様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 １６ 日現在

機関番号：３２６６１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2019
課題番号：１６Ｋ１０５５５

研究課題名（和文）進行性大腸癌の転移を司る分子の同定：転移初期に一過的に働く分子に焦点を当てた探索

研究課題名（英文）Identification of key factors to drive metastasis of progressive colorectal cancers: A search focusing transient players at early stage of metastasis

研究代表者
有田　通恒（ARITA, Michitsune）

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：８０３０７７１９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、再発や転移腫瘍の解析では見いだせない「悪性化過程で働く分子」の同定を目的とした。当初計画した転移性EMAST癌細胞の濃縮が期待通りに進まなかったため、打開策として、濃縮前の細胞集団を対象とした遺伝子発現解析データの精査を行った。その結果、EMAST誘導条件下で発現が亢進する遺伝子として、細胞膜貫通型受容体TrkBが浮上した。TrkBは神経芽腫での悪性度指標として知られるが、本研究により、大腸癌でも低酸素下での細胞増殖を担う分子であることが明らかとなり、転移や浸潤など悪性化に関与する可能性が示唆された。一方で、転移性EMAST癌細胞の濃縮については今後の課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年、一部の免疫チェックポイント阻害薬が高頻度のマイクロサテライト不安定性（MSI-High）を示すがんに奏功することが示された。一方、進行性大腸癌においてはMSI-High癌は比較的予後良好とされ、むしろ、MSI-Highではない癌が問題となる。EMASTはマイクロサテライト不安定性の一形式であり、MSI-Highとは排他的な関係にある。しかも、大腸癌の予後と負に相関する。本研究では、EMASTを誘導する低酸素下で細胞増殖を担う分子としてTrkBを見いだした。期間内に達成できなかった手法の改善やTrkBの大腸癌悪性化における役割の解明を進めることで、社会に一層貢献できるものと考える。

研究成果の概要（英文）：　In this study, we aimed to identify factors driving metastasis of colorectal cancers (CRCs) showing elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide repeats (EMAST), which is known to be a type of microsatellite instability and to correlate with poor prognosis of CRCs. At first, we planed to concentrate cells acquired metastatic ability in an EMAST-inducible culture condition achieved by hypoxia and TP53 inactive mutation. However, as the concentration has been failed, we focused to find genes which are significantly up- or down-regulated in the EMAST-inducible condition. As a result, we found tropomyosin receptor kinase B (TrkB), which has been known to be a poor prognostic marker of neuroblastoma. We revealed that TrkB also promoted hypoxic cell growth of CRC cell lines. Hypoxia is well known to be an environment for acquisition of metastatic ability of tumor cells. Taken together, TrkB might be indicated to play a role for CRC metastasis in hypoxia.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：TrkB　EMAST　大腸癌　低酸素

※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。

１．研究開始当初の背景

根治切除不能あるいは術後再発のある進行性大腸癌の克服には、再発・転移を予測する因子や阻止する分子標的薬の開発が求められており、転移を司る分子の特定はとりわけ喫緊の課題である。網羅的解析の技術進歩と相まって、原発巣と転移巣を用いた比較探索が国内外で精力的に試みられている。転移は、転移能を獲得したごく少数の癌細胞が原発巣から血管等へ離脱・侵入することで始まる多段階の現象である。各段階では種々の責任分子が一過的あるいは恒常的に働くと考えられる。この概念に基づけば、原発巣の解析では、責任分子の数やそれを発現する細胞数が少ないものは検出できず、また、転移巣の解析では、転移の初期に一過的に働く分子を捕えられない。我々は、これら分子を同定するためには、転移能を獲得する腫瘍内環境を実験的に再現することが重要と考えた。そこで、腫瘍内環境の再現の成否を判定する指標として、大腸癌悪性度と強く相関するゲノム不安定性 elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide repeats (EMAST) に着目した。

EMAST はいわゆるマイクロサテライト不安定性（microsatellite instability, MSI）の一形式で、4 塩基が繰返す配列に異常が集中する。1 ないし 2 塩基リピートも異常となる高度な MSI (high frequency of MSI, MSI-H) とは異なる型として定義される（図 1)。我々は 2008 年に米国 Baylor 大のグループと共同で、EMAST の原因遺伝子が DNA ミスマッチ修復遺伝子の 1 つ MSH3 であることを見いだした。また、散発性大腸癌での EMAST 頻度が 6 割にのぼることも報告した。その後、韓国や米国の他のグループにより追試がなされたのに加え、悪性化に伴う EMAST 頻度の上昇も報告された。これは、「散発性大腸癌の 6 割が EMAST 発生とともに悪性化する」ことを強く指し示していた。即ち、EMAST 誘導条件の確立こそが大腸癌が悪性化する環境の再現であると考えられた。そこで、我々は、EMAST 腫瘍発生に繋がる MSH3 発現低下の分子機序解明に着手した。その結果、低酸素により MSH3 発現が低下することを見いだし、大腸癌細胞株が EMAST を呈する低酸素培養条件を確立した（表 1)。さらに、ごく最近、たとえ低酸素下でも野生型 p53 の発現があれば EMAST ではなく MSI-H となることを示し（表 2)、低酸素性 EMAST 誘導には p53 の機能欠損が不可欠要素であることも明らかにした。一方で、細胞株という均一な細胞集団でさえも、EMAST となる細胞の割合は極めて低いことも明らかとなった。これは、腫瘍で転移性となる癌細胞はごく一部であることに合致すると考えられた。しかし、同時に、EMAST に関連した悪性化因子を特定するためには、解析対象を EMAST 細胞もしくは EMAST 発生環境下で悪性化した細胞に絞る必要性も浮き彫りとした。そこで、EMAST 誘導条件下で転移能を獲得した癌細胞を選別し、これを解析対象として転移責任分子を探索する本研究課題を計画した。

| 1, 2塩基リピート | 4塩基リピート | 型 |
|---|---|---|
| 不安定 | 不安定 | MSI-H |
| 安定 | 不安定 | EMAST |

**図1. MSI-HとEMASTの定義**

**表1. 低酸素培養によるEMASTの誘導**

**「異常を示した数＝０」はその配列が「安定」であることを意味する。一方、網掛の部分は「不安定」を意味する。**

| 細胞株 | $O_2$% | 調べたクローン数 | 異常を示した数 1塩基リピート | 異常を示した数 4塩基リピート | p値 |
|---|---|---|---|---|---|
| SW480 | 21 | 40 | 0 | 0 | |
| | **0.1** | **40** | **0** | **4** | 0.06 |
| SW620 | 21 | 61 | 0 | 0 | |
| | **0.1** | **80** | **0** | **6** | 0.03 |

**表2. p53の有無と1塩基リピートの安定性**

**SW620は低酸素下でも安定だったが、野生型p53を発現するSW620-p53では不安定な細胞（MSI-Hの細胞）が出現した。**

| 細胞株 | 野生型p53の発現 | 1塩基リピートが異常を示した数／調べた数 21% $O_2$ | 1塩基リピートが異常を示した数／調べた数 0.1% $O_2$ |
|---|---|---|---|
| SW620 | 無 | 0/86 | 0/136 |
| SW620-p53 | 有 | 0/27 | 2/36 |

(調べた1塩基リピート配列：BAT26)

２．研究の目的

本研究課題では, 進行性大腸癌の克服を目指して、大腸癌の転移を司る分子の探索を目的とした。さらに、従来行われてきたような再発・転移癌を対象とした手法では難しかった転移の初期にも焦点を当て、かつ、一過的に働く分子をも捕捉可能とすることも目指した。そこで、我々が確立した大腸癌細胞株での EMAST 誘導培養系を用い、生体内で EMAST 腫瘍が悪性となる環境を摸すことで、その環境下で特異的に量や働きが変化する分子群から転移の責任分子を同定する計画とした。さらに、見いだした分子をもとにバイオマーカーの開発に繋げるとともに、EMAST 腫瘍が示す悪性化の分子機構解明の端緒を得ることも期待した。そこで、研究の方法では、以下の 3 点、(1) 転移能獲得癌細胞の選別と濃縮、(2) 転移能獲得に働く分子の探索、(3) 転移に寄与する分子の同定と予後因子としての有用性の評価に主眼を置いた。

３．研究の方法

本研究の目的達成のための具体的な研究方法は以下の通りとした。

(1) 転移能獲得細胞の選別と濃縮

EMAST 誘導条件下で EMAST を呈する細胞は 10%程度である（表 1)。この細胞集団を解析しても、10%の細胞が発現する分子は背景に埋もれてしまう。そこで、マウスへの移入・生着を繰返し、転移性癌細胞を選別する。選別の母集団となる細胞はヒトの大腸癌由来細

