

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21日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011年度～2012年度

課題番号：23890169

研究課題名（和文） BCL9/ β カテニン転写複合体を標的とした新規抗大腸癌ペプチドの臨床応用

研究課題名（英文） Targeted disruption of the BCL9/beta-catenin complex in colorectal cancer using stapled peptide

研究代表者

高田 弘一（TAKADA KOHICHI）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90398321

研究成果の概要（和文）： Stabilized Alpha-Helix of BCL9 peptide (SAH-BCL9) を設計・合成し，SAH-BCL9 が Wnt/ β -カテニン転写活性を特異的かつ効果的に阻害し，大腸癌細胞株の増殖を抑制するのみならず，大腸癌の浸潤・転移、血管新生を抑制することを明らかにした．SAH-BCL9 は BCL9/Wnt シグナルが活性化している大腸癌において新たな分子標的薬として有用である可能性が示唆された．

研究成果の概要（英文）： We developed a stabilized α helix of BCL9 (SAH-BCL9), which we show targets beta-catenin, dissociates native beta-catenin/BCL9 complexes, selectively suppresses Wnt transcription, and exhibits mechanism-based antitumor effects. SAH-BCL9 also suppresses tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis in mouse xenograft models of Colo320 colorectal carcinoma. By inhibiting the BCL9/beta-catenin interaction and selectively suppressing oncogenic Wnt transcription, SAH-BCL9 may serve as a prototype therapeutic agent for cancers driven by deregulated Wnt signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：歯科薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：抗大腸癌ペプチド、BCL9、Wnt シグナル

1. 研究開始当初の背景

本邦において大腸癌の死亡数は増加の一途にあり，年間死亡者数は約 40,000 人にもものぼる（癌死亡率 第3位）．本疾患の治療成績は抗がん剤療法の進歩に加え，抗 VEGF 抗

体や抗 EGFR 抗体などの分子標的薬の導入により向上してきている．しかしながら，未だ生存期間中央値は 25-30 ヶ月と短く，予後不良な疾患である．よって，より効果的な新規治療法の開発が待たれている．多くの大腸癌

では、Wnt/ β -カテニンシグナルが活性化され、細胞増殖能および転移能を亢進させていることから、大腸癌治療において同シグナルは分子標的薬のターゲットとして極めて重要である。一方、同シグナルは骨髄幹細胞をはじめとする様々な幹細胞の維持や創傷治癒の制御に必須である。したがって、Wnt/ β -カテニンシグナル抑制剤投与により重篤な合併症が誘発されることが危惧される。実際に、TCF/ β -カテニン複合体拮抗剤として開発された PKF115-584 (Cancer Cell, 2006) を担癌マウスに投与すると高度な骨髄抑制と体重減少が惹起される (PNAS, 2007)。これらの知見より、大腸癌治療の標的となり得る新たな Wnt シグナル分子の同定が待たれていた。

申請者らは、これまで β -カテニンの co-factor である BCL9 が大腸癌および多発性骨髄腫細胞で高発現していることを見出した。一方、BCL9 はその発生母地である正常大腸粘膜および形質細胞には発現していないことを確認している。Xenograft 大腸癌マウスモデルにおいて、shRNA を用いて大腸癌細胞の BCL9 の発現を抑制することにより Wnt シグナルの下流遺伝子群の発現が低下し、癌細胞の増殖、転移・浸潤および腫瘍血管新生が優位に抑制され、その結果として担癌マウスの生存率を有意に向上させることを明らかにしている (Cancer Res, 2009)。以上、これまでの申請者らの検討結果から、BCL9 は大腸癌治療の標的のとして理想的な分子であると考えられる。結晶構造の解析結果から BCL9 は、 α -Helix を形成する HD2 ドメイン (アミノ酸残基 351-374) を介して β -カテニン表面の groove に結合することが明らかとなっている。特にヒスチジン 358 残基 (H358) およびアルギニン 359 残基 (R359) がその結合に重要である。申請者らはこれらの結晶構造から、研究協力者である Loren D. Walensky (Dana-Farber Cancer Institute) が開発した stapled peptide (Science 2006, Cancer Cell 2010, Nat Chem Biol 2010) により BCL9 と β -カテニンの結合を阻害する SAH-BCL9 peptide A-C を設計・合成した。stapled peptide は、従来の peptide と比較し、 α -Helix 構造を有することから細胞内へ効率よく移行し、かつ分解されづらいため新規癌治療薬として開発できる可能性があり、その将来性が有望視されている (Nat Biotechnol, 2010)。はじめに、設計・合成した SAH-BCL9 peptide A-C が α -helix を形成していることを Circular dichroism (CD) 解析で検討したところ、いずれの stapled peptide も通常型 peptide (BCL9 HD2) と比較して有意に α -Helix 構造を形成していた。続いて、SAH-BCL9 peptide A-C が β -カテニンに結合するか否かを FITC でラベルした 5 μ M の stapled peptide を 24 時間大腸癌細胞

に添加し、抗 FITC 抗体を用いた免疫沈降法で検討した。その結果、SAH-BCL9_B が最も効率よく β -カテニンに結合していた。したがって、SAH-BCL9_B 用いて live cell imaging を行いその細胞内移行を観察したところ、SAH-BCL9_B が主に核内に取り込まれていた。また、SAH-BCL9_B に細胞増殖抑制効果があることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

申請者らは、 β -カテニンに結合し、その転写活性を正に制御する BCL9 が大腸癌の細胞増殖、転移・浸潤、腫瘍血管新生に重要であることを明らかにしている (Mani M, Takada K, et al., Cancer Res, 2009)。BCL9 は正常細胞に発現していないことから癌治療の標的分子として理想的である。BCL9 は、homology domain 2 (HD2) が形成する α -Helix を介して β -カテニンに結合する。申請者らは、HD2 の構造を模倣した Stabilized Alpha-Helix of BCL9 peptide (SAH-BCL9) を設計・合成し、SAH-BCL9 が Wnt/ β -カテニン転写活性を特異的かつ効果的に阻害し、大腸癌細胞株の増殖を抑制することを preliminary に見出していた。本研究の目的は、SAH-BCL9 が癌細胞の増殖を抑制するのみならず、浸潤・転移能さらには血管新生抑制作用を有するか否かを検討するとともに SAH-BCL9 の *in vivo* での抗腫瘍効果を明らかとし、SAH-BCL9 を抗腫瘍薬として臨床試験へ導入することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Wnt 特異的ルシフェラーゼアッセイによる Wnt/ β -カテニン転写活性の測定: Colo320 細胞に Wnt 特異的転写活性を測定するために TOP-FLASH あるいは FOP-FLASH プラスミドを Lipofectamine を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に SAH-BCL9_B 処理を 12 時間行い、デュアルレポーターアッセイキットを用いてその活性を測定した。さらに、SAH-BCL9_B の特異性を確認する目的で、NF κ B の転写活性を同様の方法で測定した。

(2) qRT-PCR を用いた Wnt シグナル特異的遺伝子の mRNA 発現変化の検討: 大腸癌細胞株である DLD-1 および Colo320 細胞に vehicle (0.1 % DMSO) あるいは SAH-BCL9_B, SAH-BCL9_B(R359E) を添加し、24 時間後に細胞を回収し、TRIzol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出する。続いて 2 μ g の RNA から SuperScript VILO cDNA 合成キットを用いて cDNA を作製する。同 cDNA を用いて大腸癌において Wnt シグナルの特異的下流遺伝子として知られてい *Axin2*, *Lgr5*, *LEF-1*, *APCDD1* の発現量を qRT-PCR 法で定量した。

(3) 細胞増殖抑制効果の解析: ³H-thymidine incorporation 法により SAH-BCL9_B の細胞増

殖抑制効果を検討した。外科的に切除された大腸癌組織より大腸癌細胞のみを分離し、SAH-BCL9_Bの細胞増殖効果を確認した。同時に同細胞の BCL9 および β-カテニンの蛋白発現量をウエスタンブロット法で解析し、増殖抑制効果とこれらの蛋白発現量に相関があるか否かを検討した。大腸癌細胞の単離方法は、まず切除された組織を 37 °C、30 分間 collagenase IV (Worthington Biomedical Corporation) および 0.01 % DNase I で処理する。混入している赤血球は ACK lysing buffer で溶血させ、生細胞を Ficoll-Paque で回収する。さらに、FITC ラベル抗 EpCAM 抗体 (clone Ber-EP4, Dako) および Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) で細胞を染色し、FACSaria flow sorting (BD Biosciences) を用いて EpCAM 陽性、Hoechst 陰性細胞を単離した。

