

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09386

研究課題名(和文) Wntシグナル経路を介したCdh1による大腸癌浸潤・転移の制御

研究課題名(英文) Regulation of invasion and metastasis of colon cancer via Wnt-Cdh1 axis

研究代表者

直江 秀昭 (Naoe, Hideaki)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：30599246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌におけるCdh1の役割を明らかにするために、Cdh1が全身で恒常的に活性化した遺伝子改変マウスを用いて大腸腫瘍形成実験を行った。発癌物質のAOMを腹腔内に投与した後に、炎症誘発物質であるDSSを経口摂取させることで大腸の腫瘍形成を検討した。その結果、Cdh1活性化型マウスでは、コントロールマウスと比較してより多くの大腸腫瘍を形成した。これらの腫瘍を組織学的に検討した結果、Cdh1活性化型マウスでは、大腸上皮の著明な腫瘍性増大を呈していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験では、大腸腫瘍を誘発する刺激を加えることで、Cdh1活性化の有無によって大腸腫瘍発生には違いがあることが明らかとなった。すなわち、大腸でCdh1が活性化している場合は、大腸腫瘍が発生しやすい可能性が示唆された。

この結果は、Cdh1と大腸腫瘍を関連付けるものであり、Cdh1の制御が大腸腫瘍発生の制御にもつながり得ることを示したものである。

研究成果の概要(英文)：To identify the role of Cdh1 in colorectal cancer, we have done colorectal tumor generation experiment using genetically Cdh1 activated mice. After intraperitoneal injection of oncogenic drug AOM, inflammation inducing drug DSS were administered orally to the mice. Four weeks later, the Cdh1 activated mice generated more colorectal polyps than that of control mice. Histological examination showed significant abnormal growth of colorectal epithelium in the Cdh1 activated mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：Cdh1 大腸癌発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、我々が着目している分子 Cdh1 は、細胞周期の主要な調節因子 Anaphase promoting complex (APC)の活性化因子である。ユビキチンリガーゼである APC は Cdh1 と結合することで活性型 APC^{Cdh1} となり、その標的である cyclin B や plk1、geminin 等を分解することで、分裂期中期 ~ G1 期の細胞周期の進行を厳密に調節している。このように Cdh1 研究はこれまで主に、細胞周期における役割を中心に解明されてきた。しかし、近年では、APC^{Cdh1} が細胞老化やアポトーシス、オートファジーなど、細胞周期以外の様々な生命現象においても重要な役割を持っていることが次々と明らかになってきている(Zhou et al. Cell Division. 2016)。

(2) 申請者らは細胞周期調節作用に加えて、Cdh1 が細胞骨格と細胞運動の制御にも関わしているという新たな生理的機能を明らかにした(Naoe et al. Mol Cell Biol. 2010)。この結果から、細胞骨格、細胞運動を制御する Cdh1 が、大腸癌の浸潤・転移にも関わしているのではないかとこの着想を得た。

(3) これまでに申請者らは、消化器癌における Cdh1 の機能解析を行う中で、Cdh1 の抑制により優位に変動する遺伝子候補を 17 個同定した。その中でも変化の大きかった遺伝子群として、Wnt シグナル経路が抽出された。

2. 研究の目的

本研究の目的は下記の検討を通して、大腸癌の浸潤・転移における Cdh1-Wnt axis の役割を明らかにすることである。

- (1) Cdh1 の発現を抑制した大腸癌細胞より抽出したタンパク質で 2 次元電気泳動を行い、蛋白質発現と翻訳後修飾の網羅的解析を通して、Wnt、Cdh1 に関連するタンパク質を絞り込む。
- (2) ノードマウスに Cdh1 抑制大腸癌細胞を接種し、Cdh1 抑制が浸潤転移能を増強させるか減弱させるかを検討する。
- (3) Wnt 阻害剤刺激下大腸癌細胞において、Cdh1 をはじめとした蛋白質発現解析、翻訳後修飾解析を行い、Cdh1 と Wnt の協調作用を確認する。
- (4) Cdh1 自身は分解とリン酸化による制御を受けている。そこで我々が有する Cdh1 のリン酸化部位変異遺伝子改変マウスを用いて、Wnt シグナル経路の変化に焦点をあて、創傷治癒実験(浸潤)や発生段階でダイナミックな細胞の移動(転移 mimic)を示す胎児の解析を行う。
- (5) 転移性ヒト大腸癌切除標本を用いて、大腸癌の原発巣中心部、原発巣辺縁(浸潤部)、転移巣において Wnt、Cdh1 の発現変化を確認する。変化のパターンから、Wnt-Cdh1 axis が大腸癌転移浸潤に果たす役割を明らかにする。
- (6) 大腸癌転移の制御のために Cdh1-Wnt axis を中心とした治療戦略を構築する。

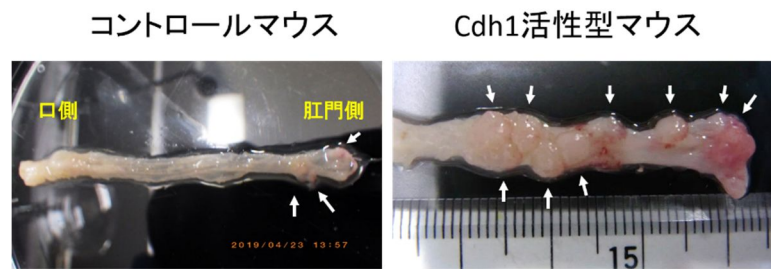
3. 研究の方法

- (1) プロテオミクスを用いたタンパク質発現、翻訳後修飾の網羅的解析
Cdh1 発現を抑制した細胞とコントロール細胞より抽出したタンパク質より、プロテオミクス解析を行うことで、Cdh1 抑制により発現、翻訳後修飾に変化を来したタンパク質を絞り込む。また、同様にして抽出した RNA を用いたゲノム解析、トランスクリプトーム解析で得られた結果と統合することで、Cdh1 の有無により変動する分子群を絞り込む。特に、予備実験で得られた Wnt 経路と Cdh1 の関わりを中心に検討する。
- (2) Cdh1 活性型遺伝子改変マウスを用いた検討
Cdh1 を活性型に変異させた遺伝子改変マウスを用いて、Cdh1 の浸潤・転移能を評価する。創傷治癒の過程では、浸潤・転移と類似した細胞や組織の移動が見られることから、マウス背部に創傷を形成し、治癒過程における Wnt、Cdh1 の挙動を解析する。
また、胎児発生段階でも、癌の浸潤と類似した現象として組織の集団的な移動が見られる。Cdh1 活性型マウスの胎児の各組織を解析することで、Cdh1 発現の違いによる組織移動の特徴を検討する。
- (3) ヒト大腸癌臨床サンプルを用いた検討
実際の大腸癌手術標本を用いて、Wnt シグナル経路への Cdh1 の関与を検討する。Wnt 関連

分子および Cdh1 の発現変化を、パラフィンブロックより切り出した切片の免疫染色、ウエスタンブロットで確認する。これを原発巣中心部 原発巣辺縁部（浸潤） 転移巣についてそれぞれ行うことで、大腸癌の浸潤・転移過程における Wnt-Cdh1 関連経路の変化として捉える。

4 . 研究成果

発癌物質の AOM を腹腔内に投与した後に、炎症誘発物質である DSS を経口摂取させることで大腸の腫瘍形成を検討した。その結果、Cdh1 活性型マウスでは、コントロールマウスと比較してより多くの大腸腫瘍を形成した。これらの腫瘍を組織学的に検討した結果、Cdh1 活性型マウスでは、大腸上皮の著明な腫瘍性増大を呈していた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	渡邊 丈久 (Watanabe Takehisa) (20634843)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	佐々木 裕 (Sasaki Yutaka) (70235282)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・名誉教授 (17401)	
研究分担者	藤元 治朗 (Fujimoto Jiro) (90199373)	兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授 (34519)	