胞株を用いる。したがって、移入するマウスは免疫不全マウスとする。ただし、移入した細胞の中からより悪性度の高い細胞を選択できるよう、敢えてヌードマウスを用いる。繰返しの移入・生着により選別された細胞集団で発現や機能の変化が大きい分子を事項のように探索する。変化の比較では選別前の集団を対照とする。

(2) EMAST 腫瘍の転移能獲得に働く分子の探索

転移能獲得に重要な分子の働きは、遺伝子発現やタンパク質レベルの「量の変化」や翻訳後修飾などの「質の変化」で捕らえられるはずである。これら変化を指標とした多視点からの探索を行い、(1) で選別した転移性癌細胞で特異的に働く分子を特定する。

(3) 大腸癌の転移に寄与する分子の同定

(2) で見いだされた候補分子について、転移への寄与度を実験的に評価し、転移能獲得における分子の役割を検討する。また、寄与度の高い分子から順に、病理検体等での発現を調べ、予後因子としての有用性を評価する。

## ４．研究成果

本研究課題は、進行性大腸癌の転移主因分子の同定を最終目標とした。大腸癌悪性度と相関するゲノム不安定性 EMAST の in vitro 誘導系を用いることで、転移の初期にも焦点を当て、転移過程で一過的に働く分子も探索対象とできるよう工夫した。我々が大腸癌細胞株を用いて確立したのは、TP53 遺伝子が変異などにより機能していない状況下での 7 日間の低酸素培養であった。ただし、これまでの検討から、この条件下での EMAST 細胞発生率は SW480 で 40 クローン中 4 クローン、SW620 で 80 クローン中 6 クローンであり、10%程度であることがわかっていた（表 1)。また、この値は、臨床検体でも見られる EMAST 頻度とも矛盾しなかった。EMAST と転移能の獲得の関係が相互に間接的であり、転移能を獲得した細胞が EMAST を示す細胞とは異なる可能性もある。この場合、EMAST 誘導条件下で転移能を獲得する細胞は必ずしも 10%とは限らない。その場合であっても、「TP53 機能欠失細胞の低酸素培養」が生体内での大腸癌悪性化環境を in vitro で摸していることや、臨床知見との一致を考え合わせると、本条件で悪性化する細胞数もまた極めて少ないと考える方が自然である。そこで、先述の研究計画を立案し、ヌードマウスを用いた転移能獲得細胞の濃縮から開始した。しかしながら、初年度、第 2 年度と移入実験を継続したものの、肉眼で確認できる癌細胞の生着を得ることができなかった。手技の問題に加え、モデル細胞株 SW480 や SW620 が本実験に適していない可能性が考えられたが、研究期間内で一定の成果を得ることを重視し、次善の策を採用した。すなわち、第 2 年度後半から濃縮前の SW620 での DNA マイクロアレイ解析データを再度精査し、候補分子を洗い出すことに専念した。その結果、今回用いた細胞株の低酸素下での増殖に働く分子として TrkB (NTRK2) を見いだした。以下に詳細を報告する。

(1) 低酸素下で 7 日間培養した SW620 での遺伝子発現を網羅的に解析した DNA マイクロアレイのデータについて、再度精査した。通常酸素圧下で同期間培養した SW620 を対照として、まず、遺伝子発現が亢進する遺伝子群を解析した。亢進が 2 倍以上の群について、各遺伝子が細胞内のどの機能や応答に関与するかを分類するパスウェイ解析を行った。その結果、上位 10 位にランクづけされたパスウェイは表 3 のようになった。低酸素下でのエネルギー産生亢進に繋がる糖代謝・糖新生 (rank 2) やタンパク質の合成に必要なリボソーム類 (rank 4)、細胞の生存・増殖に関わる MAPK シグナル伝達系 (rank 5) の他に、浸潤や転移に必要と考えられている細胞接着分子 (rank 1) や細胞骨格関連 (rank 6)、各種血球細胞のリクルートに働く分子群 (rank 7〜9) が認められたことが特徴的であった。すなわち、我々の EMAST 誘導条件は、腫瘍塊で癌細胞が生存し、かつ、浸潤能を獲得して転移していく環境を再現していることの証左であると考えられた。