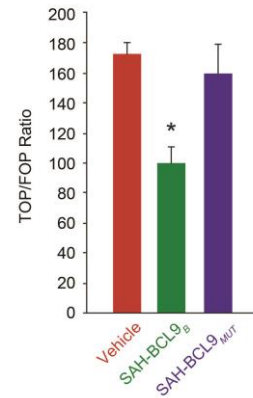
(4) SAH-BCL9_B による血管新生および浸潤能抑制作用の評価：SAH-BCL9_Bが VEGF 発現量に変化を与えるか否かを ELISA 法 (DuoSet, R&D Systems) で解析した。具体的には、0-20 μM SAH-BCL9_Bを大腸癌細胞に添加し、24 時間培養後細胞上清を回収し、VEGF を測定した。さらに、既報 (Cancer Res, 2009) と同様に *in vitro* angiogenesis assay キット (Millipore) のプロトコールに従い SAH-BCL9_B が HUVEC の capillary tube formation に与える影響を観察した。一方、浸潤能の変化に関しては 2 x 10⁵ の大腸癌細胞を Matrigel Boyden chamber に蒔き、chamber の膜を通過し得た細胞の数をカウントすることによって評価した。

(5) *in vivo* における SAH-BCL9_B の抗腫瘍効果の検討：GFP でラベルした大腸癌細胞 (Colo320) 1 x 10⁶ 個を放射線投与後の NOD.CB17-PrkdcSCID/J mice の腹腔内に接種し、48 時間後より Vehicle (2.5 % DMSO in 5 % Dextrose water), SAH-BCL9_B (20 mg/kg) あるいは SAH-BCL9_B(R359E) による治療を開始した。投与経路は腹腔内投与とし、薬剤の投与は隔日投与とする。腫瘍接種 40 日後に抗腫瘍効果判定を LAS-4000 を用いて GFP 陽性領域を画像化し、Image J ソフトを用いてその領域を定量化した。

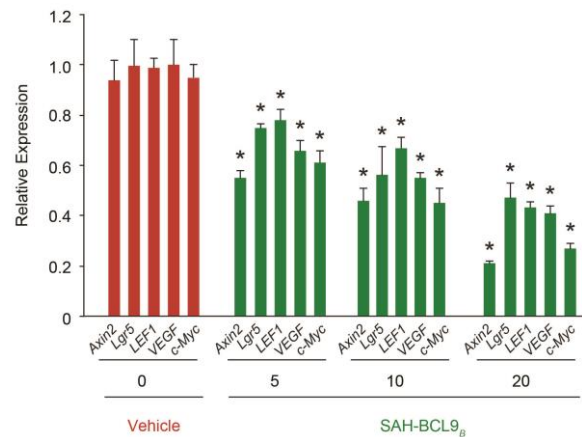
(6) *in vivo* における SAH-BCL9_B の抗転移・浸潤、血管新生効果の解析：担癌マウスの complete necropsy を行い、組織学的に肝および多臓器への転移を評価した。血管新生の評価は、抗 CD34 抗体を用いた免疫染色法で行った。

4. 研究成果

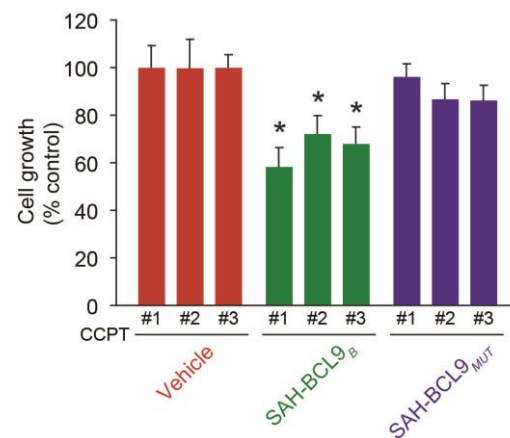
(1) Wnt 特異的ルシフェラーゼアッセイによる Wnt/β-カテニン転写活性の測定：SAH-BCL9_B 処理により Wnt の転写活性は有意に低下した。一方、NFκB の転写活性に変化は認められなかった。



(2) qRT-PCR を用いた Wnt シグナル特異的遺伝子の mRNA 発現変化の検討：SAH-BCL9_B 処理により Wnt の標的遺伝子である Axin2, LGR5, LEF1, VEGF, c-MYC が有意にその発現が抑制された。

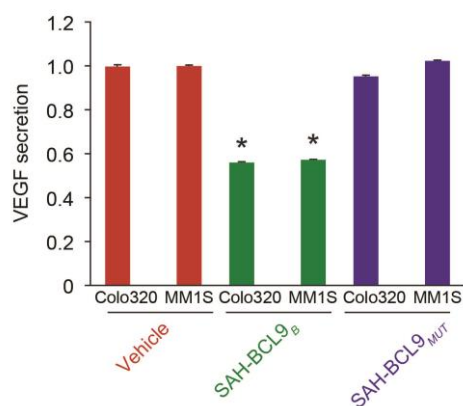


(3) 細胞増殖抑制効果の解析：外科的に切除された大腸癌組織より大腸癌細胞のみを分離し、SAH-BCL9_Bの抗腫瘍効果を検討したところ BCL9 が発現している患者検体においてその細胞増殖抑制効果が観察された。



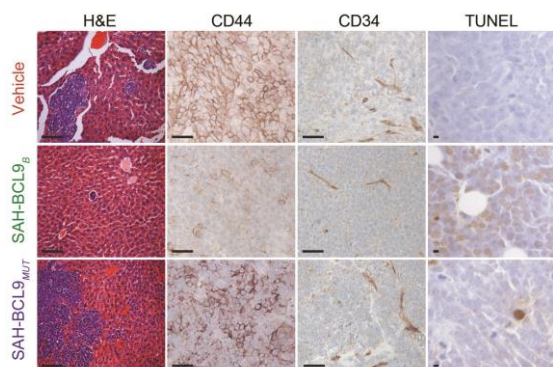
(4) SAH-BCL9_B による血管新生および浸潤能抑制作用の評価：SAH-BCL9_B 添加により、血管

新生, VEGF の産生能および浸潤能が有意に抑制された。



(5) *in vivo* における SAH-BCL9_B の抗腫瘍効果の検討: SAH-BCL9_B 投与により, 腫瘍は有意に縮小した。

(6) *in vivo* における SAH-BCL9_B の抗転移・浸潤, 血管新生効果の解析: 抗転移抑制効果および抗血管新生抑制効果を病理学的に証明し得た。



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 14 件)

- Gatt ME, Takada K, Mani M, Lerner M, Pick M, Hideshima T, Carrasco DE, Protopopov A, Ivanova E, Sangfelt O, Grander D, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Anderson KC, Carrasco DR. TRIM13(RFP2) downregulation decreases tumour cell growth in multiple myeloma through inhibition of NFKappa B pathway and proteasome activity. *Br J Haematol* **2013**, May 7. [Epub ahead of print] 10.1111/bjh.12365. 査読あり
- Hirakawa M, Sato Y, Ohnuma H, Takayama T, Sagawa T, Nobuoka T, Harada K, Miyamoto H, Sato Y, Takahashi Y, Katsuki S, Hirayama M, Takahashi M, Ono M, Maeda M, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Hirata K, Kato J. A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother Pharmacol* **2013**, Jan 22. [Epub ahead of print] 10.1007/s00280-013-2073-5 査読あり
- Takada K, Zhu D, Bird GH, Sukhdeo K, Zhao JJ, Mani M, Lemieux M, Carrasco DE, Ryan J, Horst D, Fulcinti M, Munshi NC, Xu W, Kung AL, Shivdasani RA, Walensky LD, Carrasco DR. Targeted Disruption of the BCL9/ β -catenin Complex Inhibits Oncogenic Wnt Signaling. *Sci Transl Med* **2012**, 4(148):148ra117 10.1126/scitranslmed.3003808 査読あり
- Takahashi S, Hirayama M, Kuroiwa G, Kawano Y, Takada K, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Diagnostic validity of CT gastrography versus gastroscopy for primary lesions in gastric cancer: evaluating the response to chemotherapy, a retrospective analysis. *Gastric Cancer* **2012** [Epub ahead of print] 査読あり
- Kobune M, Iyama S, Kikuchi S, Horiguchi H, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kamihara Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. *Blood Cancer J* **2012**, 7;2:e87 10.1038/bcj.2012.36 査読あり
- Takada K, Sato T, Iyama S, Ono K, Kamihara Y, Murase K, Kawano Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Kato J. *UGT1A1*28* and **6* polymorphisms and nilotinib-induced unconjugated hyperbilirubinemia in a Japanese patient with chronic myelogenous leukemia. *Int Canc Conf J* **2012**, 1;220-3 査読あり
- Yoshida M, Takimoto R, Murase K, Sato Y, Hirakawa M, Tamura F, Sato T, Iyama S, Osuga T, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach. *PLoS One* **2012**, 7(7):e39545

10. 1371/journal.pone.0039545 査読あり
8. Iyama S, Sato T, Murase K, Kikuchi S, Kamihara Y, Ono K, **Takada K**, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Obama T, Miyajima M, Watanabe A, Higami T, Hirayama Y, Kato J. Successful treatment by fibrin glue sealant for pneumothorax with chronic GVHD resistant to autologous blood patch pleurodesis. **Intern Med** 2012, 51(15):2011-4. 査読あり
9. Iyama S, Sato T, Murase K, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, **Takada K**, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Intermittent administration of recombinant human soluble thrombomodulin successfully controlled chronic disseminated intravascular coagulation in a patient with dissecting aortic aneurysm on an outpatients basis. **Blood Coagul Fibrinolysis** 2012, 23(6):548-50. 10.1097/MBC.0b013e32835510d6 査読あり
10. Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, Sato T, Murase K, Kawano Y, **Takada K**, Ono K, Kaneko Y, Miyanishi K, Sato Y, Hayashi T, Takimoto R, Kato J. Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. **Free Radic Biol Med** 2012, 23(6):548-50. 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.006 査読あり
11. Sukhdeo K, Mani M, Hideshima T, **Takada K**, Pena-Cruz V, Mendez G, Ito S, **Anderson KC**, **Carrasco DR**. β -catenin is dramatically stored and cleared in multiple myeloma by the proteasome-aggresome-autophagosome-lysosome pathway. **Leukemia** 2012, 26(5):1116-9 10.1038/leu.2011.303 査読あり
12. Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, Sato T, Murase K, Kawano Y, **Takada K**, Ono K, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Prognostic significance of serum ferritin level at diagnosis in myelodysplastic syndrome. **Int J Hematol** 2012, 95(5):527-34. 10.1007/s12185-012-1048-3 査読あり
13. Sato T, Iyama S, Murase K, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, **Takada K**, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Novel missense mutation in the

TMRSS6 gene in Japanese female with iron-refractory deficiency anemia. **Int J Hematol** 2011, 41(7):660-7.

- 10.1007/s12185-011-0881-0 査読あり
14. Kobune M, Miyanishi K, **Takada K**, Kawano Y, Nagashima H, Kikuchi S, Murase K, Iyama S, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Establishment of a simple test for iron absorption from the gastrointestinal tract. **Int J Hematol** 2011, 93(6):715-9. 10.1007/s12185-011-0878-8 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

高田弘一

BCL9/beta-catenin 転写複合体を標的とした新規大腸癌治療法の開発
第21回日本がん転移学会学術集会・総会
2012.7.12-2012.7.13 広島

〔図書〕(計1件)

高田弘一

アークメディア 分子生物学が可能とした個別化医療 2012.7.18 発行
BCL9/beta-catenin 転写複合体を標的とした新規大腸癌治療法の開発 P182-184

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 弘一 (TAKADA KOHICHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90398321

(2)研究分担者

(3)連携研究者

研究者番号: