

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501276

研究課題名(和文)大腸癌進展に関与する新規遺伝子の機能解析および臨床応用への試み

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel gene involved in the progression of colorectal cancers

研究代表者

長山 聡(nagayama, satoshi)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：70362499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、AFAP1L1が大腸癌進展に関与しているか検討すること、大腸癌進展における機能を解析すること、また分子標的治療ターゲットとしての可能性を探ることを目的とした。細胞株を利用した実験および臨床検体(手術切除標本)を用いた検証から、AFAP1L1は治療切除術後の再発リスク予測に有効であり、また分子標的治療ターゲットの候補となる可能性がある。AFAP1L1は大腸癌細胞の遊走能やin vivo増殖能亢進によって癌進展に寄与し、またこれにはvinculinとの相互作用が関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a marked elevation of AFAP1L1 gene expression in colorectal cancer (CRC) tissues as compared to the adjacent normal mucosa. Multivariate analysis revealed that AFAP1L1 was an independent and significant factor for the recurrence of rectal cancers. AFAP1L1-transduced CRC cells exhibited a rounded shape, increased cell motility on planar substrates, and resistance to anoikis in vitro. AFAP1L1 was identified as a novel associating partner of vinculin by immunoprecipitation assay. The local administration of a siRNA against AFAP1L1 significantly suppressed the in vivo tumor growth of xenografts, suggesting that AFAP1L1 might be a candidate therapeutic target for CRCs. These results suggest that AFAP1L1 plays a role in the progression of CRCs by modulating cell shape and motility and by inhibiting anoikis, presumably through interactions with vinculin-including protein complexes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：大腸癌 浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

申請者のグループはそれまでに、軟部組織発生悪性腫瘍(軟部肉腫)47症例の網羅的遺伝子発現プロファイリングを23,040遺伝子のcDNAマイクロアレイにより行った(Nagayama et al, *Cancer Res*, 62: 5859-66, 2002)。その結果、fibroblast growth factor (FGF) シグナル伝達系や frizzled homologue 10 (FZD10)が軟部肉腫の進展に関与し、分子標的治療の候補にもなりうることを見出した(Ishibe et al, *Clin Cancer Res*, 11:2702-2712, 2005, Nagayama et al, *Oncogene* 24: 6201-6212, 2005, Fukukawa et al, *Cancer Sci* 99: 432-440, 2008)。平成17年度~18年度若手研究Bおよび平成20年度~22年度基盤研究Cにおいて、FZD10は軟部肉腫に限らず、大腸癌の進展にもかかわっている可能性を示し、また、大腸癌肝転移治療に対する分子標的治療のターゲットになりうることを提唱した(Nagayama et al, *Cancer Sci* 100: 405-412, 2009)。マイクロアレイデータの解析をさらに進めて、軟部肉腫の遠隔転移に関与する遺伝子群を抽出し、最も関連性の強かった新規遺伝子 C7059 に注目した。機能未知であったため、クローニングの後に軟部肉腫細胞株を用いた *in vitro* 実験にて機能解析を進めたところ、細胞増殖には関与していなかったが、C7059 遺伝子は細胞浸潤を促進し (Matrix invasion assay) 足場非依存性に腫瘍形成能を有し (soft agar colony formation) さらにマウスでの *in vivo* 実験では C7059 高発現軟部肉腫細胞株由来の皮下 Xenograft が有意に速く増大することを示してきた(Furu et al, 日本癌学会、名古屋、2008)。また、前立腺癌においては限局例よりも有転移例で C7059 遺伝子の発現亢進がみられ、病期が進むにしたがい発現陽性率が高くなる傾向を認めた(Kajita et al, 日本泌尿器科学会総会、岡山、2009)。このように、C7059 遺伝子は軟部肉腫のみならず、他の悪性腫瘍においても癌進展に何らかの関与をしている可能性が示唆された。そこで、大腸癌組織における C7059 遺伝子の発現状況を定量的 RT-PCR で検討したところ、15 症例中 9 症例で正常大腸粘膜よりも癌組織において発現が 4 倍以上亢進していた。また、C7059 蛋白に対する特異的ポリクローナル抗体を作成し、大腸癌切除標本を用いて免疫組織化学的染色で C7059 遺伝子の発現を検討したところ、近接する正常粘膜では発現は認められず、癌部での発現亢進が確認された。

## 2. 研究の目的

以上の予備実験から、大腸癌の進展においても C7059 遺伝子が関与していることが予想されたため、さらに多くの大腸癌切除標本を用いて、C7059 遺伝子の発現様式ならびに臨床病理学的因子との相関を検討する意義があると考えられた。また、細胞株を用いた

実験にて大腸癌進展における C7059 遺伝子の果たす役割を明らかにすることが癌進展の機序を理解する一助となり、さらには大腸癌治療の開発に結びつく可能性があると思われる。そこで、本研究は、C7059 が上皮癌である大腸癌進展にも関与しているか検討すること、大腸癌進展における機能を解析すること、また分子標的治療ターゲットとしての可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) C7059 遺伝子の発現が大腸正常粘膜と癌細胞において発現様式が異なるかどうかを観察する。正常粘膜では C7059 遺伝子の発現が殆どなく、癌細胞にて発現が亢進しているのであれば、少なくとも癌化の過程において何らかの発現制御異常が生じていることが予想される。軟部肉腫細胞で観察されたように、C7059 遺伝子が細胞浸潤能に関与していると仮定すれば、癌浸潤最深部と表層部とでは発現状況が異なる可能性があり、癌組織内での発現分布の違いも合わせて検討する。臨床病理学的因子と C7059 遺伝子発現様式との相関を検討し、C7059 遺伝子発現が再発予測因子あるいは予後予測因子として有用であるかどうかを解析する。さらには、大腸癌進行度 Stage2 あるいは Stage3 の再発高リスク群の選出に、C7059 遺伝子の発現状況が利用できないかどうかを検討する。これらの検討のために、大腸癌切除標本における C7059 発現を定量的 RT-PCR、免疫組織化学的染色で検討し、臨床病理学的因子との関連を統計解析した。

2) C7059 遺伝子はアクチン結合ドメインを持つと類推されることから、細胞骨格や細胞運動に関与していることが予想される。腫瘍細胞における一つの仮説は、C7059 遺伝子の発現異常により細胞骨格や細胞運動に異常が生じ癌化を来すあるいは悪性度が増す、ということである。C7059 遺伝子の発現を亢進させることにより、どのような形態変化あるいは機能変化を来すかを検討する。すなわち、C7059 発現陰性癌細胞株に C7059 遺伝子を導入し過剰発現させること、また、C7059 高発現癌細胞株で siRNA を用いて発現抑制することでそれぞれの表現型の変化を解析する。これらの解析のために、大腸癌細胞株 RK0, SW480 に対して強制発現安定株、同 LoVo の発現抑制安定株を樹立し、*in vitro* での表現型変化を評価した。マウス皮下異種移植、および形成した腫瘍に対して siRNA 局所投与による発現抑制実験を行った。

3) 細胞免疫染色によって一過性強制発現 C7059 の細胞内局在を共焦点顕微鏡で評価した。

4) 免疫沈降で C7059 と共沈するタンパクを同定した。

## 4. 研究成果

1) mRNA、タンパク両レベルで癌部での C7059

発現亢進を認め、隣接正常粘膜ではほとんど発現がなかった。多変量解析で、C7059 強発現は直腸癌治療切除術後の再発リスクに関する独立して有意な因子であった。またリンパ節転移、脈管浸潤の有無という病理学的因子と組み合わせることで、より正確に再発予測が可能であった。

2) C7059 強制発現、発現抑制によって細胞の *in vitro* 増殖能は変化しなかったが、マウス皮下異種移植では細胞株 3 種すべてで C7059 発現と腫瘍増殖能に正の相関を認めた。C7059 導入 RKO で形成した皮下腫瘍に siRNA 局所投与して C7059 発現を抑制すると、腫瘍増殖速度が抑制された。*In vitro* では、C7059 導入 RKO 細胞は平坦あるいは紡錘形から円形に形態変化をきたした。Time-lapse 観察で、円形細胞は培養皿上の遊走能が亢進していた。円形の C7059 導入細胞に対して siRNA で C7059 発現を抑制すると平坦・紡錘形に戻り、C7059 が細胞形態を制御することが示された。C7059 抑制 LoVo においても、円形細胞が減少する傾向を認めた。

3) C7059 は一部の細胞株で浸潤仮足形成を誘導し、同構造に局在することが知られているが、詳細な観察の結果、C7059 は浸潤仮足のうち、アクチン主体のコア部分を取り巻くリング状構造に局在していた。

4) Vinculin ノックアウト細胞は円形形態を呈し、2 次元遊走能が亢進、またアノキスが阻害される。C7059 導入細胞の表現型はこれと類似しており、また vinculin も浸潤仮足リング状構造に局在することから、この 2 因子が相互作用する可能性を疑って免疫沈降実験を行ったところ、強制発現系および内在性タンパク同士双方においてこれらの共沈を認めた。さらに C7059 導入 RKO の浮遊培養においてアノキス阻害を認め、C7059 が vinculin の機能に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。

#### 【結論】

C7059 は治療切除術後の再発リスク予測に有効であり、また分子標的治療ターゲットの候補となる可能性がある。C7059 は大腸癌細胞の遊走能や *in vivo* 増殖能亢進によって癌進展に寄与し、またこれには vinculin との相互作用が関与している可能性がある。

#### 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 1 件)

AFAP1L1, a novel associating partner with vinculin, modulates cellular morphology and motility, and promotes the progression of colorectal cancers.

Ryo Takahashi, Satoshi Nagayama, Moritoshi Furu, Yoichiro Kajita, Tomohisa Kato, Seiya Imoto, Yoshiharu Sakai and

Junya Toguchida  
Cancer Medicine 2014 in press

#### 〔学会発表〕(計 3 件)

2013 年 10 月 第 72 回日本癌学会(英語口演)  
細胞骨格関連タンパク C7059 は細胞遊走能を制御して大腸癌進展に關与する

長山 聡、高橋亮、井元清哉、布留守敏、梶田洋一郎、片桐豊雅、中村祐輔、坂井義治、戸口田淳也

2013 年 7 月 第 68 回日本消化器外科学会  
細胞骨格関連タンパク C7059 は細胞形態、遊走能および浸潤仮足形成を制御し、大腸癌進展に關与する

高橋亮、長山 聡、布留守敏、梶田洋一郎、大越香江、山田理大、河田健二、長谷川傑、戸口田淳也、坂井義浩

2013 年 4 月 第 113 回日本外科学会  
アクチン骨格関連タンパク C7059 は細胞遊走能および浸潤仮足 (invadopodia) 形成を制御し、大腸癌進展に關与する

高橋 亮、長山 聡、布留守敏、梶田 洋一郎、村上 哲平、加藤 滋、久森 重夫、山田 理大、大越 香江、角田 茂、田中 英治、河田 健二、小濱 和貴、長谷川 傑、岡部 寛、戸口田 淳也、坂井 義治

#### 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長山 聡 (有明病院消化器外科・医長)  
研究者番号：70362499

(2)研究分担者

戸口田 淳也 ( 京都大学再生医科学研究所・  
教授 京都大学 iPS 細胞研究所・副所長 )

研究者番号 : 40273502

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :