

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390361

研究課題名 (和文)

大腸癌特異的な標的分子 (ガンマ・セクレターゼ作用分子) の同定と臨床応用への展開

研究課題名 (英文)

Identification and clinical application of colon cancer-specific
gamma-secretase-targeting molecules

研究代表者

山口 幸二 (YAMAGUCHI KOUJI)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号：50191226

研究成果の概要 (和文)：

大腸癌および膵癌のタキサン系薬剤に対する感受性をガンマ・セクレターゼ (GS) 複合体が酵素活性依存性および非依存性に制御していることを初めて明らかにした。酵素活性依存性経路は Notch シグナル非依存性である。興味深いことに、GS 複合体は GS 非依存性に細胞周期を制御している可能性が示された。得られた成果は、GS 複合体が大腸癌および膵癌に対する新規の治療標的である可能性を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We showed for the first time that gamma secretase (GS) complexes regulate the response of colon and pancreatic cancer cells to taxanes through GS-dependent and GS-independent mechanisms. GS-dependent pathway is independent of Notch signaling. Interestingly, it was strongly indicated that GS complexes regulate the cell cycle progression of these cells in a GS-independent manner. Data suggest that GS complexes could be a new therapeutic target for overcoming resistance to taxanes in these cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究代表者の専門分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：

大腸癌、膵癌、gamma secretase (GS) 複合体、GS 阻害剤、Taxane、アポトーシス、分子標的治療、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

我々は、「癌は一種の奇形組織であり、発癌および進展に胎生期の臓器機能形成を司る形態形成シグナル系が関与している」という作業仮説のもとに、各種癌における形態形成

シグナル系再活性化を網羅的に解析してきた (Kubo et al. Cancer Res 64:6071-4, 2004; Nakashima et al. Cancer Res 66: 7041-9, 2006; Akiyoshi et al. GUT 55:991-9, 2006 など)。その結果、偶然、gamma secretase (GS)

阻害剤 (GSI) が大腸癌の Taxane 系薬剤によるアポトーシスを増強する可能性を見出した。このことは、GS の代表的な標的である Notch シグナル系の関与を示唆したが、乳癌など Notch シグナルの活性化が示されている癌腫では GSI の本作用は認められなかった。この我々の成果は、この作用が Notch シグナルとは直接関連してはいないかもしれないという興味ある可能性を示した。

2. 研究の目的

大腸癌に対する新規治療戦略の可能性を見出すために、大腸癌の Taxane 系薬剤感受性増強に関与している新たな GS 標的分子を同定することが本研究の主目的である。同時に、GSIによる Taxane 感受性亢進の機序を解析し、GSI の大腸癌以外の癌腫への応用拡大の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞を標的として、DNA マイクロアレイ、各種アポトーシスシグナル阻害剤、などにより Taxane 感受性増強に関与する可能性のあるシグナル系を網羅的に解析する。

(2) GS 複合体構成成分の発現を RNA 干渉法 (siRNA) によりノックダウンする系を用いて、GS 複合体の標的分子を同定する。

(3) 上記結果をもとに、免疫不全マウスへの大腸癌細胞移植系により治療法への応用の可能性を検証する。

(4) 膵癌などの難治性癌を中心に、他の癌腫への応用拡大の可能性を検討する。

4. 研究成果

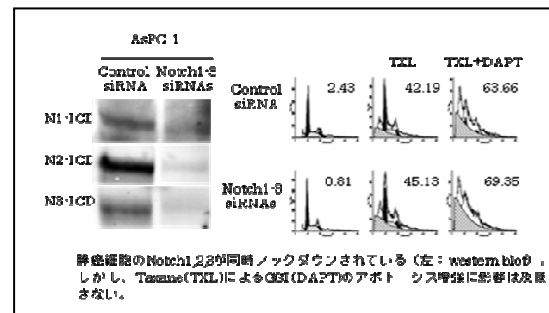
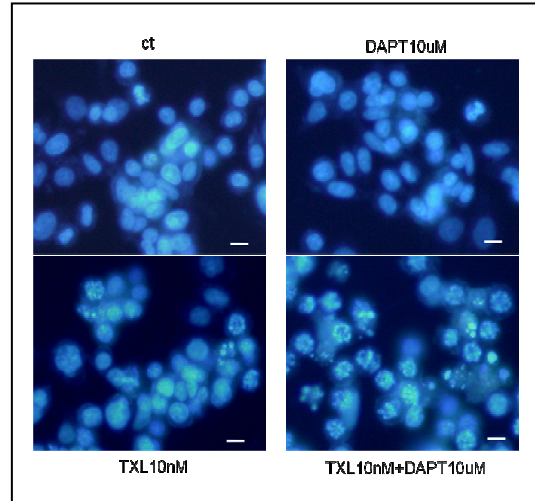
(1) Taxane 感受性増強に関与する可能性のあるシグナル系は GS 経路以外に3つ以上存在する：

