

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

癌細胞は足場非依存性という正常細胞には無い特性を持っている。この特性を標的とすれば副作用の少ない新規癌治療法の開発が期待できる。申請者は足場非依存性に重要な役割をする新規シグナル(Src-CDCP1-PKCδ)を発見している。今研究では、平成 23 年度に、抗体による CDCP1 機能の阻害と CDCP1-PKCδシグナルの遮断による足場非依存性の抑制の検証を、平成 24 年以降は、その機能阻害とシグナル遮断が生体内で癌の浸潤・転移の抑制に効果がある事を、実験動物倫理委員会の規定を遵守した動物実験で明らかにし、新規分子標的治療薬開発に向けて CDCP1-PKCδシグナルを遮断する低分子化合物のスクリーニングへと橋渡しすることを目的としている。現在の癌分子標的治療薬のほとんどが、キナーゼ活性を標的とした低分子薬剤であるが、阻害の特異性の低さから、副作用や薬効の不充分さに問題がある。足場非依存性特異的にリン酸化された基質分子(CDCP1)とその結合因子(PKCδ)のシグナル遮断を標的とした分子標的薬剤の開発は新規性があり、実用化されれば血行性転移の抑制及び、術後の QOL の向上等に貢献が期待できる。

研究経費

5,000 千円

研究班の組織

上北尚正

主任研究員

研究すべての推進と統括 (ペプチドの設計、CDCP1の機能領域の同定、抗体作成、細胞培養実験、動物実験等)

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

癌細胞は正常細胞とは異なり、足場の無い浮遊状態でも生存できる癌の浸潤・転移に必須な能力である足場非依存性という特性を持っている。この特性の抑制を治療標的とすれば、正常細胞には影響を及ぼさず、副作用の少ない新規の癌治療法の開発が期待できる。申請者は、足場非依存性において、Src型キナーゼによるCDCP1 (CUB domain-containing protein 1) のリン酸化さらに、下流因子のPKCδへのシグナル伝達が重要である事を突き止め、既存の生存及び、増殖シグナルとは別の新規シグナルである事を発見した(参考文献: 1)。また、CDCP1発現の抑制は、実験動物モデル系の肺転移や腹膜播種を抑制した事から、生体内での転移・浸潤能におけるCDCP1の重要性も明らかとなり、臨床的にも独立した予後因子として重要な分子である事を報告している。(参考文献: 2, 3, 4参照)

これら基礎研究の知見をもとに、CDCP1-PKCδシグナルの遮断による足場非依存性の抑制が、生体内での癌の浸潤・転移能の抑制に効果がある事を動物実験で明らかにし、癌治療薬の開発に向けたCDCP1-PKCδシグナルを遮断する低分子化合物のスクリーニングへと橋渡しすることを目的とした基盤研究を進める。CDCP1のリン酸化による足場非依存性を抑制する方法として、CDCP1-PKCδの結合を抑制するペプチドの合成及び、CDCP1の機能を阻害する抗体の作製をし、癌細胞株における足場非依存性への効果をsoft agar assay, cell death assay等で検討し、その後、マウスを用いた尾静脈注射による肺転移及び、腹膜播種等の動物モデル系により生体における癌の浸潤・転移能の抑制効果を検討する。

現在の癌分子標的治療薬のほとんどが、キナーゼ活性に関わる ATP 結合ポケットを標的とした低分子薬剤である。現時点では、キナーゼ阻害の特異性の低さにより、副作用による QOL の低下や低用量使用による薬効の不十分さなどの問題がある。しかし、癌によって活性が上昇しているチロシンキナーゼにより特異的にリン酸化された基質分子(CDCP1)とその結合因子(PKCδ)を標的としたシグナル遮断薬開発は新規性があり、癌患者の血行性転移の抑制及び、術後の QOL の向上等に貢献するものと期待している。

(参考文献)

1. Uekita T et al., Mol. Cell. Biol. (2007) 27: 7649-7660
1. Miyazawa Y, Uekita T et al., Cancer Res. (2010) 70: 5136-5146
2. Ikeda J, Uekita T et al., Cancer Sci. (2009) 100: 429-433
3. Uekita T et al., Am. J. Pathol. (2008) 172: 1729-1739

第1年次

(到達目標)

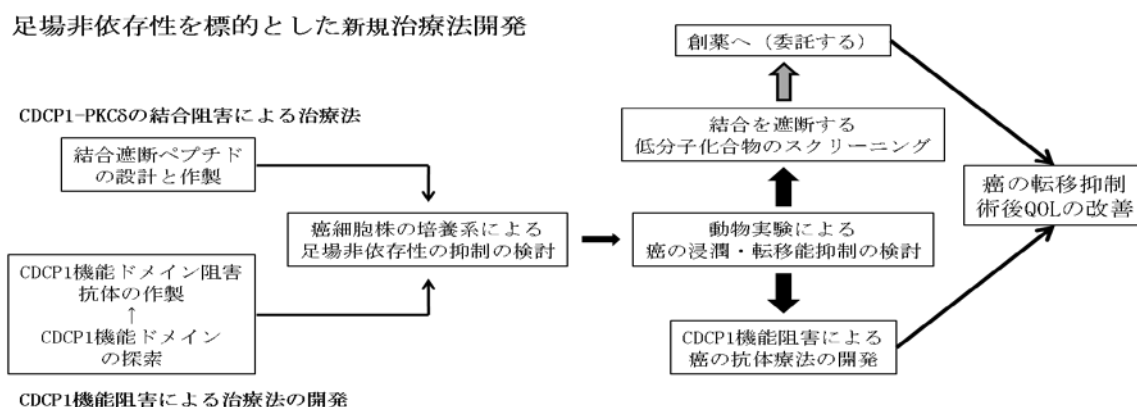
- 1 CDCP1-PKCδの結合阻害ペプチドの作製と癌細胞株による足場非依存性の抑制の検討
- 2 CDCP1 機能ドメインの探索と CDCP1 抗体の作製
- 3 CDCP1-PKCδの結合を遮断する低分子化合物スクリーニング法を確立するための予備実験

(年次評価時点の実績要点)

- 1 CDCP1-PKCδの結合阻害ペプチドを作成し、癌細胞株の実験において CDCP1-PKCδのシグナル遮断に成功した。そのシグナル遮断ペプチドは、癌細胞株の浮遊培養において効果的に足場非依存性を抑制した。
- 2 CDCP1 の細胞外領域が CDCP1 の 2 量体形成とリン酸化に関与することを突き止め、さらに CUB ドメイン変異体の解析から細胞外に 3 つある CUB ドメインのうち、切断を受けない 2 番目と 3 番目の CUB ドメインを含む領域が 2 量体形成に必要であることを明らかにした。現在、切断される CUB ドメインの 1 番目を含む領域及び、CUB ドメインの 2, 3 番目を含む領域の抗体を作製中である。
- 3 癌細胞株における到達目標 1 の達成を受け、低分子化合物スクリーニング法として、蛍光蛋白質をレポーターとする蛋白質断片コンプリメンテーション法を用い、CDCP1 とリン酸化部位結合領域である PKCδの C2 ドメインの蛍光融合蛋白質発現系を作製し、細胞内蛋白質相互作用を蛍光シグナルで検出する系を立ち上げている。

研究成果と考察

第1年次評価時点



今研究は、癌の特性である足場非依存性をターゲットとした新規癌治療法開発に向け、CDCP1-PKCδシグナル遮断ペプチド及び、CDCP1 機能阻害抗体による癌の転移・浸潤の抑制と CDCP1-PKCδの結合を阻害する低分子化合物のスクリーニング法の開発による創薬への橋渡しを目的としている。

(CDCP1-PKCδの結合阻害ペプチドの作製と癌細胞株による足場非依存性の抑制の検討)

CDCP1-PKCδの結合阻害ペプチドとして、CDCP1 の 734 番目のリン酸化チロシン、762 番目のリン酸化チロシンを含むペプチド、ペプチドスクリーニングによる PKCδの C2 ドメインに結合するリン酸化チロシンを含むペプチド及び、コントロールのランダムペプチドを作製した。そのペプチドを胃癌細胞株、肺癌細胞株、膵癌細胞株に添加処理したところ、3 種類のペプチドとも CDCP1-PKCδの結合を阻害することが免疫沈降と PKCδの Tyr311 のリン酸化の検出で明らかになった。さらに、足場非依存性への影響を胃癌及び、肺癌細胞株の浮遊培養を用いた Trypan blue assay で検証し、各ペプチドが足場非依存性を抑制することを明らかにした。よってペプチドによる CDCP1-PKCδの結合阻害が足場非依存性の抑制に関与することが細胞レベルにおいて示すことが出来た。現在 Soft agar assay 等、他の足場非依存性の検出方法でも解析しており、それらでの抑制効果の確認を取りつつ、マウス腹膜播種モデル、尾注による肺転移モデル等を用いた生体内におけるペプチドの癌の浸潤・転移の抑制効果の検証へと進める計画である。

(CDCP1 機能ドメインの探索と CDCP1 抗体の作製)

まず、市販されている CDCP1 抗体による機能制御を癌細胞株の浮遊培養による Trypan blue assay で確認したが、抑制効果を得ることはできなかった。そこで、CDCP1 変異体 (細胞外領域欠失、CUB ドメイン欠失) を作製した。次に細胞に CDCP1 siRNA 処理して内在性の CDCP1 を抑制し、そこに変異体を発現させる系を用いた免疫沈降と CDCP1 リン酸化抗体による検証により、細胞外領域がない CDCP1 は 2 量体形成及び、リン酸化が起こらないことを見出した。さらに、2 量体形成には CUB ドメインの 2,3 を含む領域が関与することを明らかにした。CDCP1 は CUB ドメインの 1 を含む領域の直下で切断されることが示されている。そこで CDCP1 の機能阻害抗体を作製するにあたり、抗体により CUB ドメイン 1 で切断を受けさせず、2 量体形成とリン酸化を阻害する可能性と、CUB ドメイン 2,3 を含む領域をブロックし、2 量体形成とリン酸化を阻害する可能性を想定した。現在、2 つの領域を抗原とした抗体作製をおこなっている。

(CDCP1-PKCδの結合を遮断する低分子化合物スクリーニング法を確立するための予備実験)

癌細胞株におけるペプチドによる足場非依存性の抑制の結果を受け、低分子化合物スクリーニング法として、蛍光蛋白質をレポーターとする蛋白質断片コンプリメンテーション法を用いたスクリーニング法の検討を始めた。CDCP1 とリン酸化部位結合領域である PKCδの C2 ドメインの各々を蛍光蛋白質と融合して発現させる系を作成している。現在、CDCP1 の C 末部位及び、PKCδの C2 ドメインの N 末及び、C 末部位に蛍光蛋白質を融合させた発現プラスミドの調整を進めており、CDCP1 に関しては作製済みである。今後は、この細胞内蛋白質相互作用を蛍光シグナルで検出する系を用いてペプチド処理によるスクリーニング法の検証を行う予定である。

倫理面への配慮

組換えDNA実験に関しては、当研究施設の遺伝子組換え実験計画書に基づき、遺伝子組換え実験安全委員会の規定を遵守して、拡散防止に努めて研究をする。

動物実験に関しては、当研究施設の実験動物倫理委員会の規定を遵守して、実験動物に苦痛を与える事のない様に管理使用する。

ヒト ES 細胞は使用しない。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

1. T. Uekita and R. Sakai. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci*; Vol.102: 1943-1948 (2011) Review (査読有)

(学会発表)

1. T. Uekita and R.Sakai. CDCP1 Links Ras and Src Signaling Pathways as a Common Effector for the Promotion of Tumor Metastasis.; The 6th Mechanisms & Models of Cancer; Salk Inst., La Jolla, CA, USA (2011)
2. T. Uekita and R. Sakai. Suppression of autophagy by CDCP1 is essential for anoikis resistance in cancer cells.; 第 70 回日本癌学会学術総会; 名古屋 (2011)