c-Cb1 の過剰発現による骨肉腫細胞抑制についての検討

鹿児島大学医学部整形外科

上 野 宜 功・横 内 雅 博

大 西 敏 之・安 田 いづみ

二之宮 さやか・小 宮 節 郎

鹿児島大学医学部保健学科

井 尻 幸 成

Effect of Overexpression of c-Cb1 on Osteosarcoma Cell Line, SaOS2

Yoshinori Ueno, Masahiro Yokouchi, Toshiyuki Onishi,

Izumi Yasuda, Sayaka Ninomiya, and Setsuro Komiya

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kagoshima University, Kagoshima, Japan

Kosei Ijiri

Course of Physical Therapy, School of Health Science, Faculty of Medicine,
Kagoshima University, Kagoshima, Japan

The protein product of the *c-Cb1* proto-oncogene is involved in several signaling pathways and exerts a negative regulatory function on receptor and non-receptor tyrosine kinase. We used the overexpression experiment, and demonstrated that the c-Cb1 inhibits phosphorylation of intracellular protein in osteosarcoma cell line, SaOS2. Luciferase reporter assays revealed overexpression of c-Cb1 suppressed PDGF-induced c-Fos promoter activity as well as v-Src-induced STAT3 promoter activity. Thus, our results demonstrate that c-Cb1 negatively regulates several signaling pathways in the osteosarcoma cell line, suggesting that c-Cb1 is a good candidate for gene therapy against osteosarcoma.

Key words : c-Cb1, Osteosarcoma (骨肉腫), Signal Transduction (細胞内情報伝達), Tumorigenesis (癌化)

は じ め に

我々は以前より細胞内シグナル伝達における抑制因子を骨肉腫細胞に導入することによりその増殖を抑制することを目的として基礎的研究を行ってきた。今回我々は様々な受容体型、非受容体型チロシンキナーゼを介する細胞内シグナル伝達において広範な抑制因子として働くことが明らかとなっている c-Cb1 を用い実験を行い、その抑制効果について若干の知見を得たので報告する。

方 法

myc-tag をつけた pBK vector に組み込んだ full length c-Cb1⁽¹⁾ をリン酸カルシウム法にて骨肉腫細胞株である SaOS2 にトランスフェクションした。24 時間後に G418 (1mg/ml) を含む培地に交換し stable transformants を選択した後に細胞内蛋白のリン酸化を Western blot 法にて検討した。また c-Cb1 及びその oncogenic な変異体 (70ZCb1) を同様にリン酸カルシウム法にて 293 細胞にトランスフェクシ

図1 実験方法のシェーマ

ンした。293 細胞には同時に血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR), もしくは癌遺伝子 v-Src と reporter gene を導入し c-Cbl のシグナル抑制効果について PDGFR-fos, Src-STAT3 の系について luciferase assay にて検討した (図1)。

結 果

stable transformants における外因性 Cbl の発現は内因性 Cbl に比べ 10 倍以上の差が認められた。この細胞株 (以下 SaOS2-Cbl) で通常の 10% FCS 培養状態での細胞内の総蛋白のリン酸化を比較すると SaOS2-Cbl ではリン酸化の抑制が認められた。またこの時、非刺激状態での SaOS2 のリン酸化が非常に亢進していることが認められたため次に培地の血清濃度を 0.3% の低濃度とし SaOS2 のリン酸化の程度を検討した。その結果 SaOS2 のリン酸化は 0.3% FCS の medium 中でも 5 日目まで殆ど変化を認めず、SaOS2 の増殖因子非依存性の細胞内蛋白のリン酸化が示唆された (図2左パネル)。これはつまり血清中の様々な増殖因子の存在なしでも SaOS2 の刺激が常に ON になっていること、恒常的なシグナルの活性化が存在することが考えられた。そこでこの 0.3% FCS の培養条件下での Cbl の過剰発現の効果をみると、parental な株に比べ SaOS2-Cbl ではリン酸化、

図2 Cbl による骨肉腫細胞株細胞内リン酸化の抑制: c-Cbl 強発現株では増殖因子非依存性の細胞内蛋白のリン酸化が抑制されていた。矢印の蛋白の抑制が特に著明に認められた。

特に矢印で示しているいくつかの蛋白のリン酸化が著明に抑制されていた (図2右パネル)。このことにより Cbl の過剰発現により SaOS2 におけるおそらく恒常的なシグナルの活性化を抑制することが可能であると考えられた。

次に luciferase assay にて c-Cbl の PDGF-c-fos のシグナルの抑制効果を検討した。その結果図3に示すように c-Cbl は PDGF 刺激による c-fos の

図3 c-CblによるPDGF-c-fos signalの抑制
c-CblはPDGF-c-fos signalを濃度依存性に抑制した。各々の実験は3つのサンプルで2回行った。

activityを濃度依存性に抑えることがわかった。更に我々はc-Cblが非受容体型チロシンキナーゼを介するシグナルに関しても抑制可能かどうかをv-Src-STAT3のシグナルについても調べたがその結果c-Cblがv-Src-STAT3の系を抑制し、逆に70Z-CblやY371Fといったoncogenicな変異体がSTAT3活性化を増強するという結果を得ている。

考 察

c-Cblは120KDの細胞内蛋白を産生する原癌遺伝子であり、様々な受容体型、非受容体型チロシンキナーゼを介する細胞内シグナル伝達において抑制因子として働くことが相次いで報告され、現在では細胞内シグナル伝達系の広範な制御因子であることが明らかとなってきた。その抑制因子としてのメカニズムは長い間不明であったが、近年我々及び他のグループから独立し

てc-CblがユビキチンリガーゼE3³⁾としての機能を持つこと、そしてこれが抑制因子としてのメカニズムであることが報告された¹⁾²⁾⁴⁾。つまりc-Cblは活性化した受容体を標的とし蛋白分解に導くことにより、シグナルをoffにする働きがあると考えられた。我々の今回の結果ではこのc-Cblを過剰発現することによりSaOS2における異なる2つのチロシンキナーゼ、PDGF, Src, からのシグナルを同時に抑制できる可能性が示唆された。特にPDGFは非常に強くSaOS2のリン酸化を亢進し、またPDGFRからのシグナルは転写因子c-fosを活性化するが、c-fosは過剰発現させると骨肉腫を発生することが知られている。このことからc-Cblが骨肉腫に対する今後の遺伝子治療の候補遺伝子として有効ではないかと考えられた。

ま と め

①細胞内シグナルの抑制因子であるc-Cblを骨肉腫細胞に導入することによりその増殖抑制効果を検討した。

②c-Cblは骨肉腫の遺伝子治療における有効な候補遺伝子であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) Joazeiro, C. A. et al.: The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, 286 : 309-312, 1999.
- 2) Levkowitz, G. et al.: Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell.*, 4 : 1029-1040, 1999.
- 3) 田中啓二, 大島良典編: タンパク質分解の最前線2001. 実験医学 (増刊), 19(2) : 2001.
- 4) Yokouchi, M. et al.: Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. *J. Biol. Chem.*, 274 : 31707-31712, 1999.