

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07174

研究課題名(和文) Wnt依存性癌幹細胞を標的とした大腸癌肝転移治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment for colorectal cancer liver metastasis targeting Wnt-dependent cancer stem cells

研究代表者

呉 しん (Wu, Xin)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00764739

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)：本研究ではmicroRNAのうち、miR-487bと大腸癌転移の関連性を明らかにし、大腸癌転移治療法の開発を目的とした。miR-487bは大腸癌の予後悪化因子であること、Wntシグナル経路の受容体であるLRP6やKRASを標的とし、LRP6やKRASの下流因子の活性や大腸癌細胞の増殖や浸潤、コロニー形成を抑えたが、大腸癌に対する抗腫瘍効果は弱かった。一方、LRP6に関して解析を行った結果、LRP6はその下流因子に変異を多く認める大腸癌では、その様な変異の少ない食道癌と比べて、予後との関連は少なく、大腸癌における発現意義は見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-487bの新たな機能として大腸癌の増殖や浸潤、コロニー形成、WntリガンドやKRASが関与するシグナル系に関わっていることが明らかに出来たという意味で、学術的な意義は大きい。大腸癌に比べて、食道癌ではLRP6の発現が癌の悪性化に寄与していることが明らかとなった。癌の悪性化の進展は癌種や個体差など様々な原因により影響を受ける。そのため、個別化医療等により患者に最適な治療を設定する必要がある。今回の結果は、この様なオーダーメイド医療において、非常に有用となるデータを提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to develop the new treatment of colorectal cancer with miR-487b. Mir-487b was a prognostic factors for colorectal cancer. This miRNA targeted LRP6, a coreceptor for Wnt ligand, and KRAS. Although transfection of miR-487b to the colorectal cancer cell lines inhibited cell growth, invasion, and colony formation, the anti-tumor effect of miR-487b appeared to be not sufficient to inhibit in vivo tumor growth. Moreover, LRP6 expression was not related to prognosis in colorectal cancer. In vitro signal transduction assays, siRNA-LRP6 inhibited Wnt signal activity when Wnt3a was added in esophageal cancer cells, but not in colon cancer cells, suggesting that LRP6 may not paly a crucial role in colon cancer, possibly because of the endogenous alterations of  $\beta$ -catenin and APC genes.

研究分野：癌の核酸治療

キーワード：マイクロRNA 大腸癌 LRP6 KRAS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達系には 19 種類のリガンドと 10 種類の 7 回膜貫通型受容体 Fzd で構成されているが、それらの対応関係について大別すると  $\beta$ -catenin 経路、PCP 経路、 $Ca^{2+}$  経路の 3 つの経路を活性化すると考えられている。大腸癌における癌抑制遺伝子 APC は  $\beta$ -catenin の分解を誘導し Wnt シグナル伝達系を負に制御している。APC や  $\beta$ -catenin の遺伝子に変異が起こると  $\beta$ -catenin が蓄積し、核内で TCF 転写因子と結合し、各種の癌遺伝子の活性化を通して、悪性化のカスケードが ON になる。Wnt リガンドの認識には Fzd と共に LRP5/6 膜蛋白質が必須であることが分かってきた。

癌幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つことが知られており、大腸正常陰窩の腸幹細胞における Wnt シグナルの活性化が大腸癌に関与する。また、大腸癌幹細胞の維持には Wnt シグナル伝達系が必須であり EGF シグナルと相加的に腫瘍の増生に働く等のことから、Wnt シグナル伝達系は癌幹細胞性の維持の一翼を担うと考えられている。

私達は臨床サンプルから大腸癌の肝転移に関する microRNA(miRNA)を調べるうちに、転移を有さない原発巣と比較して肝転移巣で発現が低下する miRNA を 38 種類同定した。その中から miR-487b が Wnt シグナル伝達経路の膜蛋白質 LRP6 を標的とすることを見出した。

## 2. 研究の目的

分子標的治療をはじめとする集学的治療の進歩により大腸癌の予後は伸びているが、癌全体としては大腸癌による死亡数はトップクラスであり、その原因の多くは肝臓をはじめとする多臓器転移である。癌再発の芽となる癌幹細胞の駆除こそが究極の癌治療であるが、近年 Wnt シグナル伝達系の癌幹細胞での役割が注目を集めている。私達は臨床サンプルから大腸癌の肝転移に関する miRNA を調べるうちに、miR-487b が Wnt シグナル伝達経路の膜蛋白質 LRP6 を標的とすることを見出したことから、本研究では、miR-487b の Wnt シグナル調節、浸潤・転移形成能、癌幹細胞性賦与との関連性について検討し、効果的な大腸癌転移治療法を開発することを目的とした。また、大腸癌では LRP6 より下流にある細胞内分子に変異が認められており、Wnt シグナルの入り口である LRP6 が癌化に寄与しているかどうかは明らかとなっていない。そこで、大腸癌における LRP6 発現の意義について明らかとすることを副次的な目的とした。

## 3. 研究の方法

miR-487b を核酸導入したヒト大腸癌細胞株の HCT116 と DLD-1 を用いて、細胞増殖能、コロニー形成能、および浸潤能等を *in vitro* 実験により調べた。

肺癌において、miR-487b は KRAS を標的とすることが報告されており、大腸癌でも同様の結果が得られるかを検証するために、ヒト大腸癌細胞株において、miR-487b が KRAS の発現やその下流シグナル分子である ERK、AKT のリン酸化に及ぼす影響を調べた。

miR-487b の抗アポトーシス作用を cleaved-PARP の発現を調べた。

Wnt シグナル伝達経路に miR-487b が及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。

miR-487b の臨床的意義を明らかにするため臨床サンプルより大腸癌における miR-487b 発現を測定し、予後解析を行った。

大腸癌組織と食道癌組織の免疫染色により LRP6 と  $\beta$ -catenin の発現量を比較する。大腸癌細胞株と食道癌細胞株を用いて、LRP6 のノックダウンが Wnt シグナルの活性化に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。

## 4. 研究成果

ヒト大腸癌細胞株の HCT116 と DLD-1 に、リポフェクション法を用いて miR-487b を導入すると、細胞増殖能、コロニー形成能、および浸潤能が有意に低下していることが明らかとなった。

ヒト大腸癌細胞株において、miR-487b が KRAS の発現を抑制し、その下流シグナル分子である ERK、AKT のリン酸化を抑制することを確認できた。

miR-487b は cleaved-PARP の発現を抑制し、抗アポトーシス作用を持つと考えられた。

ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、miR-487b が LRP6 を直接標的とすることを確認し、更にヒト大腸癌細胞株において、miR-487b が LRP6 のタンパク発現、およびリン酸化を減少させることを示した。

miR-487b の臨床的意義を明らかにするため予後解析を行った。全生存期間において、miR-487b 低発現群は miR-487b 高発現群と比較して有意に予後不良であった。単変量・多変量解析を行ったところ、miR-487b は、独立した予後不良因子であると考えられた。更に、大腸癌において、miR-487b は肝転移で発現が低下し、KRAS および LRP6 を標的として発現を制御していることが示唆された。

しかし miR-487b の抗腫瘍効果は期待されたほど強くなく、当初の実験計画であった動物実

験による miR-487b の抗腫瘍効果の検討は差し控えた。

我々が miR-487b の標的遺伝子として同定した LRP6 分子については、乳癌や肝臓癌で癌促進的に働くとの報告はあるものの、大腸癌での役割は知られておらず、この点に焦点を切り替えて研究を進めた。その結果、LRP6 の発現量と大腸癌の予後には関連が認められなかった。大腸癌の多くは LRP6 の下流の細胞内で  $\beta$ -catenin や APC 遺伝子の変異が認められている。一方、食道癌ではそのような変異はあまり認められていない。これらの癌の臨床サンプルで LRP6 とその下流因子である  $\beta$ -catenin の発現量を調べると、大腸癌では LRP6 高発現の頻度は低く、 $\beta$ -catenin が高発現していることが分かった。一方、食道癌では LRP6 の発現は大腸癌より亢進しており、 $\beta$ -catenin の発現亢進は大腸がん比べると低頻度であった。また、大腸癌細胞株である HCT116 や DLD-1 と食道癌細胞株である TE-1 や TE-8 を用いて、LRP6 のノックダウンが Wnt シグナル活性化に及ぼす影響を調べると、食道癌細胞株は影響を受けるが、大腸癌細胞株では受けないことが明らかとなった。これらの結果から、大腸癌において LRP6 の発現の意義は少ないことが分かった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1.

学会名等：第 77 回日本癌学会学術総会

発表者名：呉しん、波多豪、横山雄起、大石和樹、三吉範克、原口直紹、高橋秀和、畑泰司、  
松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹、山本浩文

発表標題：miR487b が大腸癌の転移を抑制する

発表年：2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。