

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08696

研究課題名(和文)大腸癌におけるDUSP4の機能的意義の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Clarification of the functional significance of DUSP4 and its therapeutic application in colorectal cancers.

研究代表者

一万田 充洋 (Ichimanda, Michihiro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60770146

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)：大部分の大腸癌では、MAPキナーゼ脱リン酸化酵素DUSP4の発現低下に伴うMAPキナーゼの恒常的活性化が癌の進展に關与することを明らかにした。さらに、活性化したMAPキナーゼを阻害することにより癌の増殖や浸潤を抑制し得ることを示した。一方、一部の大腸癌では、DUSP4が高発現しているにもかかわらずMAPキナーゼは活性化レベルを維持していた。そのような癌細胞ではDUSP4の発現抑制により増殖能が抑制され、DUSP4はがん遺伝子として機能している可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の増殖・浸潤におけるDUSP4の機能的意義を明らかにした。大部分の大腸癌では、「がん抑制遺伝子」DUSP4の欠失に伴って活性化されるMAPキナーゼが重要な治療標的となり得る。一方、一部の大腸癌では、DUSP4が「がん遺伝子」として機能しているため、DUSP4あるいは下流の分子が治療標的候補となる。今後、DUSP4の発現変動に伴って活性化される細胞内シグナル伝達経路の同定と、癌の悪性形質獲得に関わる分子メカニズムを詳細に解析することにより、大腸癌の新規分子標的治療法が確立されると期待する。

研究成果の概要(英文)：We showed that, in most of colorectal cancers, constitutive activation of MAP kinases due to the downregulation of DUSP4 contributes to their progression. Furthermore, we demonstrated that both proliferation potentials and invasiveness of the cancer cells could be suppressed by abrogation of the hyper-activated MAP kinases using a specific inhibitor. On the other hand, some colorectal cancers retained the activated MAP kinases in spite of their high levels of DUSP4 expression. In these cells, knockdown of DUSP4 using siRNAs resulted in the growth suppression. Our findings suggest that DUSP4 might function as not only a tumor suppressor but also an oncogene in colorectal cancers.

研究分野：医歯薬学

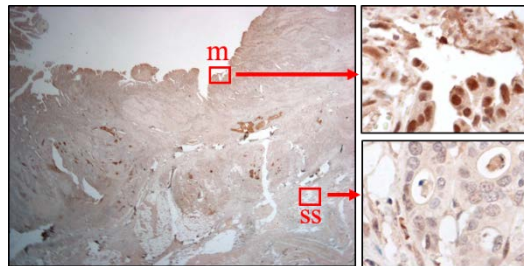
キーワード：大腸癌 DUSP4 MAPキナーゼ阻害 細胞周期

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの大腸癌で、EGF 受容体の過剰発現やその下流分子 K-RAS や B-RAF の活性化型変異による MAP キナーゼシグナル伝達経路の恒常的活性化が認められる。活性化した MAP キナーゼシグナル伝達経路は大腸癌細胞にどのような悪性形質を与えているのか？我々はこれまでに、大腸癌と同様に MAP キナーゼシグナル伝達経路活性化が高頻度に認められる膵癌において、MAP キナーゼを脱リン酸化して不活化する分子 Dual-specific phosphatase 4 (DUSP4) の発現が低下していることを見出した。DUSP4 の発現低下により恒常的に活性化した MAP キナーゼシグナル伝達経路は膵癌細胞に浸潤能亢進をもたらし、膵上皮内癌から浸潤癌への進展に寄与することを明らかにした (Hijiya N et al, Cancer Res. 2016)。

そこで、大腸癌における MAP キナーゼシグナル伝達経路の活性化に DUSP4 が関与しているのかを調べるために大腸癌切除組織を用いて免疫組織化学を施行した。大腸癌の浅部 (右図 m) では DUSP4 が高発現しているのに対して、深部 (右図 ss) では明らかに発現が低下していた。



この知見から我々は、大腸癌においても「DUSP4

の発現低下に伴う MAP キナーゼシグナル伝達経路の活性化によって癌細胞は浸潤能を獲得する」との仮説を得た。

低下が浸潤能・増殖能の亢進をもたらすことを明らかにした (Ichimanda M et al, Cancer Sci. 2017)。

2. 研究の目的

本研究は、大腸癌の深部浸潤における DUSP4 発現低下の機能的意義を明らかにして、大腸癌の新規治療法および早期診断法の確立に寄与することを目的とする。具体的には、以下の2点である。

- (1) 大腸癌切除組織における DUSP4 発現および ERK 活性化の検討
- (2) 大腸癌細胞株を用いた DUSP4 発現低下の機能的意義の解明

3. 研究の方法

- (1) 大腸癌切除組織における DUSP4 発現および ERK 活性化の検討

① 2007 年から 2008 年に大分大学附属病院で大腸切除術が施行された 59 症例について、浅部病変から深部病変まで含む切り出し標本を選び、抗 DUSP4 抗体を用いて免疫組織化学を施行した。間質の線維芽細胞の DUSP4 陽性像を内因性陽性コントロールとして癌細胞の発現強度を評価し、癌の総面積に占める陽性細胞の面積率を加味して、スコア化した。

MAP キナーゼシグナル伝達経路の活性化は、リン酸化 ERK の強度で評価した。ホルマリンに長期間固定した組織ブロックでは免疫組織化学による評価が困難だったため、切除時に癌部の断面から採取した浅部病変と深部病変の組織抽出液を用いて Western blot 法で解析した。

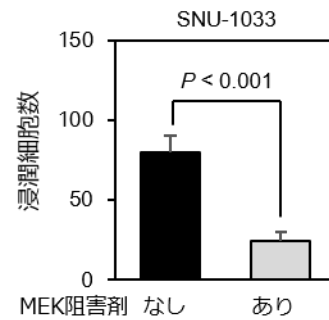
② さらに、1999 年から 2015 年に切除され、粘液癌と診断された 28 症例についても同様に DUSP4 の免疫組織化学を施行した。

- (2) DUSP4 発現変動の機能的意義の解明

① 各種細胞バンクから入手した 8 種類の大腸癌細胞株に加えて、大腸粘膜上皮初代培養

次に、SNU-503 と SNU-1033 に DUSP4 を導入すると、ERK が顕著に脱リン酸化され、それに伴い増殖能および浸潤能は有意に抑制された。しかし、活性型変異 ERK を同時に導入すると、DUSP4 によるこれらの抑制機能はすべてキャンセルされた。以上の結果から、SNU-503 と SNU-1033 では、DUSP4 の発現低下に伴う ERK の活性化が増殖能と浸潤能を亢進させることが分かった。

そこで、活性化した ERK が治療標的となり得るのかを MEK 阻害剤を用いて検証した。SNU-1033 の増殖能と浸潤能（右図）は MEK 阻害剤処理により有意に抑制され、治療有効性が示唆された。



② SNU-C5, HCT116, SNU-C2A において、高発現している DUSP4 の機能を調べるために DUSP4 をノックダウンした。ERK の活性化レベルに変動がみられなかったことから、これらの細胞株では DUSP4 は MAP キナーゼ脱リン酸化酵素以外の機能を担っていることが示唆された。さらに、DUSP4 のノックダウンにより増殖が有意に抑制された。増殖抑制に関わる機序を検討したところ、細胞周期が遅延していることが分かった。これらの知見は、DUSP4 がこれらの細胞株で「がん遺伝子」として機能していることを示唆している。上述の DUSP4 高発現粘液癌における DUSP4 の機能的意義の解明が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ichimanda Michihiro, Hijiya Naoki, Tsukamoto Yoshiyuki, Uchida Tomohisa, Nakada Chisato, Akagi Tomonori, Etoh Tsuyoshi, Iha Hidekatsu, Inomata Masafumi, Takekawa Mutsuhiro, Moriyama Masatsugu	4. 巻 109
2. 論文標題 Downregulation of dual-specificity phosphatase 4 enhances cell proliferation and invasiveness in colorectal carcinomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 250 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13444	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 Nakada C, Hijiya N, Tsukamoto Y, Yano S, Kai T, Uchida T, Kimoto M, Takahashi M, Daa T, Matsuura K, Shin T, Mimata H, Moriyama M.	4. 巻 In press
2. 論文標題 A transgenic mouse expressing miR-210 in proximal tubule cells shows mitochondrial alteration: possible association of miR-210 with a shift in energy metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pathol	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5394	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 Kamei N, Yamada Y, Hijiya N, Takaji R, Kiyonaga M, Hongo N, Ohta M, Hirashita T, Inomata M, Matsumoto S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: relationships between mural nodules detected on thin-section contrast-enhanced MDCT and invasive components.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Abdom Radiol	6. 最初と最後の頁 3139-3147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00261-019-02084-2	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 一万田充洋、泥谷直樹、赤木智徳、白下英史、衛藤剛、猪股雅史、守山正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現分布とその意義
3. 学会等名 第23回癌と遺伝子・大分外科フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michihiro Ichimanda, Naoki Hijiya, Yoshiyuki Tsukamoto, Chisato Nakada, Tsuyoshi Etoh, Hidekatsu Iha, Masafumi Inomata and Masatsugu Moriyama
2. 発表標題 Downregulation of DUSP4 enhances cell proliferation and invasiveness in colorectal carcinomas
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 一万田充洋、泥谷直樹、赤木智徳、白下英史、衛藤剛、猪股雅史、守山正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現変動の意義
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一万田充洋、泥谷直樹、赤木智徳、白下英史、衛藤剛、猪股雅史、守山正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現パターンとバイオマーカーとしての意義
3. 学会等名 第87回大腸癌研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	白下 英史 (Shiroshita Hidefumi) (50596955)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	守山 正胤 (Moriyama Masatsugu) (90239707)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	泥谷 直樹 (Hijiya Naoki) (80305036)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	