

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03603

研究課題名(和文) Wntシグナル最下流の転写複合体における制御分子及び新規大腸がん治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of regulatory components of Wnt signaling in beta-catenin and T-cell factor-4 transcriptional complex as therapeutic targets for colorectal cancer

研究代表者

増田 万里 (Masuda, Mari)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：70435717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオーム解析から得られたTCF4/β-catenin 転写複合体と相互作用する約70個のタンパク質より大腸がんの治療標的を見出すため、これらの分子についてsiRNA ライブラリーを作製し、Wnt標的遺伝子の発現定量、及び3次元培養下でWntシグナル活性を定量化する独自に開発したWASA (Wnt signaling Activity in Spheroid Assay)法により、Wntシグナル抑制効果を持つ大腸がん治療標的候補分子を複数同定した。更に、細胞増殖抑制効果により候補分子の絞り込みを行った。候補分子にはDNA二重鎖切断のDNA修復及び転写活性制御に関与する分子群が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナルの最下流にあるTCF4/β-catenin 転写複合体の制御の全貌を解明することは、多くの生物種において保持されているWntシグナルの機能とその分子機構を理解するうえで学術的意義が高い。一方、Wntシグナルの恒常的活性化は大腸がんをはじめとする様々ながんで報告されており、本シグナル経路に依存する発がんやがん幹細胞の維持に関わる分子機構を理解することによって、新規治療標的の同定に繋がることを期待される。本研究成果は、Wntシグナルの活性化がドライバーとなる様々ながん種に対し新たな治療薬を創出する土台を構築するもので、社会への貢献度が高く重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Constitutive activation of Wnt signaling is observed in most colorectal cancers (CRCs) and has been believed to play a pivotal role in maintaining cancer stem cells. Through the screening with a siRNA library targeting 70 molecules previously identified as components of the TCF4/β-catenin transcriptional complex, we have explored their regulatory effects on the Wnt signaling. We looked at the expression of Wnt target genes such as c-Myc and Axin, cell proliferation, and Wnt signaling activities in colorectal cancer spheroids by WASA (Wnt signaling Activity in Spheroid Assay) method we developed. As a result, we identified several molecules as candidates for therapeutic targets for CRCs. Of interest, most of the candidate molecules were involved in DNA damage and transcription-coupled DNA repair.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Wntシグナル TCF4/β-catenin 転写複合体 プロテオーム解析 大腸がん 治療標的 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

遠隔転移や術後再発をきたした進行大腸がんは未だに難治であり、治療継続中に次第に化学療法に抵抗性となり根治には至らず、遠隔転移のある大腸がん患者の5年生存率は約15%にとどまる。大腸がんの90%以上の症例でAPC、 β -cateninなどのWntシグナル経路の遺伝子に変異があるため¹、同経路が恒常的に活性化しており、「がん幹細胞」の発生・維持に繋がると考えられている。がん幹細胞は治療抵抗性、自己複製能と高い造腫瘍性を持ち、治療後に残存すると腫瘍を再構築し、再発の原因となると考えられている。よって、Wntシグナルが遮断できれば、がん幹細胞を根絶し、大腸がんの根治が期待できる可能性がある。我々はAPCの下流でWntシグナルの実行因子として働くTCF4/ β -catenin転写複合体に着目し、先行研究のプロテオーム解析から転写因子TCF4と相互作用する分子としてTNIKキナーゼを同定し²、その阻害化合物NCB-0846を見出した³。本課題研究では、TNIK以外にTCF4/ β -catenin転写複合体と相互作用する約70個の候補分子について、Wntシグナル及びTCF4/ β -catenin転写複合体の制御の全貌を解明し、大腸がんにおける新たな治療標的を探索する。

2. 研究の目的

本申請ではWntシグナルの最下流の実行分子として働くTCF4/ β -catenin転写複合体において、TCF4と相互作用しWntシグナルを制御する分子を同定することを第1の目的とする。更に、同定した候補分子について、大腸がん治療標的としての妥当性を評価し、治療薬開発の可能性を検証することを第2の目的とする。

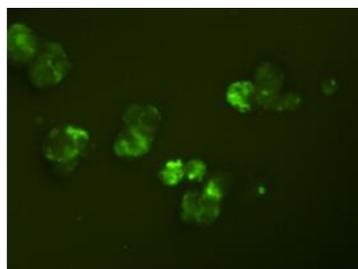
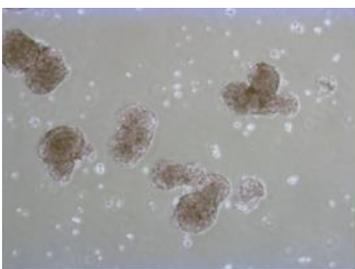
3. 研究の方法

