

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591843
研究課題名 (和文) 尿路上皮癌における Periostin による浸潤・転移抑制の分子機構の解明
研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of the suppression of invasion and metastasis by periostin in urothelial carcinoma
研究代表者 金 哲將 (KIM CHUL JANG) 滋賀医科大学・医学部・非常勤講師 研究者番号：10204968

研究成果の概要：

Periostin による膀胱癌細胞の浸潤・転移抑制の分子機構を解明するために、免疫沈降法と質量分析計を用いて、Periostin と結合する蛋白質として MAP キナーゼファミリーに属する TAK1 の活性化因子である TAB1 を同定した。さらに、TAB1 および TAK1 の siRNA ノックダウン実験などにより、Periostin による膀胱癌細胞の浸潤能の抑制には TAB1/TAK1 シグナル経路が重要な働きをしていることを明らかにした

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000円	600,000円	2,600,000円
2008年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌・periostin・浸潤・転移・癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

研究分担者の井上寛一らが初代培養線維芽細胞における癌遺伝子による癌化抑制に関与する遺伝子を網羅的に検索し、いくつかの新規癌抑制遺伝子を分離した。このなかで、膀胱が排尿圧にさらされる臓器であることより、骨の発生・構造維持に関与しメカニカルストレスに対応する機能を有すると考えられる Periostin に注目し、尿路上皮癌との関連につき研究を開始し以下のことを明らかにしてきた。

(1) 膀胱癌の悪性化に伴い Periostin mRNA の

発現が著しく低下する。

- (2) 癌細胞株に Periostin 遺伝子を導入すると細胞浸潤能・造腫瘍活性に影響することなく浸潤・転移を抑制する。
- (3) Periostin の C 末端領域がこの抑制に重要である。

Periostin が、癌細胞の浸潤・転移抑制に重要な働きをもつことが明らかになってきたが、その分子機構については、Akt との関連など間接的なデータの報告のみで、直接的な解析は施行されていなかった。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究成果をふまえ、Periostin による膀胱癌細胞の浸潤・転移抑制の分子機構を解明することが本研究の目的である。そのためにまず、浸潤・転移抑制活性に重要な Periostin の C 末端領域の alternative splicing と膀胱癌発生との関連を明らかにする。次に転移浸潤抑制に関わる Periostin 蛋白の機能を明らかにするために、プロテオミクスの手法を用い Periostin と直接結合する蛋白質を同定し、その機能と転移浸潤抑制との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)免疫組織学的手法により、正常膀胱および膀胱癌組織での periostin 蛋白の発現を検討する。

(2)RT-PCR 法により Periostin mRNA の wild-type および variant-type の発現を、正常膀胱と膀胱癌組織の間で比較検討し、癌細胞の浸潤・転移能に対する variant Periostin の活性を検討する。

(3)Periostin を発現させた 293T 細胞を用い、免疫沈降法と質量分析計により Periostin と結合する蛋白質として同定した TAB1 について転移・浸潤との関係を解析する。siRNA の手法を用い、TAB1 およびそれに関連する分子をノックダウンすることにより、癌細胞の浸潤・転移抑制に関与する分子機構をより詳細に検討する。

4. 研究成果

(1)免疫組織学的手法により Periostin 蛋白の膀胱組織での局在と発現を検討し、正常膀胱では Periostin 蛋白は上皮直下の間質にベルト状に強発現しており、Periostin の本来の特性より膀胱の尿の充満というメカニカルストレスに対応したものである可能性が考えられた。一方、膀胱癌組織では、ベルト状の発現は消失しており、このことが癌細胞の浸潤・転移の促進に関与している可能性が示唆された。

(2)浸潤・転移抑制活性に重要な Periostin の C 末端領域には、alternative splicing が生じることより、この alternative splicing と膀胱癌発生との関連を検討したところ、正常組織で発現している wild-type Periostin mRNA の発現が癌組織では検出できず、浸潤・転移抑制能が消失した variant type mRNA のみが癌組織では発現していることから、Periostin の alternative splicing が膀胱癌発生に関与している可能性が示唆された。

(3)Periostin を発現させた 293T 細胞を用い、免疫沈降法と質量分析計により Periostin と結合する蛋白質の同定を試み、MAP キナーゼファミリーに属する TAK1 の活性化因子である TAB1 を同定した。さらに、Periostin は

TAK1 と共沈すること、また Periostin 発現によって TAK1 が活性化されることも見出した。さらに、TAB1 を siRNA を用いノックダウンさせると Periostin による TAK1 の活性化が抑制されることもわかった。Periostin の deletion mutants を用いた実験では、TAB1 との結合と TAK1 活性化には、Periostin の C 末端領域が重要な働きをすることも明らかにした。また、293T 細胞と膀胱癌細胞株 T24 細胞において、TAK1 または TAB1 に対する siRNA によるノックダウンによって、Periostin による癌細胞の浸潤抑制活性が阻害されることを明らかにした。これらの実験結果から、Periostin による癌細胞の浸潤抑制の抑制には TAB1/TAK1 シグナル経路が重要な働きをしていると考えられた。

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 16 件)

- ① Kim CJ, Takimoto K, Tomita K, Osafune T, Nishikawa N, Johnin K, Okada Y: Evaluations for hydronephrosis of tubeless cutaneous ureterostomy using MAG3 diuretic renography. Clin Nucl Med, in press. 査読有
- ② Isono T, Kim CJ, Ando Y, Sakurai H, Okada Y, Inoue H: Suppression of cell invasiveness by periostin via TAB1/TAK1. Int J Oncol, in press. 査読有
- ③ Tambe Y, Yamamoto A, Isono T, Chano T, Fukuda M, Inoue H: The Drs tumor suppressor is involved in the maturation process of autophagy induced by low serum. Cancer Lett, in press. 査読有
- ④ Kim CJ, Nishi K, Isono T, Okuyama Y, Tambe Y, Okada Y, Inoue H: Cyclin D1b variant promotes cell invasiveness independent of binding to CDK4 in human bladder cancer cells. Mol Carcinog, in press. 査読有
- ⑤ Kim CJ, Takimoto K, Tomita K, Osafune T: A comparison of management of hemorrhage following transurethral resection of the prostate between routine continuous bladder irrigation and no bladder irrigation with catheter traction: A prospective randomized study. Jpn J Endourol ESWL 22: 88-91, 2009. 査読有
- ⑥ Shimakage M, Kodama K, Kawahara K, Kim CJ, Ikeda K, Yutsudo M, Inoue H: Downregulation of drs tumor suppressor

