

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08737

研究課題名(和文) 大腸癌の進展における基質接着性スイッチ分子としてのCrumbs3の機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of Crumbs3 as the molecular switch of cell-matrix adhesion in colon cancer progression

研究代表者

飯岡 英和 (Iioka, Hidekazu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20425416

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)：Crumbs3は多細胞生物の上皮組織に発現する膜タンパク質であり、実験生物を使用した研究から、上皮組織の正常な発生に必要であることに加え、腫瘍抑制因子として働くことが示されていた。本研究では、ヒトの悪性腫瘍におけるCrumbs3の発現と機能を詳細に解析し、腺癌系の悪性腫瘍組織に強く発現することを明らかにした。さらに大腸癌細胞を用いた研究から、腫瘍抑制因子と考えられていたCrumbs3が、ヒトの悪性腫瘍においては転移を促進することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における国民の死因第一位は「悪性腫瘍」であり、悪性腫瘍の転移は患者の予後を左右する最も大きな要因の一つである。浸潤転移の激しい難治がん、進行がんに対しては未だ有効な手立てが無く、がんの性状解析に基づく新たな治療戦略の提案が求められている。本研究ではこれまでがん抑制因子と考えられてきたCrumbs3というタンパク質に着目し、ヒトの大腸癌サンプルを用いた解析を行った。その結果、Crumbs3が大腸癌の転移を促進すること、および、その制御メカニズムの一端が明らかとなった。今後、Crumbs3とその関連分子を標的とすることで、新たな転移の診断・治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Transmembrane protein Crumbs3 is expressed in the epithelial tissues. Previous reports indicated that Crumbs3 is not only functions as an essential regulator for normal epithelial development but also a tumor suppressor in model organisms. In this study, the details of the expression and function of Crumbs3 in human malignant tumors were analyzed, and we found Crumbs3 is strongly expressed in the adenocarcinomas. Furthermore, we demonstrated that Crumbs3, which is formerly described as a tumor suppressor, promotes metastasis in colon adenocarcinoma cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞極性 浸潤転移 FGFR 大腸癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞極性は個々の細胞の形態や機能に方向性を持たせ器官形成に預かることにより、正常発生や体内恒常性の維持に寄与する。既知の多数の上皮細胞極性制御因子のうち、唯一の細胞貫通タンパク質である Crumbs (Crb) は、上皮細胞の頂部膜にのみ局在し、細胞内ドメインを介してタンパク質複合体を形成することで、正常な上皮組織の構築に必須の役割を果たす。哺乳類における Crb 相同遺伝子の一つである Crb3 は全身の上皮組織に発現し、上皮-間充織転移 (EMT) の誘導因子として知られる Zeb1 や Snai12 によって発現が抑制される事が示されているが、ヒト悪性腫瘍 (癌腫) における生物学的機能は不明である。ショウジョウバエを用いた研究から、Crb は Hippo 経路と協調して機能することで細胞増殖を抑制することが報告されており、ヒトにおいても Crb3 が腫瘍増殖の抑制に機能することが既定の予想であった。

しかし現在まで、実際にヒトの組織・細胞を用いた解析は乏しく、癌の増殖・進展との関連性は明らかではない。このような現状から我々はまず、ヒト Crb3 特異的抗体を新規作成し、生体内情報を得るべく種々の腫瘍組織における発現パターンを解析した。結果、患者腺癌病理組織において、Crb3 は正常管腔上皮組織と腫瘍両者に優位な発現が認められ、腫瘍では分化度や腫瘍内分布の点で、機能的局在としての管腔頂部膜に加え細胞質発現など、これまでの知見から機能が説明できない局在を示すことが判明した。さらに、転移巣・脈管侵襲部の解析においても原発巣に見られた Crb3 の発現維持・局在変化などを解析し情報を得た。病理組織を用いた Crb3 発現解析の我々の結果から、ヒト腺癌の転移・播種巣形成において Crb3 が必ずしも既定の仮説であった“がん抑制的”に機能しない可能性、さらに腺癌における新たな転移機序に関連する可能性が予測された。

そこで、腫瘍細胞における Crb3 発現の意義を解析するため、大腸癌細胞株を用いて CRISPR/Cas9 によるノックアウト (KO) 細胞株を樹立し、野生型との比較を行った。その結果、Crb3 の KO により癌細胞の増殖性は影響されないが、細胞外基質への接着性が低下していることが判明した。さらに免疫不全マウスを用いたゼノグラフトモデルから、Crb3-KO 大腸癌細胞は、野生型と比較し腫瘍形成能が著しく低下していることが判明した。以上の結果から Crb3 は何からのメカニズムを介し、細胞外基質への接着性のスイッチ分子として機能することで、腫瘍の形成を促進すると推察された。

### 2. 研究の目的

分子標的薬やがん免疫療法など悪性腫瘍に対する新規創薬の発達は目覚ましいが、未だ進行がん患者に対する十分な解決的一手とはなり得ていない。即ち、癌根治の原点は浸潤・転移の制御にあり、転移制御の手がかりの探索が現在も腫瘍医学分野で多角的に行われている。われわれは発生学上必須とされている管腔形成における上皮極性機能分子の一つ Crumbs3 (Crb3) が予備研究でヒト腺癌においても優位な発現を維持し、その浸潤・転移動態に密接に関わっている知見を得ている。本申請では Crb3 が腺癌細胞の細胞外基質への接着性を制御することを起点に未知の浸潤・転移の分子機序を明らかにし、腺癌系細胞転移の新規制御基盤を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では Crb3 が腫瘍細胞の細胞外基質への接着性を制御するメカニズムの解明と、大腸癌の進展における意義を明らかにするため、主に以下の6点の解析を行った。

#### 免疫沈降による Crb3 相互作用タンパク質の同定と *in vitro* での確認

Crb3-KO 細胞と同細胞に FLAG タグした Crb3 を安定的に発現させたものを培養し、抗 FLAG タグ抗体磁気ビーズを用いて FLAG-Crb3 の免疫沈降を行い、相互作用するタンパク質を同定した。浸潤転移に関わると考えられる候補分子のうち、線維芽細胞増殖因子 (FGFR) に注目した。

#### 大腸癌細胞における FGFR の発現

大腸癌細胞 DLD-1 及び HT-29 における FGFR1、FGFR4 の発現を RT-PCR およびウェスタンブロットで確認し、Crb3 との相互作用を *in vitro* で確認した。

#### DLD-1 細胞の移動性における FGFR1 の役割

FGFR1 のノックダウン及び Crb3 との共発現による DLD-1 細胞の移動性への影響を確認した。

#### FGF シグナルにおける Crb3 の役割

組換え FGF1 タンパク質を用いた刺激による下流分子 ERK1/2 のリン酸化を指標として、野生型 DLD-1 及び Crb3-KO 細胞の反応性を比較した。

#### 大腸癌転移における Crb3 の役割

免疫不全マウス (NOD-SCID) を用いた脾注肝転移モデルにより、野生型 DLD-1 と Crb3-KO

細胞の転移形成を比較した。

### ヒト大腸がん組織における FGFR1 および Crb3 の発現と局在の解析

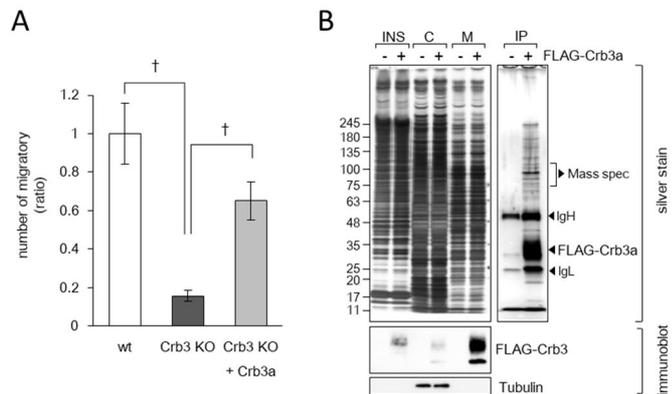
患者由来大腸癌組織切片を用い、免疫組織染色を行うことで FGFR1 と Crb3 の個々の発現と共局在を確認した。

## 4. 研究成果

### 免疫沈降による Crb3 相互作用タンパク質の同定と *in vitro* での確認

Crb3-KO 細胞と同細胞にレンチウイルスベクターを用いて FLAG タグした Crb3 を安定的に発現させた細胞株を作成した。さらにシングルセルクローニングを行い、FLAG-Crb3 の下流でポリシストロニックに発現する GFP の発現が弱いもの数種を選び、野生型および親株の Crb3-KO 細胞と移動性をトランスウェルアッセイにより比較した。その結果、最も移動性を回復した株で野生型細胞の約 60% にまで移動性の回復が見られた (図 A)。完全な回復が見られなかった要因としては、i) 発現量が内在性 Crb3 と比較して高すぎる、又は低すぎる、ii) FLAG-タグが Crb3 の機能にネガティブな影響を与えている、iii) Crb3 遺伝子座からは選択的スプライシングにより Crb3A と Crb3B のアイソフォームが生成するが、今回発現させたのは Crb3A のみであり、Crb3B の機能が欠損しているため、等が考えられた。

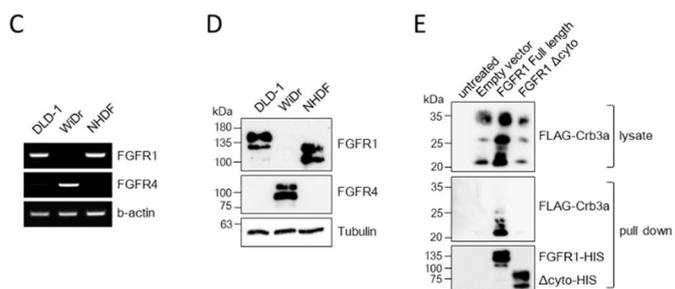
次に免疫沈降のためのサンプル調製の最適条件を検討した。まず復帰発現株を培養し、種々の界面活性剤を複数の濃度で処理した後に固定し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫細胞染色により、染色の有無を観察することにより、可溶化に適した界面活性剤の種類と最低濃度を決定した。また、膜タンパク質である Crb3 を効果的に捕捉するため、可溶化前にジキトニン処理することで細胞質画分を除くための条件検討も行った。復帰発現株と細胞と親株の Crb3-KO 細胞を培養し、決定した条件により膜画分から、それぞれ可溶化抽出液を調製して抗 FLAG 抗体磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った。調製した免疫沈降サンプルを SDS-PAGE および銀染色に供し、分子量 70 - 110 kDa のゲル片に含まれるタンパク質をマスマスペクトル解析により同定した (図 B)。その結果、既知の Crb3 結合タンパク質である MPP5 を含む種々の候補タンパク質が得られたが、過去の報告等を吟味し、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) に注目することとした。



### 大腸癌細胞における FGFR ファミリー遺伝子の発現

ヒト大腸腺癌由来培養細胞を培養した際、高分化型腺癌より単離された HT-29 細胞は球状の細胞形態を呈し、移動性が低いこと、また中~低分化型腺癌より単離された DLD-1 細胞は仮足の発達した線維芽細胞様の形態を示し、移動性が高いことが判明していた。これらの細胞間における FGFR ファミリー遺伝子の発現を

RT-PCR により解析したところ、DLD-1 細胞では FGFR1 の発現が強く FGFR4 は検出不能であったが、HT-29 では逆の結果が得られた (図 C)。ウェスタンブロットによるタンパク質レベルでの解析からも同様の結果が得られた (図 D)。HEK293 細胞にクローン化した FGFR と Crb3 を発現させて、FGFR1 に付加したタグでプルダウンを行い、ウェスタンブロットで解析したところ Crb3 と FGFR1 が共沈することが確認できた。さらに細胞内ドメインを欠いた FGFR1 とは共沈しないことから、Crb3 と FGFR1 は細胞内ドメインを介して相互作用すると考えられた (図 E)。このことから大腸腺癌細胞の移動性に FGFR1 が関与している可能性が考えられた。



### DLD-1 細胞の移動性における FGFR1 の役割

大腸腺癌における FGFR1 の機能を明らかにするため、siRNA を用いて DLD-1 に発現する FGFR1

をノックダウンし (図 F)、トランスウェルアッセイにより移動性をコントロールと比較した。その結果、FGFR1 のノックダウンにより DLD-1 細胞の増殖性に明確な変化は無いものの (図 G)、移動性の顕著な低下が見られた (図 H)。また、*Crb3*-KO 細胞に *Crb3* 及び FGFR1 を共発現させた場合、相加的に移動性の増加が見られたが (図 I) *Crb3* との結合に重要な細胞内ドメインを欠く FGFR1 を発現させた場合、*Crb3* による移動性の増強分も抑制されてしまうことから (図 J)、FGFR1 と *Crb3* が協調性して DLD-1 細胞の移動を促進していることが示唆された。

### FGF シグナルにおける *Crb3* の役割

さらに FGFR と *Crb3* の関連性を調査す

るため、*Crb3* が FGFR1 のシグナル伝達に寄与しているかどうかを下流分子 ERK1/2 のリン酸化を指標として検証した。野生型細胞、*Crb3*-KO 細胞および復帰発現株を 2 群準備し、血清飢餓状態かつ ERK1/2 の上流キナーゼである MEK の阻害剤存在下で 12 時間培養した。その後 1 群は無血清培地に置換、残る 1 群は組換え FGF1 タンパク質を含む無血清培地に置換した。10 分間刺激した後トリクロロ酢酸処理を行い、タンパク質抽出液を調製し、ウェスタンブロットによりリン酸化型 ERK とトータル ERK を解析した。その結果、野生型株に対し *Crb3*-KO 細胞群では ERK1/2 のリン酸化の減弱が認められた。また復帰発現株では *Crb3*-KO 細胞群に対しリン酸化の増強が認められた (図 K)。さらに MEK 阻害剤である U0126 および SL327 は復帰発現株の移動性増強を親株である *Crb3*-KO 細胞程度にまで低下させた (図 L)。以上のことから *Crb3* は FGF シグナルの増強を介して細胞移動を促進すると考えられた。

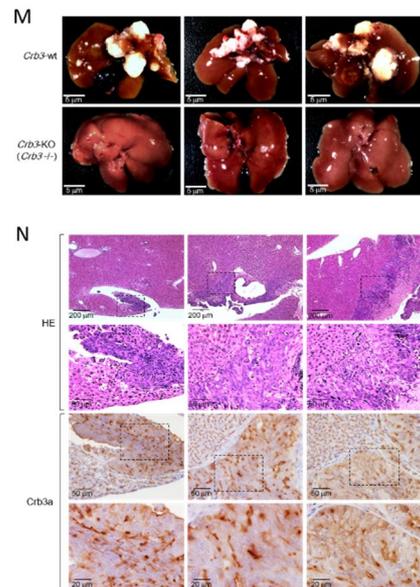
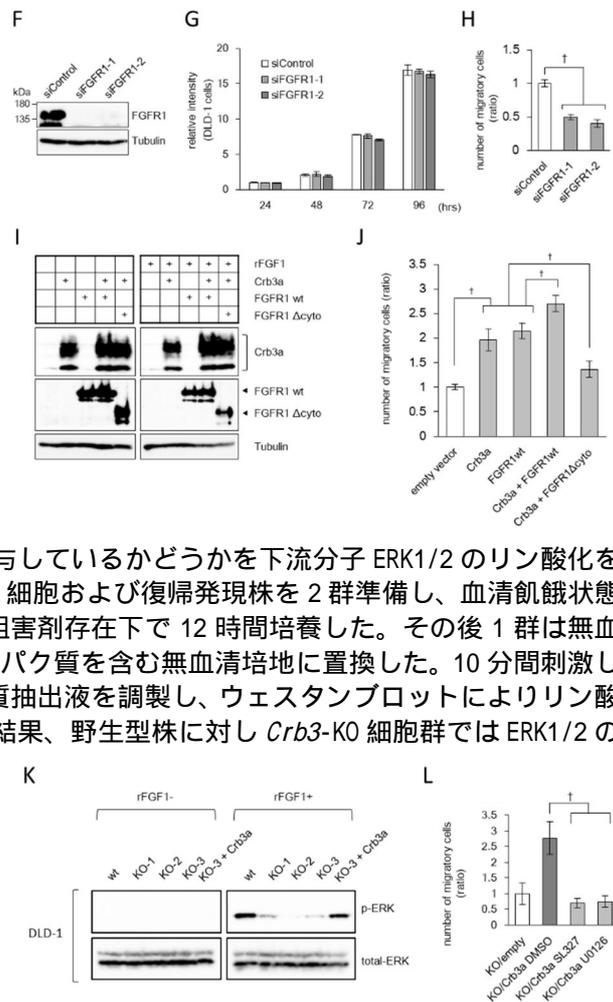
### 大腸癌転移における *Crb3* の役割

免疫不全マウスを用いた脾注肝転移モデルにより、大腸癌転移における *Crb3* の役割を解析した。NOD-SCID マウスの脾臓に野生型 DLD-1 細胞、または *Crb3*-KO 細胞の懸濁液 (100 万細胞/50  $\mu$ m 培地) を注入し最長 2 カ月飼育した。結果として野生型細胞を移植したマウスでは肝門部を中心に例外無く腫瘍の形成が認められた。その一方で *Crb3*-KO 細胞を移植したマウスでは、外観からも切片からも明確な肝臓転移巣の形成は認められなかった (図 M,N)。以上のことから *Crb3* は大腸癌細胞において転移巣の形成を促進する役割を果たすと考えられた。

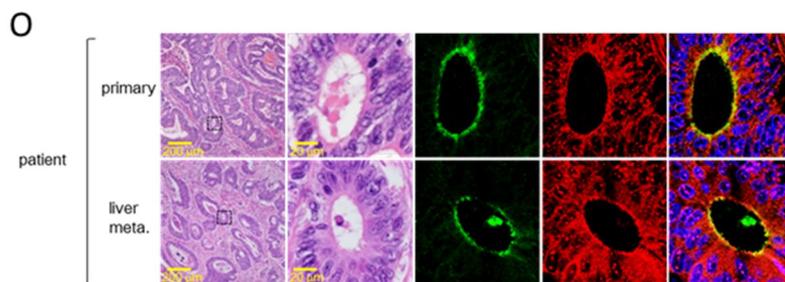
### ヒト大腸がん組織における FGFR1 および *Crb3* の発現と局在の解析

実際の患者悪性腫瘍組織における *Crb3* と FGFR1 の発現を免疫組織染色により解析した。抗 *Crb3* マウスモノク

ナル抗体及び CST 社製抗 FGFR1 ラビットモノクローナル抗体を用い、それぞれ連続切片の単染色と、同一組織での蛍光 2 重染色を行った。結果として *Crb3* 及び、FGFR1 は共に大腸腺癌に発現し、腫瘍管腔頂部膜で共局在することが判明した。また、同一患者由来大腸腺癌原発巣と肝転移巣の染色においても共発現と、腫瘍管腔頂部膜での共局在が認められたことから、*Crb3* および FGFR1 はヒト大腸癌転移の過程に必要な遺伝子であると考えられた (図 O)。以上の結果をま



とめ、英文国際誌に投稿・  
受理された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iioka Hidekazu, Saito Ken, Sakaguchi Masakiyo, Tachibana Taro, Homma Keiichi, Kondo Eisaku	4. 巻 145
2. 論文標題 Crumbs3 is a critical factor that regulates invasion and metastasis of colon adenocarcinoma via the specific interaction with FGFR1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2740 ~ 2753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32336	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 Iioka Hidekazu, Saito Ken, Kondo Eisaku	4. 巻 519
2. 論文標題 Crumbs3 regulates the expression of glycosphingolipids on the plasma membrane to promote colon cancer cell migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 287 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.161	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯岡英和, 齋藤憲, 近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3は糖脂質発現制御を介し、大腸癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯岡英和, 齋藤憲, 近藤英作
2. 発表標題 転移制御分子であるCrumbs3は、糖脂質制御を介し大腸癌細胞の移動を促進する
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidekazu IIOKA, Ken Saito, Eisaku Kondo
2. 発表標題 Crumbs3a promotes colon cancer progression by regulating growth factor receptor activation
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯岡英和, 齋藤憲, 近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3aは受容体型キナーゼを介したリン酸化シグナルを増強し、大腸癌の進展を促進する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯岡英和, 齋藤憲, 森井英一, 近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3aは大腸癌細胞において受容体型キナーゼを介したリン酸化シグナルを増強する
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯岡英和, 齋藤憲, 森井英一, 近藤英作
2. 発表標題 新規転移制御分子Crumbs3の大腸癌における機能解析
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidekazu IIOKA, Ken Saito, Masakiyo Sakaguchi, Eiichi Morii, Eisaku Kondo
2. 発表標題 Crumbs3 promotes colon adenocarcinoma tumorigenesis by regulating cell adhesiveness
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidekazu IIOKA, Ken Saito, Masakiyo Sakaguchi, Eiichi Morii, Eisaku Kondo
2. 発表標題 Crumbs3 promotes metastasis of colon cancer by regulating focal adhesion components
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
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	近藤 英作  (Kondo Eisaku)  (30252951)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	