1) Wntシグナル阻害効果を指標としたスクリーニング

【siRNAライブラリースクリーニング】

大腸がん細胞株の核分画抽出液から抗TCF4抗体で得られた免疫沈降物のプロテオーム解析により同定されたTCF4と相互作用する70タンパク候補分子についてそれぞれ3種類のsiRNA、2種類のネガティブコントロール、ポジティブコントロール(β -catenin siRNA 3種類)から成るsiRNAライブラリーを作製した。

スクリーニングには、最初に1) Wnt標的遺伝子c-MycとAxinの発現をreal-time PCRで測定した。次に、2) Wntシグナルによって転写が活性化するプロモーター(TCF/LEF)の制御下でGFPを発現するHCT-116/TOP-GFP細胞とDLD-1/TOP-GFP細胞株を樹立し、独自に開発したWASA(Wnt signaling Activity in Spheroid Assay)法によりWntシグナル抑制効果を測定した。3次元



培養で形成されるスフェロイドはがん幹細胞の特徴のひとつであり、2次元培養に比較しWntシグナル依存性が高い傾向が認められる。Wntシグナルが活性化しているこれらのスフェロイドは恒常的にGFPを発現し

図1. TOP-GFPを発現するスフェアWntシグナルが活性化している細胞はGFPを発現する

(図1)、Wntシグナルが抑制さ

れるとGFPタンパクの発現が消失する。本スクリーニングではsiRNA libraryをtransfectionし蛍光強度をreal-timeで測定しWntシグナル抑制効果を数値化した。更に、3) 細胞増殖についてもreal-timeで細胞接着を指標とした定量、更にendpointでATP活性による定量を行い、siRNAによる細胞増殖抑制効果を検討した。

2) 候補分子と TCF4 の相互作用の確認

スクリーニングの結果より、Wnt シグナルを強く抑制し、細胞増殖を抑制する効果があるものを複数個選び、更に共焦点顕微鏡により TCF4 との共局在を観察し候補分子を選抜した。現在、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)法による相互作用の検証が進行中である。BRET 法では、高レベル発光酵素 NanoLuc ルシフェラーゼでラベルした TCF4 タンパクをエネルギー転移ドナーとし、一方 HaloTag で標識した候補タンパクをエネルギー転移アクセプターとして、HCT116 細胞内で発現させ相互作用を蛍光顕微鏡下で観察する。

4. 研究成果

TCF4/ β -catenin 転写複合体に含まれる 70 個の候補分子の siRNA ライブラリーを用いて、1) Wnt 標的遺伝子である MYC 及び AXIN の発現定量によるスクリーニング、次に 2) 3 次元培養下で Wnt シグナルの活性を Green Fluorescence Protein (GFP) の蛍光強度で定量化できる独自に開発した WASA (Wnt signaling Activity in Spheroid Assay) 法によるスクリーニングを行い、Wnt シグナル抑制効果を持つタンパク候補が複数個 (NXF-1, RAN, TOP2A 等) 見出された。しかしながら、単独で β -catenin の siRNA に匹敵する抑制効果を持つ分子の同定には至らなかった。更に細胞増殖抑制効果を指標に siRNA を用いたスクリーニングを行った結果、比較的強い抑制効果を持つ分子群には、DNA 修復機序に関わる分子や転写活性を制御する分子が複数含まれていた。これらの分子のなかには TCF4 及び β -catenin と共局在が認められるものが多く、転写複合体による Wnt 標的遺伝子の転写には DNA 修復機序の関与が示唆された。その全貌を解明することは、Wnt シグナルに依存する発がんやがん幹細胞の維持に関わる分子機構の解明及び、大腸がんの新規治療標的の同定に繋がることが期待できる。またそれらの分子群のうちどのような組み合わせで分子を欠損することで、TCF4/ β -catenin 転写複合体の機能が変化するかを明らかにし、治療標的としての可能性も検討を続けている。更に、本研究期間中に我々が開発した TNIK 阻害剤 NCB-0846 が骨肉腫や滑膜肉腫⁴に強い抗腫瘍効果を示し、肺がんにおいては TGF- β シグナル経路を抑制し上皮間葉系移行及び転移を抑制することが明らかになったが、いずれの抑制効果においても様々な遺伝子の発現に変化が生じており、NCB-0846 により遺伝子転写のリプログラミングが起きている可能性が示唆された。よって、上記の候補分子によるエピゲネティック制御機構の関連についても引き続き検討を行っている。

- 1 Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337, doi:10.1038/nature11252 (2012).
- 2 **Masuda, M.**, Sawa, M. & Yamada, T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. *Pharmacol Ther* **156**, 1-9, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.10.009 (2015).
- 3 **Masuda, M.** et al. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nat Commun* **7**, 12586, doi:10.1038/ncomms12586 (2016).
4. Sekita T, et al., **Masuda M.** Feasibility of targeting Traf2- and Nck-interacting Kinase in Synovial Sarcoma. *Cancers (Basel)*, 12(5):E1258, doi: 10.3390/cancers12051258 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sekita Tetsuya, Yamada Tesshi, Kobayashi Eisuke, Yoshida Akihiko, Hirozane Toru, Kawai Akira, Uno Yuko, Moriyama Hideki, Sawa Masaaki, Nagakawa Yuichi, Tsuchida Akihiko, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Nakayama Robert, Masuda Mari	4. 巻 12
2. 論文標題 Feasibility of Targeting Traf2-and-Nck-Interacting Kinase in Synovial Sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1258 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051258	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Miyana Akihiko, Masuda Mari, Motoi Noriko, Tsuta Koji, Nakamura Yuka, Nishijima Nobuhiko, Watanabe Shun-ichi, Asamura Hisao, Tsuchida Akihiko, Seike Masahiro, Gemma Akihiko, Yamada Tesshi	4. 巻 145
2. 論文標題 Whole-exome and RNA sequencing of pulmonary carcinoid reveals chromosomal rearrangements associated with recurrence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 85 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2020.03.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugano Teppei, Yoshida Masayuki, Masuda Mari, Ono Makiko, Tamura Kenji, Kinoshita Takayuki, Tsuda Hitoshi, Honda Kazufumi, Gemma Akihiko, Yamada Tesshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Prognostic impact of ACTN4 gene copy number alteration in hormone receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0821-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Mari, Yamada Tesshi	4. 巻 1188
2. 論文標題 Utility of Reverse-Phase Protein Array for Refining Precision Oncology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 239 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-32-9755-5_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda M.	4. 巻 1
2. 論文標題 Hunting hidden pieces of signaling pathways in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HepatoBiliary Surg Nutr.	6. 最初と最後の頁 74-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/hbsn.2018.10.10	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Masuda Mari, Yamada Tesshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Signaling pathway profiling using reverse-phase protein array and its clinical applications	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Expert Review of Proteomics	6. 最初と最後の頁 607 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14789450.2017.1344101	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Masuda Mari, Yamada Tesshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The emergence of TNIK as a therapeutic target for colorectal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Therapeutic Targets	6. 最初と最後の頁 353 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14728222.2017.1297799	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Yamada Tesshi, Masuda Mari	4. 巻 108
2. 論文標題 Emergence of TNIK inhibitors in cancer therapeutics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 818 ~ 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13203	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 15件）

1. 発表者名 増田万里
2. 発表標題 Wntシグナルを標的とした大腸がん治療薬の開発及びその適応拡大の可能性
3. 学会等名 御茶ノ水がん学アカデミア第160回集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masuda Mari
2. 発表標題 Application of the TNiK inhibitor, NCB-0846, to Colorectal Cancer Treatment and Beyond
3. 学会等名 8th Global Reverse Phase Protein Array Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田万里
2. 発表標題 TNiK阻害剤のapoptosis誘導機序の解明
3. 学会等名 第15回日本臨床プロテオゲノミクス研究 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuda Mari
2. 発表標題 Utility of Reverse-Phase Protein Array for Proteogenomic Analysis
3. 学会等名 Tokyo Cancer Moonshot Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuda M., Goto N., Uno Y., Moriyama H., Sekita T., Sawa M., Yamada T.
2. 発表標題 Elucidation of Mechanism of Actions Leading to Apoptosis in Colorectal Cancer Cells Induced by NCB-0846
3. 学会等名 第 78 回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関田哲也、山田哲司、後藤尚子、弘貫透、小林英介、川井章、松本守雄、中村雅也、中山口パート、増田万里
2. 発表標題 滑膜肉腫に対するTNIK阻害剤の有効性
3. 学会等名 第39回 日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sugano, M. Masuda, Y. Uno, N. Goto, M. Seike, M. Sawa, A. Gemma, T. Yamada.
2. 発表標題 Traf2-and Nck-interacting kinase (TNIK) inhibitor, NCB-0846, suppresses TGF- 1-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer.
3. 学会等名 AACR Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Hirozane, M. Masuda, N. Goto, T. Sugano, N. Asano, E. Kobayashi, K. Horiuchi, H. Morioka, A. Kawai, M. Sawa, M. Matsumoto, M. Nakamura, T. Yamada.
2. 発表標題 TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK) regulates cancer stemness and adipogenesis of osteosarcoma cells.
3. 学会等名 AACR Annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤格、服部恵美、塩澤久美子、尾野雅哉、増田万里、山田哲司.
2. 発表標題 肉腫のプロテオゲノミクス解析：国際がんプロテオゲノミクスコンソーシアム（ICPC）.
3. 学会等名 第14 日本臨床プロテオゲノミクス研究会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤格、服部恵美、尾野雅哉、増田万里、川井章、山田哲司.
2. 発表標題 肉腫のプロテオゲノミクス解析：国際がんプロテオゲノミクスコンソーシアム（ICPC）.
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Hirozane, Mari Masuda, Naoko Goto, Teppei Sugano, Naofumi Asano, Eisuke Kobayashi, Akira Kawai, Keisuke Horiuchi, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Masaaki Sawa, Hideo Morioka, Tesshi Yamada.
2. 発表標題 TNIK is a novel molecular target for osteosarcoma treatment and controls osteosarcoma cell fate.
3. 学会等名 2018 CTOS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mari Masuda, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Naoko Goto, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada.
2. 発表標題 Clarification of the Signaling Network Affected by the TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-phase Protein Array.
3. 学会等名 The Human Proteome Organization (HUP0) 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮永晃彦、増田万里、蔦幸治、西島伸彦、清家正博、浅村尚生、弦間昭彦、山田哲司。
2. 発表標題 網羅的ゲノム解析を用いた肺カルチノイドの新規治療標的遺伝子の同定。
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術総会、
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田万里、弘貴透、宇野佑子、澤匡明、山田哲司。
2. 発表標題 大腸がん幹細胞の遺伝子転写を標的とした新規分子標的治療薬の開発。
3. 学会等名 第14回日本がん分子標的治療学会・TRワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Masuda, Yuko Uno, Shigeki Kashimoto, Hideki Moriyama, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada
2. 発表標題 Application of Proteomic Technology in Development of Novel TNK Inhibitor Blocking Wnt Signaling
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2017年大会JHUP0第15回大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mari Masuda, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Hideki Moriyama, Shigeki Kashimoto, Naoko Goto, Masaki Sawa and Tesshi Yamada
2. 発表標題 Preclinical development of NCB-0846, a novel TNK inhibitor that blocks Wnt signaling in colorectal cancer
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菅野哲平、増田万里、宇野佑子、森山英樹、後藤尚子、清家正博、澤匡明、弦間昭彦、山田哲司
2. 発表標題 新規TNIK 阻害薬によるEMT 制御
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 弘貫透、増田万里、後藤尚子、浅野尚文、小林英介、川井章、堀内圭輔、澤匡明、山田哲司
2. 発表標題 TNIK は骨肉腫の新規治療標的となりうる
3. 学会等名 第76回日本癌学会月術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇野佑子、増田万里、森山英樹、澤匡明、山田哲司
2. 発表標題 TNIK 阻害剤はWnt シグナルを減弱させてがん幹細胞画分を減少させる
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 弘貫透、増田万里、浅野尚文、小林英介、川井章、堀内圭輔、松本守雄、澤匡明、森岡秀夫、中村雅也、山田哲司
2. 発表標題 TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK) は骨肉腫の分子標的となりうる
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 弘實 透, 増田万里, 後藤尚子, 菅野哲平, 浅野尚文, 小林英介, 川井 章, 堀内圭輔, 松本守雄, 中村雅也, 澤 匡明, 森岡秀夫, 山田哲司
2. 発表標題 骨肉腫治療におけるTNIK阻害剤の可能性
3. 学会等名 分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Uno, Hideki Moriyama, Shigeki Kashimoto, Mari Masuda, Masaaki Sawa, Tesshi Yamada
2. 発表標題 A novel TNIK inhibitor potently downregulates cancer stem cell population through attenuation of Wnt signaling
3. 学会等名 AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mari Masuda, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada
2. 発表標題 Elucidation of Signaling Pathways Affected by TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-Phase Protein Array
3. 学会等名 RPPA Global Workshop 2017 Dublin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田万里
2. 発表標題 がん高精度医療における逆相タンパクアレイ基盤の有用性
3. 学会等名 北里疾患プロテオーム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tesshi Yamada and Mari Masuda
2. 発表標題 Therapeutic target discovery by cancer proteomics in the era of large-scale genome-resequencing
3. 学会等名 HUPO 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Miyanaga A., Masuda M., Yamada T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 5
3. 書名 Chapter 10. Biomarkers of Lung Cancer: Liquid Biopsy Comes of Age. Biomarkers in Cancer Therapy.	

1. 著者名 Masuda M., Yamada T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 8
3. 書名 Chapter 15. Utility of Reverse-phase Protein Array for Refining Precision Oncology, Reverse-Phase Protein Array, Advances in Experimental Medicine and Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>国立がん研究センター研究所・連携研究室（増田グループ） https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/genetics/project/index.html 個別医療に有用なバイオマーカーの開発 https://www.ncc.go.jp/jp/ri/department/clinical_proteomics/project/030/index.html</p>
--

6. 研究組織

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