**表3. Top 10 KEGG pathways enriched in SW620 cultured in EMAST-generating hypoxia**

| rank | pathway | size | normalized enrichment score | nominal p-val |
|---|---|---|---|---|
| 1 | FOCAL ADHESION | 158 | 1.78 | < 0.001 |
| 2 | GLYCOLYSIS GLUCONEOGENESIS | 49 | 1.69 | 0.007 |
| 3 | HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE | 48 | 1.64 | 0.009 |
| 4 | RIBOSOME | 86 | 1.59 | 0.011 |
| 5 | MAPK SIGNALING PATHWAY | 208 | 1.56 | < 0.001 |
| 6 | AXON GUIDANCE | 100 | 1.56 | 0.002 |
| 7 | CYTOKINE CYTOKINE RECEPTOR INTERACTION | 144 | 1.54 | 0.004 |
| 8 | NATURAL KILLER CELL MEDIATED CYTOTOXICITY | 89 | 1.51 | 0.018 |
| 9 | T CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY | 83 | 1.5 | 0.014 |
| 10 | RENAL CELL CARCINOMA | 63 | 1.48 | 0.022 |

(2) 着目すべき遺伝子を見いだすために、(1) で最上位かつ有意差の最も高いパスウェイである細胞接着 (focal adhesion) で働く遺伝子について、タンパク質レベルでの発現量を調べた。その結果、mRNA 亢進の度合いが高かった Integrin α5, β4 や Caveolin 1-3、Laminin α3 ではいずれもタンパク質レベルでの発現亢進も認められた (図 2)。しかしながら、免疫細胞染色ではこれらタンパク質の細胞内での低酸素による亢進は認められなかった (図 3)。一方、(1) で見いだされたパスウェイのうち、細胞接着に次いで有意差が最も高かった MAPK シグナル伝達関連遺伝子のうち、mRNA の亢進が 7 倍と極めて高かった NDRG1 についてもタンパク質レベルでの変化を調べた。その結果、今回調べた中では最も高い 500 倍の亢進が認められた。適した抗体がないために免疫細胞染色は実施していないものの、低酸素下での機能に与える影響も大きいことが予測され、継続して検討を行っている。

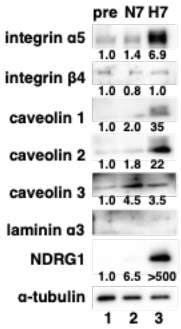


図2. Protein level expression of the genes, up-regulated at mRNA level in 7-day hypoxia

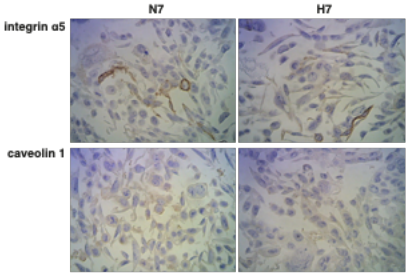


図3. Immunocytochemical analysis of expression of integrin α5 and caveolin 1 in 7-day hypoxia

(3) 有意差の高さで共通する細胞接着系と MAPK シグナル伝達系に共通する分子を検索したところ、いずれのシグナル伝達系でも最上流に位置する分子として受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase, RTK) が浮上した。その中でも、我々は tropomyosin receptor kinase B (TrkB) に着目した。近年、癌種を越えて予後不良因子としての報告が増えているものの、転移や低酸素下での働きについての知見が乏しかったからである。

