

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（S）
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21229005
 研究課題名（和文）マウスモデルを用いた消化器癌転移の研究

研究課題名（英文）Studies on Metastasis of Digestive Cancers Using Mouse Models

研究代表者

武藤 誠（TAKETO MAKOTO）
 京都大学大学院医学研究科・教授
 研究者番号：70281714

研究成果の概要（和文）：

癌による死亡の中で消化器癌の占める割合は最も高く、その遠隔転移を抑制することは極めて重要である。今回我々は、身分化骨髄球（iMCs）が CCR1 受容体に依存して大腸癌細胞の肝臓への転移に重要な役割を果たすことを示した。さらに、Notch シグナル伝達が消化器癌の悪性化に重要であり、Aes 遺伝子はそれを阻害することも明らかにした。また、JNK が mTORC1 経路の活性化を介して腫瘍形成を促進することも示すなど、新たな転移制御機構を複数同定することができた。

研究成果の概要（英文）：

Metastasis is responsible for most cancer deaths. Here, we show that immature myeloid cells (iMCs) promote liver metastasis of colon cancer cells. We also found that Notch signaling stimulates colon cancer metastasis, and endogenous metastasis suppressor Aes inhibits the signaling. In addition, we demonstrate that JNK stimulates tumor formation in the intestine by activating mTORC1 signaling. These results should open new horizons in metastasis research and treatment of colon cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	39,300,000	11,790,000	51,090,000
2010年度	40,000,000	12,000,000	52,000,000
2011年度	40,000,000	12,000,000	52,000,000
2012年度	40,000,000	12,000,000	52,000,000
総計	159,300,000	47,790,000	207,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、転移

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに大腸癌の初期病変である腸ポリープの発症モデルとして *Apc*^{Δ716} マウスを作出し、腸ポリープの発生・増大機構の解明に貢献してきた。特に、プロスタグランジン合成の抑制 (*Cell* **87**: 803-809, 1996) や mTORC1 経路の阻害 (*PNAS* **105**: 13544-13549, 2008) によるポリープ増大の抑

制や、転写因子 CDX2 の発現低下による大腸ポリープ発生頻度の亢進 (*Nat. Genet.* **35**: 323-330, 2003) を示した研究は国際的に高い評価を得ている。一方で、我々は大腸癌の浸潤・転移機構の解明にも精力的に取り組んできた。中でも、浸潤性大腸癌のモデルとして作出した *Apc/Smad4* 複合変異マウス (*Cell* **92**: 645-656, 1998) では、癌細胞が産生する

ケモカイン CCL9 によりその受容体 CCR1 を発現する未分化骨髄球 (immature myeloid cells: iMCs) が浸潤先端部に集簇し癌細胞の浸潤が促進されることを明らかにした研究は国内外の注目を集めており (図 1: *Nat. Genet.* **39**: 467 -475, 2007)、乳癌等でも類似の報告が相次いでいる (*Cancer Cell*, 2008)。

2. 研究の目的

癌による死亡の中で消化器癌の占める割合は最も高く、その遠隔転移を抑制することが重要課題となっている。本研究では、我々がこれまでにマウスモデルを駆使して得た知見 (前述) を更に発展させることで 大腸癌の転移を抑制するための新たな治療標的を見出すこと を目標とし、以下の研究を推進する。

1. 大腸癌細胞の転移を水先案内する未分化骨髄球の研究
2. 癌細胞の転移を制御する Aes と Notch シグナルの機構解明
3. 大腸癌の転移における、発癌初期シグナルや分子の評価

