

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 3 月 31 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800077

研究課題名（和文） 核膜孔複合体と核ラミナの腸管腫瘍形成における役割

研究課題名（英文） Roles of nuclear pore complex and lamina in intestinal tumor formation

研究代表者

小島 康 (KOJIMA YASUSHI)

愛知県がんセンター（研究所）・分子病態学部・主任研究員

研究者番号：30464217

研究成果の概要（和文）：

大腸がんの進展にともない核膜孔複合体の構成成分である Nup88 と核ラミナの構成成分である Lamin A/C の発現上昇が認められ、それらは予後不良のマーカーとなることが報告されている。本研究課題では、Nup88 と Lamin A/C の発現量と Wnt シグナル経路の関係について検討した。現在までのところ、Wnt シグナルが Nup88 と Lamin A/C の発現量に影響をあたえることを示唆する所見は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Recent reports have suggested that Nup88, a component of nuclear pore complex, and Lamin A, a major component of nuclear lamina are overexpressed during intestinal tumorigenesis. I analyzed functional relationships between Wnt signal pathway and expression of Nup88 and Lamin A/C. I found little evidence supporting roles of Wnt signaling in Nup 88 and Lamin A/C expression during intestinal tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1300000	390000	1690000
2012 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	2500000	750000	3250000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：核膜孔複合体、核ラミナ、大腸がん

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の進展に伴い核膜孔複合体の構成成分である Nup88 と核ラミナの構成成分である Lamin A の発現上昇が認められ、それ

らは予後不良マーカーとなることが報告されている。しかしながら、大腸癌進展において、Nup88 と Lamin A/C が果たす役割は未解明である。

核膜孔複合体は、核の物質輸送の関門であ

る巨大蛋白質複合体で、Nup88 は構成分子の1つである (図 1)。核ラミナは、網目状の構造体で、核膜内膜を裏打ちし、中間径フィラメントの1種である Lamin が主成分である。哺乳類では Lamin A/C、Lamin B1、Lamin B2 の3つの遺伝子が存在する。Lamin A/C の発現は、組織・細胞特異性が認められるが、Lamin B1/2 の発現には認められない。Lamin A/C 遺伝子からは、選択的スプライシングにて Lamin A と Lamin C が発現する。

最近の研究により、核膜孔複合体と核ラミナは、核の関門や裏打ちの機能以外にも、遺伝子発現制御にも関与していることが明らかとなりつつある。核膜孔複合体と核ラミナは、クロマチン、転写因子、転写制御因子、ヒストン修飾酵素との結合していることが相次いで報告されている。また Lamin の遺伝子変異は、大規模な遺伝子発現変化を引き起こし、各種の遺伝性疾患の原因となることが示されている。

大腸癌患者の約 85% の症例で、Wnt シグナル抑制因子である APC の変異が認められる。Wnt シグナルの活性化が腫瘍形成に重要な役割を果たすと考えられているが、Wnt 経路の重要な転写因子である TCF-4 と LEF-1 は、核膜孔複合体と核ラミナにそれぞれ結合することが報告されている。

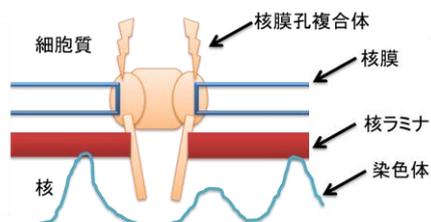


図1 核膜構造体と核ラミナの模式図

核膜孔複合体は、核と細胞質の物質輸送に担う。核ラミナは、核膜の裏打ちする。近年の研究により核膜孔複合体と核ラミナは遺伝子発現制御に関与することが示されている。

2. 研究の目的

腫瘍進展に伴って、腫瘍細胞の増殖能は亢進し、また細胞核の構造は変化する。病理診断では、細胞分裂像の増加や核の形態変化は重要な悪性化を示す所見とされる。近年、細胞核の構造は、その機能と密接にリンクしていることが明らかとなりつつある。ハッチソン・ギルフォード早老症候群(HGPS)は、Lamin A/C 遺伝子の変異が原因で、HGPS 患者の核は異常構造を呈する。HGPS の病態生理は不明な点が多いが、現在、核構造の変形が、遺伝子発現パターンに影響を与え、その結果、老化が促進すると考えられている。

本研究計画では、大腸癌細胞株と遺伝子改

変マウスを用いて、以下の2点を明らかにする。

1) 核膜孔複合体、特に Nup88 の Wnt シグナル及び腸管腫瘍形成における役割

2) 核膜ラミナ、特に Lamin A が Wnt シグナル及び腸管腫瘍形成における役割

核膜関連構造体である核膜孔複合体と核ラミナは遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、不明な点が多い。核膜関連構造体と Wnt シグナルの相互作用及びその腫瘍形成における役割が明らかとなった場合は、大腸癌治療の新たな分子標的治療の基盤となる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) *Apc/Smad4* 複合変異マウスの解析

Apc/Smad4 複合変異マウスは、*Apc* と *Smad4* の変異により浸潤性腸がんを自然発症する。広く用いられている *Apc*^{Min/+} マウスをはじめとする *Apc* 変異マウスは良性の腺腫性ポリープのみを発症する。本研究計画では、*Apc/Smad4* 複合変異マウスより、腸がん組織と正常腸管組織を採材して、RNA および蛋白質抽出液を調製した。RNA からは cDNA を調製して、qPCR にて Nup88 の発現量を定量した。タンパク抽出液を用いて、Lamin A/C の発現量を定量した。なおマウスの Nup88 に対する抗体を入手できなかったため、マウス組織では、Nup88 に関しては、ウエスタンブロッティングを行うことができなかった。

(2) Wnt3a リガンドの Nup88 と Lamin A/C 発現に与える影響

Wnt 活性をモニターできる 7TFP カセットを持つ組換えレンチウイルス (Fuerer C. & Nusse R., 2010, PlosOne) を調製し、HEK293 に感染させて、限外希釈によりクローニングを行った。Wnt3a/L clone32 細胞を培養して、Wnt3a 培養上清を得た。得られた Wnt3a 培養上清を用いて、Wnt 活性を高い S/N 比でモニタリングできる HEK293-7TFP-clone6 細胞株を樹立した。Wnt3a を添加培養液で培養した HEK293-7TFP-clone6 細胞株から、RNA を調製し、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて、qPCR にて Nup88 の発現量を定量した。

(3) ヒト大腸がん細胞株の解析

ヒト大腸がん細胞株 Caco2、Colo205、DLD1、HCT116、HT29、Lovo、SW480、SW620 を培養して、採材し、RNA からは cDNA を調製して、qPCR にて Nup88 の発現量を定量した。タンパク抽出液を用いて、Nup88 および Lamin A/C の発現量を定量した。

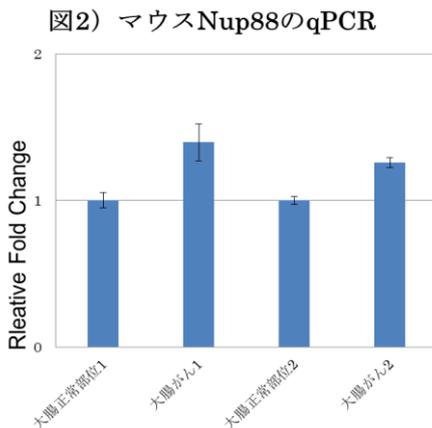
(4) ヒト大腸がん細胞株での優性変異体 TCF-4 の発現

優性変異体 TCF-4 を発現するカセットとピュロマイシン耐性遺伝子を持つ組換えレンチウイルス (Fuierer C. & Nusse R., 2010, PlosOne) を調製し、HCT116 細胞株と SW480 細胞株に感染させて、ピュロマイシンにて薬剤セレクションを行った。樹立した細胞から、蛋白質抽出液を調製した。タンパク抽出液を用いて、Nup88 および Lamin A/C の発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) *Apc/Smad4* 複合変異マウスの解析

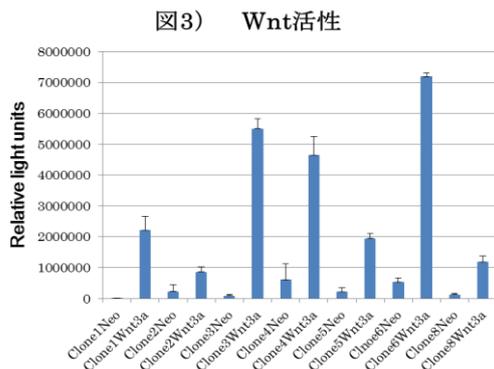
Apc/Smad4 複合変異マウスにおいて、正常大腸部位と比較して、腸がん組織では、Nup88 (図 2) の発現量にはごく軽度の上昇が認められた。Lamin A/C の発現量に関しても、腸がん組織と正常部位では、大きな変化は認め



られなかった。

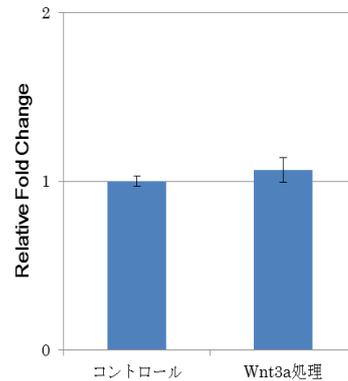
(2) Wnt3a リガンドの Nup88 と Lamin A/C 発現に与える影響

HEK293-7TFP-clone6 細胞株は、限外希釈法により樹立した 15 クローンから、複数回ルシフェラーゼアッセイを行って選択した。図 3 は、その代表的な結果である。12 時間の Wnt3a リガンド処理は、clone6 細胞株において約 13 倍のルシフェラーゼ活性を誘導している。



Wnt3a リガンド処理が、Nup88 の発現に与える影響について検討したところ、12 時間の Wnt3a 処理は、Nup88 の発現量に影響を与えなかった。

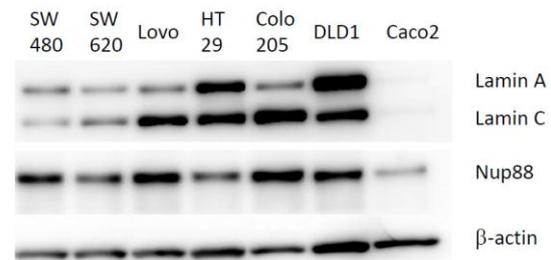
図4) Nup88のqPCR



(3) ヒト大腸がん細胞株の解析

ヒト大腸がん細胞株での Lamin A/C と Nup88 の発現を定量した。Caco2 細胞株は、他の大腸がん細胞株と比較して、Lamin A/C と Nup88 の発現量が低い。なお Caco2 も含めてここで提示した大腸がん細胞株は、全て Wnt シグナル経路に変異があることが報告されている。HKE293 細胞株は、HEK293-7TFP-clone6 細胞株のタンパク抽出液を用いている。

図5) ヒト大腸がん細胞株のLamin A/CとNup88の発現



(4) ヒト大腸がん細胞株での優性変異体 TCF-4 の発現

優性変異体 TCF-4 を発現するカセットとピュロマイシン耐性遺伝子を持つ組換えレンチウイルスを感染させた SW480 および SW620 細胞株では、Lamin A/C と Nup88 の発現量には大きな変動は認められなかった。

まとめ

本研究課題では、核膜関連構造体である核膜孔複合体と核ラミナの構成成分である Nup88 と Lamin A/C の発現に対する Wnt 経路の影響を検討した。*Apc/Smad4* 複合変異マウスの解析では、正常腸管組織と比較して、

マウス浸潤性腸がん組織では、Nup88 と Lamin A/C の発現量には大きな変化は認められなかった。またヒト大腸癌細胞株などを用いた解析でも、Wnt 経路が Nup88 と Lamin A/C の発現量を制御していることを示唆する所見は得られなかった。臨床検体を用いた解析から、大腸癌の進展に伴い核膜孔複合体の構成成分である Nup88 と核ラミナの構成成分である Lamin A の発現上昇が認められることが報告されている。本研究課題の結果からは、Wnt 経路活性だけでは、Nup88 と Lamin A/C の発現上昇には不十分であることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi_byotai/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 康 (KOJIMA YASUSHI)

愛知県がんセンター・研究所・主任研究員
研究者番号 : 30464217

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし