他部
局等・研究員
研究者番号：50342994

(3)連携研究者

戸口田 淳也(Toguchida Jyunya)
京都大学・生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502