3. 研究の方法

1. 未分化骨髄球 (immature myeloid cells : iMCs、図 1) による転移促進機構の解析

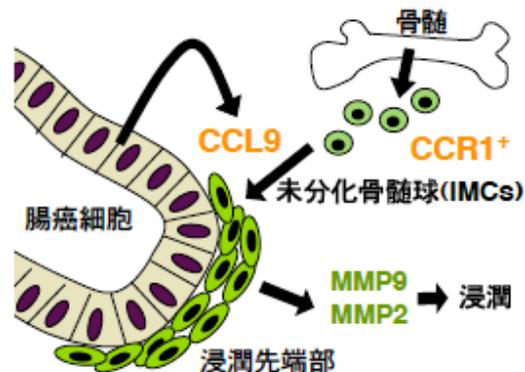


図1 iMCsは腸癌の浸潤を促進する

- A) 大腸癌浸潤の水先案内をする iMCs の本体およびその転移促進機構をマウスモデルを用いて解明する。
- B) ヒト大腸癌の転移における iMC の役割を明らかにする。
2. *Aes*/Notch による転移制御機構の解明
 - A) *Aes* の浸潤・転移抑制機能を、腸腫瘍モデルマウスを用いて個体レベルで検討する。
 - B) 大腸癌以外の癌の転移における *Aes* の役割を検討する。
 - C) *Aes* の発現抑制機構を解析し、*Aes* の発現低下とヒト大腸癌患者の予後の相関を検討する。
3. 大腸癌進展の早期で重要なシグナル経路や分子が癌の転移の増大に果たす役

割の解明

(A) Wnt シグナル経路による mTORC1 活性化の機序を解明する。また、転移巣拡大に対する Rapamycin 誘導体 RAD001 の影響を調べる。
 (B) 大腸癌転移巣における CDX2、p27 の発現と染色体不安定性の指標である分裂後染色体異常像の頻度 (Anaphase bridge index: ABI) との相関について解析する。

4. 研究成果

本研究の特色は、我々が独自に見出した新たな知見に基づいてこれまでに報告のない転移制御機構を解明しようとしている点にある。また、本研究では臨床病状を技術的に可能な限り正確に反映したマウスモデルを用いることで転移の治療に直結しうる研究計画を立てている点も大きな特色の一つである。本研究によって従来の視点では見出せなかった新たな転移制御機構が複数同定され、消化器癌の転移を抑制するための治療戦略を提示することができた。本課題の研究成果を、上記 1 から 3 までの課題別に列記する。

1. 未分化骨髄球 (iMCs) による転移促進機構の解析

A) 大腸癌浸潤の水先案内をする iMCs の本体およびその転移促進機構をマウスモデルを用いて解明する。

我々は最近、前述の iMCs が大腸癌の浸潤のみならずその転移をも促進することを見出した。*Apc/Smad4* 複合変異マウスの腸癌細胞と同様に CCL9 を高発現するマウス大腸癌細胞株を同系マウスの脾臓に移植し肝播種を生じさせたところ、癌細胞の周囲に多数の iMCs が集簇して転移増殖すること、癌細胞の CCL9 発現や宿主側の CCL9 受容体 (CCR1) の発現を抑制すると iMCs の集簇が阻害され、転移巣の拡大も顕著に抑制されることが分かった。

そこで、CCR1 を指標にした iMCs の本体解明を試みた。CCR1 を用いた FACS での選取のために複数の市販 CCR1 抗体を調べたが、組織染色に使っても FACS では使用できなかった。更に論文で報告のある抗体を著者から分与してもらい選取を試みたが、使用に堪えるものではないことが判明した。従って直接 CCR1 抗体で選取する方法から戦術転換し、*CCR1* プロモーターによって蛍光タンパク Venus の発現を行うレポーターマウスを作成した。このマウスの肝臓に大腸がん細胞の転移巣を形成させたところ、転移巣周囲に Venus 陽性細胞が集積することが確認できた。転移巣を構成する骨髄球系の細胞は 4 つの集団; 顆粒球、単球、好酸球および Fibrocytes に分類でき、顆粒球の一部が CCR1 を発現していることも分かった。さらに、CCR1 陽性細胞を含む顆粒球細胞が播種 1 日後で最も早く集積し、その後、残りの

細胞集団が増加することも分かった。CCR1欠損マウスでは、顆粒球細胞の集積が野生型マウスと比べ減少していたことから、CCR1陽性細胞を含む顆粒球細胞が転移巣の形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

B) ヒト大腸癌の転移におけるiMCの役割を明らかにする

マウス大腸癌細胞の同種移植とヒト大腸癌細胞のヌードマウスへの移植で評価した。癌細胞をマウスの脾臓へ注入して肝臓へ播種させると、癌細胞の転移増殖に先立って大量のiMCsの集簇が見られた。この転移増殖にはCCR1受容体が必須であり、宿主マウスにCCR1ノックアウトマウスを用いるとiMCsの集簇は起こらず、転移増殖も起きない。一方、MMP9やMMP2のノックアウトマウスを宿主に用いるとiMCsが集簇するにも拘らず転移増殖は起きず、これらプロテアーゼの関与を証明している。更に、CCR1阻害薬であるBL5923を宿主に投与すると肝臓での転移増殖が効果的に抑制され、大腸癌の転移予防と治療への可能性を示唆した。今後の臨床開発が期待される。さらに、ヒト大腸癌の解析から、我々はマウスCCL9のヒトの機能ホモログがCCL15である事を確立した。

以上の結果は2010年のPNAS誌に掲載した。この結果は主要全国紙にも取り上げられた。

2. Aes/Notch による転移制御機構の解明

A) Aesの浸潤・転移抑制機能を、腸腫瘍モデルマウスを用いて個体レベルで検討する。

我々は、Apc変異マウスの腸上皮特異的にAesノックアウトを導入すると、Notchシグナルが活性化され、その結果、腸腺腫の局所浸潤や血管内侵入が誘発されることを示した

(図2)。この成果を2011年のCancer Cell誌に発表した反響は大きく、Science誌の論説でも紹介され、また、Faculty of 1,000にも選定された。また、Apc/Smad4複合変異マウスと腸上皮特異的Aesノックアウトマウスとの交配を行ったところ、局所浸潤の深達度がより深くなっていたことから、iMCsが促す局所浸潤がNotchシグナル活性化によって更に促進されることが分かった。

B) 大腸癌以外の癌の転移におけるAesの役割を検討する。

転移能の異なる三種の前立腺癌細胞株でのAesの発現を調べたところ、転移能とAesの発現には逆相関が見られ、大腸癌のみならず

前立腺癌においてもAesが悪性化進展を抑制している可能性が示唆された。

C) Aesの発現抑制機構を解析し、Aesの発現低下とヒト大腸癌患者の予後の相関を検討する。

ヒト大腸癌原発巣におけるAesタンパクの発現の有無を免疫組織染色によって調べ、種々の病理学的因子との相関を検討した結果、Aesタンパクの発現低下と血管内侵入、遠隔転移、悪性度と有意に相関することが分かった。このAes発現低下の機序を検討するために、まず培養大腸癌細胞におけるAesのコード領域のゲノムDNA配列を解析したが、突然変異は見出されなかった。このことから大腸癌でAesの発現が低下するのは変異以外のエピジェネティックな機序によることが示唆されたが、ヒストン脱アセチル化阻害剤処理を行なった培養大腸癌細胞において、Aes mRNAの発現低下を認めた。タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドはこの減少に影響を及ぼさないので、タンパクの新規合成を介さないAes発現制御様式が示唆された。この結果はヒストンアセチル化・脱アセチル化によるAes発現制御機序の存在を示唆しており興味深い。

3. 大腸癌進展の早期で重要なシグナル経路や分子が癌の転移の増大に果たす役割の解明

(A) Wntシグナル経路によるmTORC1活性化の機序を解明する。また、転移巣拡大に対するRapamycin誘導体RAD001の影響を調べる。

マウス大腸癌細胞株を用いた肝転移巣におけるmTORC1経路の活性化状態を検討したところ、転移巣を形成する癌細胞の一部でmTORC1経路の活性化が確認できた。そのためmTORC1阻害薬を用いて転移巣の形成に対する影響を検討したが、プラセボ投与群と比較して有意な効果が認められなかった。初期の腸管腫瘍(原発巣)形成にはmTORC1経路の活性化が必要である事を既に見出しているが、今回用いた肝転移巣におけるmTORC1経路は原発巣と異なる役割を果たしていると推測される。

さらに我々は、原発巣において、JNK(c-Jun N-terminal Kinase)が直接mTORC1の構成成分の一つであるRaptorをリン酸化しmTORC1を活性化させることを発見した。腸内細菌や炎症、腸管のぜん動運動に伴うストレスにより

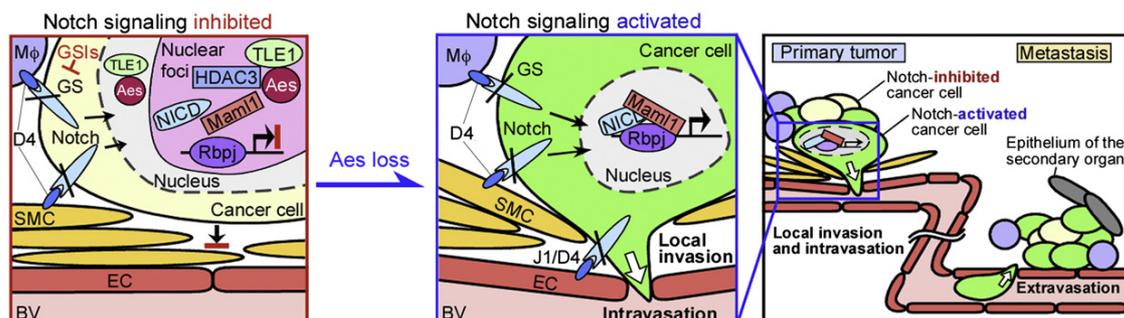


図2. AesはNotchシグナルを阻害することで大腸癌の転移を抑制する

JNKが活性化し、その結果mTORC1経路を刺激していると考えられる。またこのJNK/mTORC1経路の活性化は、腫瘍形成に関わるサイクリン等のタンパク発現を調節し、ポリープの拡大に寄与していた。この研究成果は高く評価され、Gastroenterology誌の表紙を飾った (Fujishita et al. *Gastroenterology* 2011)。

(B) CDX2による大腸癌細胞の生存抑制機構の解析

我々はまず、大腸癌抑制遺伝子 CDX2 が、大腸癌細胞の増殖と生存を抑制することを見出した。CDX2 は細胞周期抑制因子 p27 蛋白質を安定化することにより細胞周期の G1 期から S 期への以降を抑制した (Aoki et al. *Cancer Res* 2011)。ヒト大腸癌組織においても CDX2 と p27 タンパク質の発現量には、正の相関があることが分かった。また、CDX2 は転写に依存しない機能を介して大腸癌細胞の細胞周期や生存を抑制することが分かった。そこで、CDX2 に結合する因子を質量分析法により解析した。その結果、オートファジー必須酵素の ATG7 に CDX2 が相互作用することを見出した。近年、オートファジーは癌細胞の生存に必要な役割を担うことが分かってきており、大変興味深い。

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 15 件、代表的なもののみを記載)

Taketo MM. (2012). Roles of stromal microenvironment in colon cancer progression. *J Biolchem.*

Sugai M, Aoki K, Osato M, Nambu Y, Ito K, Taketo MM, Shimizu A. (2011). Runx3 is required for full activation of regulatory T cells to prevent colitis-associated tumor formation. *J Immunol* 186, 6515-6520.

Fujishita T, Aoki M, and Taketo MM. (2011) JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through mTOR complex1 activation in *Apc*⁷¹⁶ mice. *Gastroenterology* 140: in press (May 2011 issue: *Cover Article*)

Taketo MM. (2011) Reflections on the spread of metastasis to cancer prevention. *Cancer Prev. Res.* 4: 324-328. (*Invited Review*)

Kawada K and Taketo MM. (2011) Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression. *Cancer Res.* 71: 1214-1218. (*Invited Review*)

Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, Hashida H, Takabayashi A, Sasaki M, Robine S, Itoh K, Yoshioka K, Kakizaki F, Kitamura K, Oshima M, and Taketo MM.

(2011) Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell* 19: 125-137. (*Featured Article: Faculty of 1000 paper*)

Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, and Taketo MM. (2011) Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27^{Kip1}. *Cancer Res.* 71: 593-602.

Kakizaki F, Aoki K, Miyoshi H, Carrasco N, Aoki M and Taketo MM. (2010) CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of Solute Carrier Family 5, Member 8 in the Colonic Epithelium. *Gastroenterology* 138: 627-635.

Deguchi A, Miyoshi H, Kojima Y, Okawa K, Aoki M, and Taketo MM. (2010) LKB1 suppresses p21-activated kinase-1 (PAK1) by phosphorylation of Thr109 in the p21-binding domain. *J. Biol. Chem.* 285: 18283-18290.

Kitamura T, Fujishita T, Loetscher P, Revesz L, Hashida H, Kizaka-Kondoh S, Aoki M, and Taketo MM. (2010) Inactivation of CCR1 suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13063-13068.

Arimura S, Matsunaga A, Kitamura T, Aoki K, Aoki M, Taketo MM. (2009). Reduced Level of Smoothed Suppresses Intestinal Tumorigenesis by Down-Regulation of Wnt Signaling. *Gastroenterology* 137: 629-638, (*Cover Article*).

Miyoshi H, Deguchi A, Nakau M, Kojima Y, Mori A, Oshima M, Aoki M, Taketo MM. (2009) Hepatocellular carcinoma development induced by conditional beta-catenin activation in Lkb1+/- mice. *Cancer Sci.* 100: 2046-53.

Fujishita T, Aoki M, Taketo MM. (2009) The role of mTORC1 pathway in intestinal tumorigenesis. *Cell Cycle* 8: 3684-3687.

Taketo MM. (2009) Role of bone marrow-derived cells in colon cancer:

lessons from mouse model studies. J Gastroenterol., 44:93-102. (*Invited Review*)

Taketo MM, Edelmann W. (2009) Mouse models of colon cancer. Gastroenterology 136: 780-98. (*Invited Review*)

[学会発表] (計 12 件、代表的なもののみ記載)

9.1-3 (2012) 国際がん転移学会 (オーストラリア、ブリスベン) Colon cancer microenvironment that helps invasion and metastasis: studies using mouse models. 武藤 誠 (招待講演)

7.26-28 (2012) がん免疫学会 (札幌市) Role of bone marrow-derived CCR1+ Cells in colon cancer invasion and metastasis. 武藤 誠 (招待講演)

7.7 (2012) Japan Gast Study Group Meeting (札幌市) 大腸がんのマウスモデル 武藤 誠 (招待講演)

9.19-21 (2012) 日本癌学会 (札幌市) Metastasis suppressor gene Aes/Aes is an endogenous Notch signal inhibitor. 武藤 誠 (口頭)

1.16 (2012) Infection, Immunity and Cancer (京都大学) Novel molecular mechanisms that stimulate colon cancer invasion and metastasis. 武藤 誠 (招待講演)

10.6 (2011) The Notch Meeting V (Athens, Greece) Colon cancer metastasis suppressor Aes inhibits Notch signaling. 武藤 誠 (招待講演)

12.7-9 (2010) 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) 大会長企画シンポジウム 3PS12 Biology of cancer “New mechanisms of colon cancer metastasis” 武藤 誠 (英語セッション)

12.7-9 (2010) 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) ワークショップ 3W11 Notchシグナル: 疾患解明を目指して “Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling” 園下 将大 (英語セッション)

9.22-24 (2010) 第69回 日本癌学会・学術総会 (大阪) JCA-AACR Joint Symposium

“Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling”

武藤 誠 (英語セッション)

(ポスター発表)

12.8 (2010) 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through mTORC1 pathway activation in *Apc*^{Δ716} mice” 藤下 晃章

11.8-9 (2010) Notch研究会 (千葉) “Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling” 園下 将大

9-22 (2010) 第69回 日本癌学会・学術総会 (大阪)

“JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through mTOR complex 1 activation in *Apc*^{Δ716} mice” 藤下 晃章

[その他]

ホームページ等

[http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/frameTOP\(J\).htm](http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/frameTOP(J).htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 誠 (TAKETO MAKOTO)
京都大学大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70281714

(2) 研究分担者

青木 正博 (AOKI MASAHIRO) (-2010年11月)
京都大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60362464

北村 剛規 (KITAMURA TAKANORI) (-2010年3月)

京都大学大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10378622

園下 将大 (SONOSHITA MASAHIRO)
京都大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 80511857

青木 耕史 (AOKI KOJI) (2010年4月-2011年12月)

京都大学大学院医学研究科・助教
研究者番号: 40402862

藤下 晃章 (FUJISHITA TERUAKI) (2011年4月-)

京都大学大学院医学研究科・助教
研究者番号: 50511870