DNA マイクロアレイおよび阻害剤を用いた結果から、Taxane に対するアポトーシス抑制経路として、新たに、Hedgehog (Hh) 経路、MAPK 経路および PI3-K 経路の関与が明らかとなった (論文 1, 4, 5; 学会発表 6, 9)。しかし、これら経路の阻害によるアポトーシス増強の作用機序は異なることが示唆された。その結果、計4つの Taxane に対する抗アポトーシス経路 (GS 関連経路、Hh 経路、MAPK 経路、PI3-K 経路) が明らかとなった。

(2) GS 阻害剤 (GSIs) による Taxane 誘導性アポトーシス増強は膵癌においても認められる：

GSIによる Taxane 誘導性アポトーシス増強作用 (右上図) は大腸癌に特性が高いが、膵癌においても認められる。また、作用機序は極めて類似している (論文 2, 6)。共通する作用機序は以下のようなものである。①GS 依存性である。②GSI による本作用は 5-FU, Gemcitabine や cisplatin などでは認められず、抗微小管薬

剤に特異的である。③Notch 非依存性である (右下図)。④細胞周期依存性である (細胞周期を停止させると作用が認められなくなる)。⑤アポトーシス増強は Caspase 非依存性である (汎 Caspase 阻害剤の影響を受けない) などであり、これら個々の特性はさらなる研究課題 (シーズ) となり得る。



(3) GSI (DAPT) は異種移植モデルにおいて Taxane の抗腫瘍効果を増強させる：

大腸癌細胞を免疫不全マウスに移植する系を用いて GSI による Taxane 誘導性アポトーシス増強効果の臨床レベルでの応用の可能性を検討した。DAPT 単独では腫瘍増殖に影響を与えなかった。Taxane (TXL) により腫瘍増殖は軽度抑制されが、DAPT/TXL 併用により増殖は著明に抑制された ($P < 0.01$)。



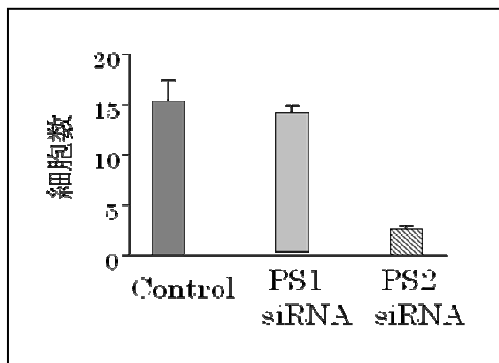
(4) GS 複合体は GS 非依存性に細胞周期を制御している：

①GSI は、細胞周期進行および細胞増殖に影響を与えない。

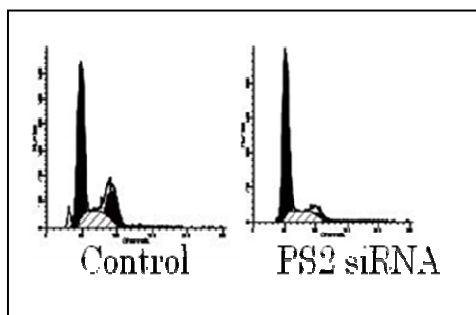
②GS 複合体 Presenilin1 (PS1) のノックダウンは細胞増殖に影響を与えず、Taxane のアポトーシス誘導を増強する。