TrkB は、上で調べた Integrin や NDRG1 ほどの亢進は示さなかったものの、EMAST 誘導条件下で mRNA 量が亢進した。本解析に供した細胞集団が濃縮前のものであったことを考えると、TrkB のように亢進度合いが低く検出されることも説明がつく。TrkB は本来神経発生に重要な分子で、癌領域では当初、神経芽腫での悪性度を反映する分子として見いだされた。TrkB が大腸癌の悪性化にどのように関わるのかを知るために、大腸癌細胞株 SW480 と SW620 を用いて、発現量の変化や細胞増殖に対する影響など基礎的な検討を行った。ただし、これら細胞株ではもともとの TrkB 発現量が少なく判別がしにくい欠点があった。そこで、より明瞭に発現が検出できる神経芽種細胞株 SK-N-SH も対照として用いた。その結果、いずれの細胞株でも低酸素下で TrkB 遺伝子の発現が亢進することを見いだした (表 4)。また、TrkB のリガンドである BDNF も低酸素下で発現量が亢進することがわかった。siRNA 法により遺伝子発現を TrkB 特異的にノックダウンしたところ、低酸素下での細胞増殖が抑制され (図 4A)、TrkB の発現亢進が低酸素下での細胞の増殖を支配していることもわかった。また、この条件下で、TrkB の下流に位置することが知られるシグナル伝達物質 AKT の活性化も抑制された (図 4B)。すなわち、EMAST を誘導する条件下で発現が亢進する TrkB は、そのリガンドの発現亢進も手伝って、低酸素下での細胞増殖に寄与していると考えられた。TrkB は細胞接着による細胞内シグナル伝達系でも働くことが知られている。つまり、TrkB は細胞運動に必要な細胞骨格の変化にも関わることから、EMAST 誘導条件下で獲得する転移能においても重要な働きを持つことが期待された。

表4. Hypoxic expression level of TrkB and its ligand BDNF at mRNA levels

| Cell Line | TrkB mRNA | | BDNF mRNA | |
|---|---|---|---|---|
| | Untreated | LicA (Inhibition, %) | Untreated | LicA (Inhibition, %) |
| SK-N-SH | 1.00 ± 0.091 | 0.29 ± 0.007 (71.4) ** | 1.00 ± 0.067 | 0.71 ± 0.011 (28.7) ** |
| SW480 | 2.49 ± 0.219 | 0.13 ± 0.013 (94.8) ** | 4.79 ± 0.406 | 0.16 ± 0.020 (96.6) ** |
| SW620 | 0.95 ± 0.026 | 0.26 ± 0.017 (72.6) ** | N.D. | |

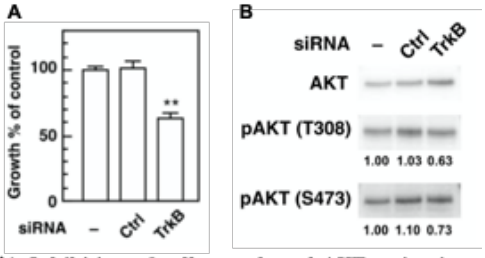


図4. Inhibition of cell growth and AKT activation in hypoxia by knockdown of TrkB

本研究で遂行の要であった「転移能を獲得した細胞の濃縮」が当初の計画通り進まず、期待した解析を実施することができなかった。その理由には、上に述べたようなモデル細胞株の適性の問題が考えられた。より適したモデル細胞株を選択には、EMAST 誘導条件のひとつである TP53 の機能欠失についてもより詳細な検討が必要である。すなわち、大腸癌細胞株で見いだされる多岐にわたる TP53 変異に、EMAST 誘導における役割の違いの有無はないのか。あるとすれば、そうした変異を特定することで、より厳密に低酸素による EMAST 誘導をコントロールでき、モデル細胞株の作出も可能になるのではないか。このアイディアに基づいて、我々はすでに新たな研究計画を遂行中である。今回の研究で見いだされた TrkB を含む分子が、TP53 変異に着目した EMAST 誘導系の中でどのような役割を果たすのかについても、今後解析を進めていく。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Arita Michitsune、Koike Junichi、Yoshikawa Nobuji、Kondo Motonari、Hemmi Hiromichi | ４．巻<br>21 |
| ２．論文標題<br>Licochalcone A Inhibits BDNF and TrkB Gene Expression and Hypoxic Growth of Human Tumor Cell Lines | ５．発行年<br>2020年 |
| ３．雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences | ６．最初と最後の頁<br>506～518 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms21020506 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>－ |

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| １．発表者名<br>有田通恒，小池淳一，吉川展司，近藤元就，逸見仁道 |
| ２．発表標題<br>甘草由来化合物Licochalcone AによるTrkB mRNA分解促進作用 |
| ３．学会等名<br>第59回日本小児血液・がん学会学術集会 |
| ４．発表年<br>2017年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>有田通恒，小池淳一，近藤元就，逸見仁道 |
| ２．発表標題<br>マイクロサテライト不安定性の一形式であるEMASTの発生過程におけるp53の役割 |
| ３．学会等名<br>第40回日本分子生物学会年会 |
| ４．発表年<br>2017年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|