- gene in highly malignant human pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol Rep* 21: 1367-1372, 2009. 査読有
- ⑦ Nishi K, Inoue H, Schnier JB, Rice RH: Cyclin D1 downregulation is important for permanent cell cycle exit and initiation of differentiation induced by anchorage-deprivation in human keratinocyte. *J Cell Biochem* 106: 63-72, 2009. 査読有
- ⑧ Fukumoto K, Wang B, Hikosaka K, Noritake H, Shibata K, Inoue H, Suzuki A, Inaba K, Sakaguchi T, Suzuki S, Konno H, Miura N: Iive imaging by time-laps microscopy can more clearly evaluate the anti-apoptotic state of primary hepatocytes isolated from the Drs knockout mouse. *Akita J Med* 35: 231-237, 2008. 査読有
- ⑨ Kim CJ, Isono T, Tambe Y, Chano T, Okabe H, Okada Y, Inoue H: Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis. *Int J Oncol* 32: 161-169, 2008. 査読有
- ⑩ Watanabe R, Tambe Y, Inoue H, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi T, Hino O, Okabe H, Chano T: GADD34 inhibits mammalian target of rapamycin signaling survival under bioenergetic stress. *Int J Mol Med* 19: 475-483, 2007. 査読有
- ⑪ Shimakage M, Inoue N, Oshima K, Kawahara K, Yamamoto N, Oka T, Tambe Y, Yasui K, Matsumoto K, Yutsudo M, Inoue H: Down-regulation of drs mRNA is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Oncol* 30: 1343-1348, 2007. 査読有
- ⑫ Minami K, Inoue H, Terashita T, Kawakami T, Watanabe R, Haneda M, Isobe K, Okabe H, Chano T: GADD34 induces p21 expression and cellular senescence. *Oncol Rep* 7: 1481-1485, 2007. 査読有
- ⑬ Minami K, Tambe Y, Watanabe R, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi K, Hino O, Okabe H, Chano T, Inoue H: Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J Virol* 81: 11106-11115, 2007. 査読有
- ⑭ Tambe Y, Yoshioka-Yamashita A, Mukaisho K, Haraguchi S, Chano T, Isono T, Kawai T, Suzuki Y, Kushima R, Tattori T, Goto M, Yamada S, Kiso M, Saga Y, Inoue H: Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-induced gene, drs. *Carcinogenesis* 28: 777-784, 2007. 査読有
- ⑮ Kageyama S, Iwaki H, Inoue H, Isono T, Yuasa T, Nogawa M, Maekawa T, Ueda M, Kajita Y, Ogawa O, Toguchida J, Yoshiki T: A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin Appl* 1: 192-199, 2007. 査読有
- ⑯ Iwaki H, Johnin K, Kageyama S, Kim CJ, Isono T, Yoshiki T: Up-regulation of urinary UP III mRNA levels in vesicoureteral reflux patients: potential application as a screening test for vesicoureteral reflux. *Int J Urol* 14: 918-923, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 旦部幸博, 前田理亜, 山本章嗣, 茶野徳宏, 井上寛一: エネルギー枯渇に対するストレス応答における癌抑制遺伝子 drs の役割. 第 31 回日本分子生物学会. 2008/12/11. (神戸市)
- ② 井上寛一, 西香代子, 奥山雄介, 旦部幸博, 岡田裕作, 磯野高敏, 金 哲將: Splicing variant cyclin D1b による膀胱癌細胞の悪性化促進の解析. 第 31 回日本分子生物学会. 2008/12/10. (神戸市)
- ③ 磯野高敏, 金 哲將, 安藤幸宏, 櫻井宏明, 山本章嗣, 井上寛一: Periostin による癌の浸潤・転移抑制機構の解析. 第 31 回日本分子生物学会. 2008/12/10. (神戸市)
- ④ Isono T, Kim CJ, Sakurai H, Okada Y, Tambe Y, Inoue H: Periostin associates with TAB1 to activates TAK1 and suppresses cell invasiveness. 第 67 回日本癌学会総会. 2008/10/29. (名古屋市)
- ⑤ Kim CJ, Isono T, Tambe Y, Okada Y, Inoue H: Cyclin D1b variant enhances cell invasiveness of human bladder cancer cells. 第 67 回日本癌学会総会. 2008/10/28. (名古屋市)
- ⑥ 金 哲將, 長船 崇, 瀧本啓太, 西川信之, 上仁数義: MAG3 利尿レノグラムによるチューブレス尿管皮膚瘻の評価. 第 96 回日本泌尿器科学会総会. 2008/4/26. (横浜市)
- ⑦ Inoue H, Minami K, Tambe Y, Isono T, Chano T: Stress-inducible GADD34 interacts with TSC1/2 to suppress mTOR signaling pathway. 第 66 回日本癌学会総会. 2007/10/05. (横浜市)
- ⑧ Kim CJ, Isono T, Tambe Y, Okada Y, Inoue H: Analysis of oncogenic activities of

cyclin D1b variant in human bladder cancer cells. 第 66 回日本癌学会総会. 2007/10/05. (横浜市)

- ⑨ Isono T, Kim CJ, Sakurai H, Okada Y, Inoue H: Periostin activates TAK1 and suppresses cell invasiveness. 第 66 回日本癌学会総会. 2007/10/03. (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 哲將 (KIM CHUL JANG)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10204968

(2) 研究分担者

井上 寛一 (INOUE HIROKAZU)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30176440
磯野 高敬 (ISONO TAKAHIRO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20176259

(3) 連携研究者

なし