GS 複合体は、PS, nicastrin, anterior pharynx defective-1 (Aph-1), presenilin enhancer 2 (Pen2) が 1:1:1:1 で構成されている巨大複合体である。PS1 発現を RNA 干渉法により抑制すると GSI 同様、細胞周期進行に影響を与えないが、Taxane によるアポトーシス増強を誘導した。すなわち、PS1 は、細胞周期進行への関与は小さいが、PS1-GS 活性は Taxane に対する感受性制御に関与している。

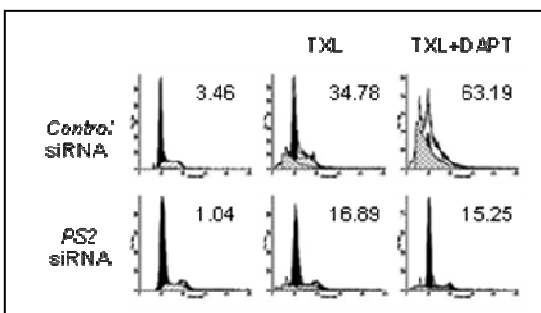
③PS2 発現抑制は細胞周期の進行を抑制する。PS2 を RNA 干渉により抑制すると、細胞増殖は著明に抑制される (下図)。



細胞増殖抑制は、PS2 発現低下に伴う細胞周期進行の抑制であり、細胞周期は G0/G1 期に集積するが (下図)、アポトーシスの誘導は明らかではない。現在詳細な細胞周期解析を行っているが、G0 期での細胞周期停止を示唆する結果を得ている。



④PS2 発現抑制は、Taxane によるアポトーシ



スをほぼ完全に抑制する。

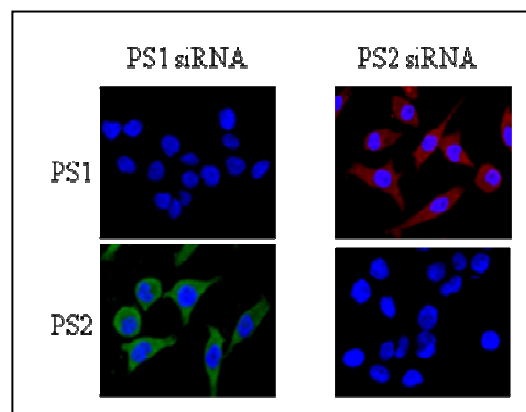
PS2 発現を RNA 干渉にて抑制すると、Taxane および Taxane/DAPT 併用によるアポトーシス誘導は著明に抑制される (前図)。

⑤PS2-GS 活性も Taxane に対する感受性制御に関与している。

PS2 発現を抑制した細胞に Taxane と GSI を併用するとアポトーシスはさらに増強することから、PS2-GS も Taxane によるアポトーシス誘導抑制に働いていることが示唆される。

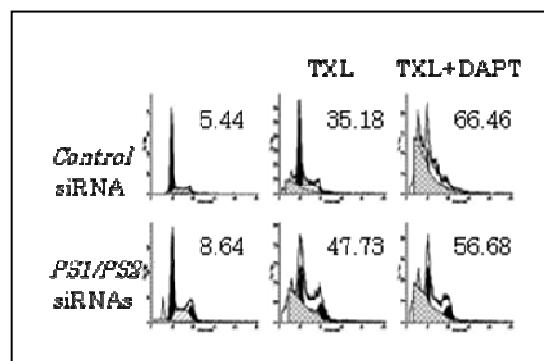
⑥PS1 発現抑制は PS2 発現に影響を与えず、PS2 発現抑制は PS1 発現に影響を及ぼさない。

個々の細胞による PS1 と PS2 発現比率のコントロール機序の詳細は不明だが、PS1 発現が PS2 発現を、PS2 発現が PS1 発現を互いに制御しているという報告がなされている。したがって、RNA および蛋白発現レベルで検証した。個々の PS に対する siRNA による発現抑制は特異的であり、他方の PS 発現に影響を与えなかった (蛍光免疫染色像を下に示す)。



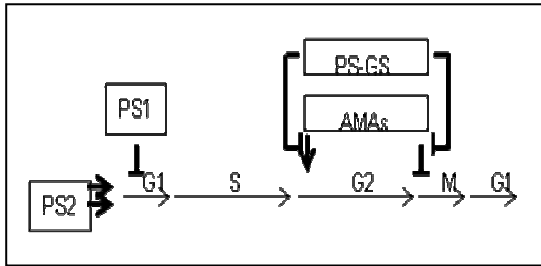
⑦PS1 は、細胞周期進行を軽度抑制している可能性がある。

PS1/PS2 を同時に発現抑制すると、PS2 単独発現抑制に比べ、細胞周期進行は促進し、Taxane によるアポトーシス誘導能は軽度回復する。このことは、PS2 が細胞周期進行を促進させるのとは逆に、PS1 は細胞周期進行を抑制している可能性がある。



⑧ GS 複合体による細胞周期進行および Taxane 感受性制御機序 (仮説)

下図のようなモデルを想定している。



抗微小管薬剤 (AMAs) は G2 期より M 期への移行を促進するとともに、metaphase から anaphase への移行を抑制する。PS-GS は GS 依存性に G2/M 期移行に及ぼす AMAs のこれら効果を抑制している。GSI は PS-GS のこの抑制作用を抑制し、結果として AMAs の作用 (G2/M 期への集積) を増強させる。

一方、PS2 と PS1 は、GS 非依存性に、それぞれ細胞周期促進分子および抑制分子として働いている。

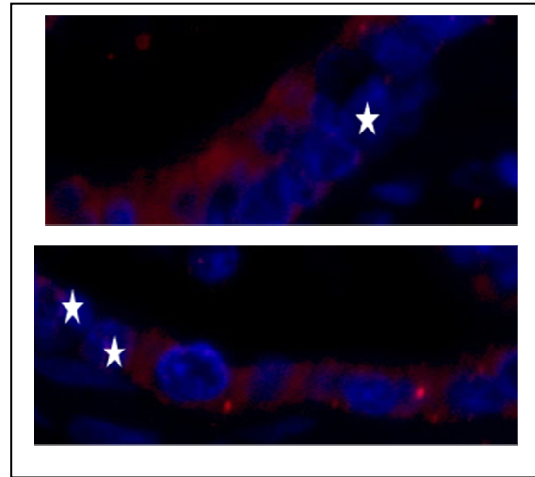
(A) PS2 発現が傷害されていない状態では、PS2 の細胞周期進行促進作用が強力なため、PS1 の細胞周期進行抑制効果は現れにくい。その結果、PS1 の発現抑制は、GSI の AMA 誘導アポトーシス増強にほとんど影響しないようにみえる。

(B) PS2 発現が抑制された場合は、はっきりしなかった PS1 の細胞周期進行抑制効果が形質として現れ、PS2 による細胞周期進行作用の抑制と相まって細胞周期は著明に抑制される。その結果、AMA の作用する細胞周期の細胞数が激減し、AMA によるアポトーシスは反って抑制される。

(C) PS1/PS2 が同時発現抑制された場合は、細胞周期は停止ではなくゆっくりと進行し、AMA によるアポトーシスの程度は PS1 あるいは PS2 が単独で発現抑制された場合の中間となる。

⑨ 大腸癌組織における PS2 欠損大腸癌細胞

手術により切除された大腸癌組織を PS2 抗体にて免疫組織染色。PS2 を発現しない大腸癌組織が認められる (図: ☆印)。数例の検討では、PS2 発現を認めない大腸癌細胞は、全大腸癌細胞の数%以下と予想される。はたして、これら PS2 欠損細胞が G0 期あるいは G1 期の細胞であるか、あるいは Taxane 抵抗性の細胞であるかは今後の重要な課題である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Xu R, Nakano K, Iwasaki H, Kumagai M, Wakabayashi R, Yamasaki A, Suzuki H, Onishi H, Katano M:

Dual blockade of phosphatidylinositol 3' -kinase and mitogen-activated protein kinase pathways overcomes paclitaxel-resistance in colorectal cancer. *Cancer Lett*, in press (査読有)

(2) Tasaka T, Akiyoshi T, Yamaguchi K, Tanaka M, Onishi H, Katano M:

Gamma-secretase complexes regulate the response of human pancreatic ductal adenocarcinoma cells to taxanes. *Anticancer Res* 30:4999-5010, 2010 (査読有)

(3) Chikazawa N, Tanaka H, Tasaka T, Nakamura M, Tanaka M, Onishi H, Katano M:

Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Res* 30:2041-2048, 2010 (査読有)

(4) Yamasaki A, Shoda M, Iijima H, Nagai S, Wada J, Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Kameda C, Tanaka H, Ikebe M, Jo E, Sato N, Nakamura M, Sekine F, Morisaki T, Katano M:

A protein-bound polysaccharide, PSK, enhances tumor suppression induced by docetaxel in a gastric cancer xenograft model. *Anticancer Res* 29:843-850, 2009 (査読有)

(5) Xu R, Sato N, Yanai K, Akiyoshi T, Nagai S, Wada J, Koga K, Mibu R, Nakamura M, Katano M:

Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer Res* 29:261-270, 2009 (査読有)

(6) Akiyoshi T, Nakamura M, Yanai K, Nagai S, Wada J, Koga K, Nakashima H, Sato N, Tanaka M, Katano M: Gamma-secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Gastroenterology* 134:131-144, 2008 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 田坂健彦：膵癌における新たな治療標的分子：Presenilin。第 23 回日本バイオセラピー学会総会、2010 年 12 月 10 日、大阪国際会議場

(2) 近沢信人：Wnt シグナル阻害による大腸癌の抗癌剤耐性克服：siRNA 療法の可能性。第 110 回日本外科学会総会、2010 年 4 月 10 日、名古屋国際会議場

(3) 田坂健彦：膵癌に対する新たな治療戦略：Paclitaxel/g-secretase 阻害剤併用療法の可能性と機序解析。第 110 回日本外科学会総会、2010 年 4 月 9 日、名古屋国際会議場

(4) 田坂健彦：g-secretase 阻害剤の膵がん治療への応用の可能性。第 22 回日本バイオセラピー学会総会、2009 年 11 月 27 日、スイスホテル南海大阪

(5) 近沢信人：Wnt シグナルによる ABC トランスポーター発現制御：大腸がんの薬剤耐性克服への応用。第 22 回日本バイオセラピー学会総会、2009 年 11 月 26 日、スイスホテル南海大阪

(6) 徐 睿：PI (3)キナーゼ経路阻害による大腸癌細胞の Paclitaxel 感受性亢進。第 22 回日本バイオセラピー学会総会、2009 年 11 月 26 日、スイスホテル南海大阪

(7) 田坂健彦：膵癌における新たな治療標的分子：g-secretase。第 109 回日本外科学会総会、2009 年 4 月 4 日、福岡国際会議場

(8) 田坂健彦：g-secretase を標的とした新たな膵癌治療法の開発。第 21 回日本バイオセラピー学会総会、2008 年 11 月 19 日、東京ドームホテル

(9) 徐 睿：MAP, PI (3)経路阻害による大

腸癌 Taxol 感受性亢進。第 21 回日本バイオセラピー学会総会、2008 年 11 月 19 日、東京ドームホテル

(10) 近沢信人：Wnt シグナルを標的とした薬剤抵抗性大腸癌治療法の可能性。第 21 回日本バイオセラピー学会総会、2008 年 11 月 19 日、東京ドームホテル

〔その他〕
ホームページ等
<http://WWW.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>にて開示予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 幸二 (YAMAGUCHI KOUJI)
九州大学・大学院医学研究院・共同研究員
研究者番号：5 0 1 9 1 2 2 6

(2) 研究分担者

片野 光男 (KATANO MITSUO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：1 0 1 4 5 2 0 3

中村 雅史 (NAKAMURA MASAFUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：3 0 3 7 2 7 4 1

森崎 隆 (MORISAKI TAKASHI)
九州大学・大学院医学研究院・共同研究員
研究者番号：9 0 2 9 1 5 1 7

大西 秀哉 (ONISHI HIDEYA)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：3 0 5 5 3 2 7 6
(H21→)

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：2 0 4 2 3 5 2 7
(H20)

小島 雅之 (KOJIMA MASAYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：9 0 3 8 0 3 9 4
(H20→H21)

久保 真 (KUBO MAKOTO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：6 0 4 0 3 9 6 1
(H20→H22.5)

(3) 連携研究者 なし