

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253022

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた消化器がん転移の研究

研究課題名(英文) Studies on digestive system cancer metastasis using mouse models

研究代表者

武藤 誠 (TAKETO, Makoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特命教授

研究者番号：70281714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの大腸がん細胞を脾注肝播種により転移させる移植系では、宿主骨髄系の細胞により二相反応が起き、前者の主要な細胞は好中球であり、後者ではFibrocytesであった。MMP9とMMP2双方がそれぞれの細胞により産生され、浸潤転移に必須の役割を果たす。

Notchシグナル伝達により大腸がん細胞に誘導され、転移を促進する遺伝子の一つはDAB1で、このタンパクはABLキナーゼによりチロシンリン酸化され、逆にABLの自己リン酸化による活性化を促進する。その結果GEFタンパクTRIOのY2681残基がリン酸化され、患者の予後の悪さと有意に相関し、新規の予後予測マーカーとなる。

研究成果の概要(英文)：(1) In the invasion and metastasis model where mouse colon cancer cells are disseminated to the liver from spleen, we found two phase reaction of the host bone marrow-derived cells. In the early phase, neutrophils are recruited and in the late phase, fibrocytes. MMP9 and MMP2 are produced by these types of cells, respectively, which is critical for cancer invasion and metastasis. (2) One of the genes induced by Notch signaling transcription in colon cancer cells is DAB1 of which product is tyrosine-phosphorylated by ABL kinase, which reciprocally activates ABL autophosphorylation. As a result, TRIO Y2681 is phosphorylated, which shows a strong correlation with poor prognosis as a novel diagnostic marker.

研究分野：実験病理学

キーワード：消化器がん 浸潤 転移 予後マーカー AES NOTCH ABL TRIO

1. 研究開始当初の背景

消化器がんは、がんの中でも最も死亡率が高い。死因のほとんどは遠隔転移によるため、その機序の解明及び予防・治療法の確立が急務となっている。

先に我々は、ApcD716 マウスにさらに Smad4 変異を導入する大腸がんモデルを確立しケモカイン受容体 CCR1 を発現する未分化骨髄球 (immature myeloid cells: iMCs) が腫瘍細胞周囲に集簇し、良性の腸ポリープが浸潤性を獲得したがんへ進行することを見出していた (Takaku, *Cell*, 1998; Kitamura, *Nat Genet*, 2007; Kitamura, *PNAS*, 2010)。

我々は最近、これまで機能不明であった Aes (Amino-terminal enhancer of split) が新規の大腸がん転移抑制遺伝子であることを報告した (Sonoshita, *Cancer Cell*, 2011)。Aes は Notch シグナル伝達経路を阻害することも見出したが、それまで個体発生や分化に重要とされていた Notch シグナル伝達経路ががん悪性化にも重要な役割を果たすことを示したとして各紙で取り上げられるとともに (Christofori, *Cancer Cell*, 2011; Editors' choice, *Science*, 2011)、新聞や報道番組でも大きく報じられた。我々は、これらの研究から得た知見を基に新規治療標的の同定に成功しつつあり (投稿準備中)、以下にその概要と、それを踏まえて更なる発展を目指す本研究課題の内容を述べる。

2. 研究の目的

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をさらに発展させ、大腸がん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する。具体的には、

(1) 大腸がん浸潤・転移における CCL15 ケモカインの役割

(2) Notch シグナル伝達経路による大腸がん浸潤・転移促進機構の2項目を研究する。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん浸潤・転移における CCL15 ケモカインの役割

これまでの解析からマウス CCL9 のヒトホモログである CCL15 の受容体はいずれの種においても CCR1 であり、多くの市販抗体や、国内の著名研究者が論文で発表した抗体を譲り受けて調べても、それらの特異性や親和性に問題があり、FACS ソーティングに使える信頼度はなかった。

そこで、もっと生物学的な方法で、CCR1 発現骨髄細胞を調べる戦略に転換した。即ち、CCR1 受容体のゲノム遺伝子から、そのプロモーター・エンハンサー領域をまとめてクローニングし、下流に GFP 系の蛍光タンパク遺伝子を組み込んで、*Ccr1* 遺伝

子を発現している骨髄細胞を標識し、FACSにてソーティングして解析するという方法である。

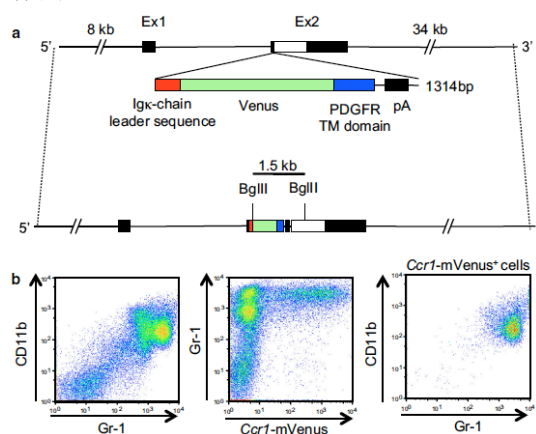
(2) Notch シグナル伝達経路による大腸がん浸潤・転移促進機構を研究する。

Aes タンパクが Notch シグナル伝達における核内での転写を抑制することはすでに上記の論文で確立したが、Aes ノックアウトマウスにおいて活性化した Notch シグナル伝達はその下流でどのように浸潤転移を起こすかを、シグナルの流れに沿って精緻に分析する必要がある。この方法に必ずしも王道はないが、我々は過去の遺伝学的経験の蓄積から、ショウジョウバエにおける諸変異の連鎖解析に注目し、それをヒントに哺乳動物での分子機構を解析した。また、細胞生物学的観察からも、Aes の動態について新しい知見を調べた。

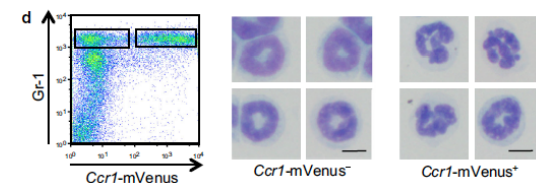
4. 研究成果

(1) 大腸がん浸潤・転移における CCL15 ケモカインの役割。

① *Ccr1-mVenus* トランスジェニックマウスの作出

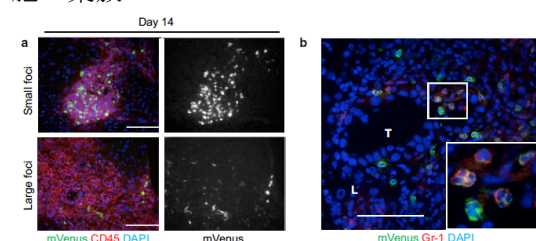


細胞膜結合型の蛍光タンパク mVenus を *Ccr1* 遺伝子プロモーター・エンハンサーから発現するトランスジェニックマウス



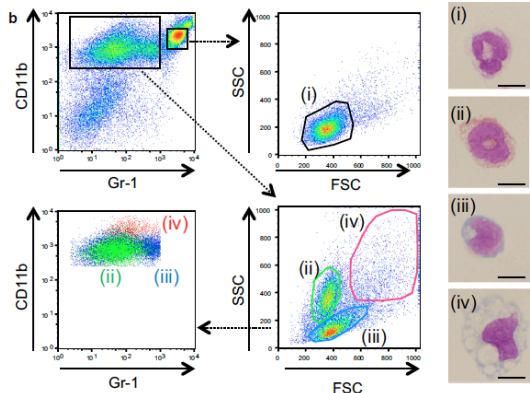
このマウスで *Ccr1*-mRNA を発現する末梢血は好中球であった。

② マウス肝臓の転移巣における CCR1+細胞の集簇

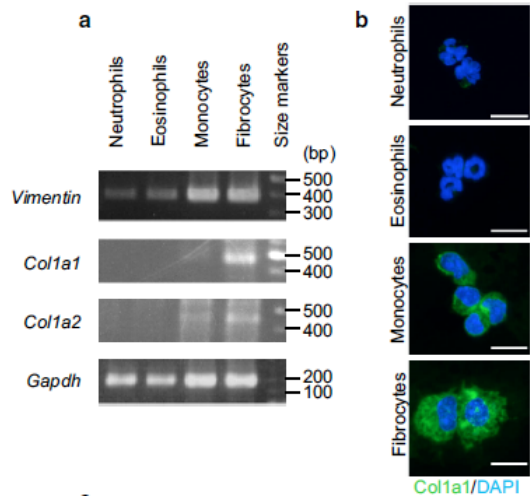


このマウスに大腸がん細胞を移植、肝臓に播種させると、転移巣周辺に Gr-1 陽性の好中球が多く集簇し、*Ccr1* mRNA を発現。

③肝臓の転移巣に集簇した骨髓細胞にはファイブロサイトが含まれる

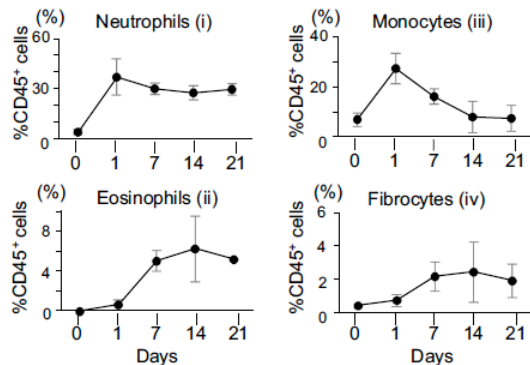


しかし、一部の Gr-1 陰性の *Ccr1*-mRNA 陽性細胞は特異な形態を示した (iv)。



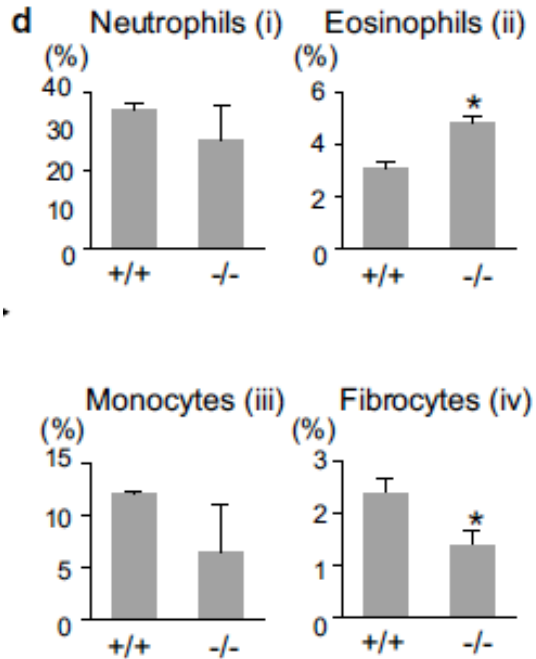
この細胞集団の解析から Fibrocyte を同定

④肝臓の転移巣に集簇した骨髓細胞の時系列変化



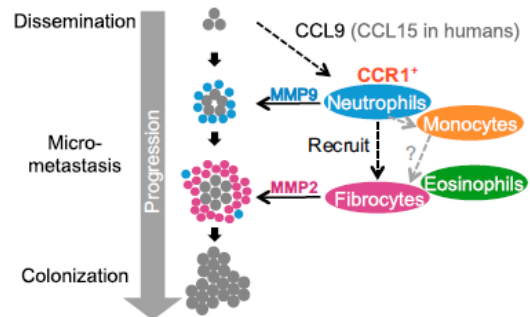
早期には好中球、後期は Fibrocytes が出現。

⑤ヒト大腸がんの肝転移巣での CD15+細胞は CCR1 を発現している。



マウスでの上記の観察を確認するため、ヒトの末梢血と大腸がん肝転移巣の骨髓由来細胞を解析したところ、末梢血では CCR1 タンパクの発現は殆ど見られなかった。一方肝転移巣の周辺では単球系の CD14 陽性細胞の約 10%に CCR1 の発現が見られた。

⑥まとめ

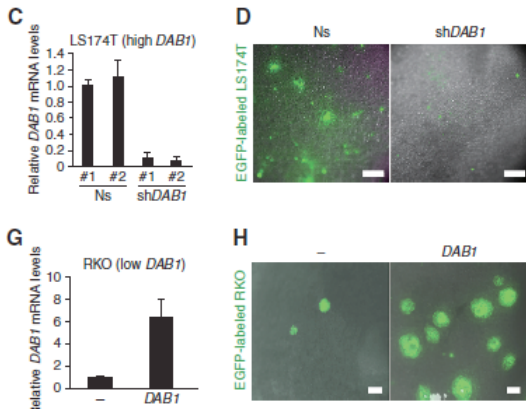


マウスの大腸がん細胞 CMT93 を脾注肝播種により転移させる移植系では、宿主骨髓系の細胞により数日と数週という二相からなる反応が起きる。前者の主要な細胞は好中球であり、後者では Fibrocytes であった。好中球では、多量の *Ccr1* mRNA が発現しているが、末梢血ではタンパクの発現が確認できない。一方、大腸がん細胞転移巣の微小環境では、CCR1 発現細胞が確認でき、それらは単核球状の形態を示す Fibrocytes であった。

MMP9 と MMP2 それぞれの遺伝子ノックアウトマウスを使った 2007 年の我々の論文 (Kitamura et al., Nat Genet) では転移増殖の確立には MMP9 と MMP2 双方が必要であったが、今回の結果は、それらがそれぞれ好中球と Fibrocytes により産生され、早期と後期で浸潤転移に必須の役割を果たすことが示された。

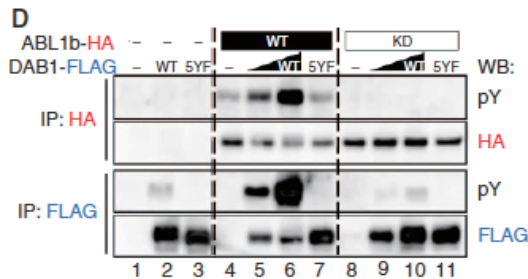
(2) Notch シグナル伝達経路による大腸がん浸潤・転移促進機構の研究。

①Notch シグナル伝達により大腸がん細胞に誘導され、転移を促進する遺伝子の一つは *DAB1/Dab1* である。



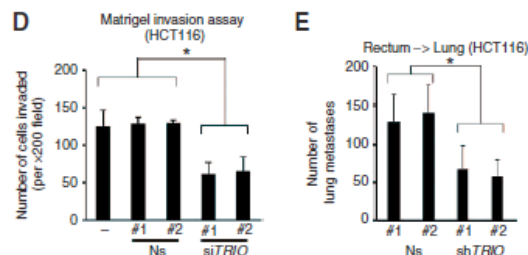
ヒト大腸がん細胞の *DAB1* 遺伝子発現を shRNA で抑制するとヌードマウスへの直腸移植による肝転移が抑制され (C, D) *DAB1* cDNA を発現すると促進する (G, H)。

②大腸がん細胞では *DAB1* タンパクは ABL キナーゼによりチロシンリン酸化され、リン酸化された *DAB1* は逆に ABL の自己リン酸化による活性化を促進する。



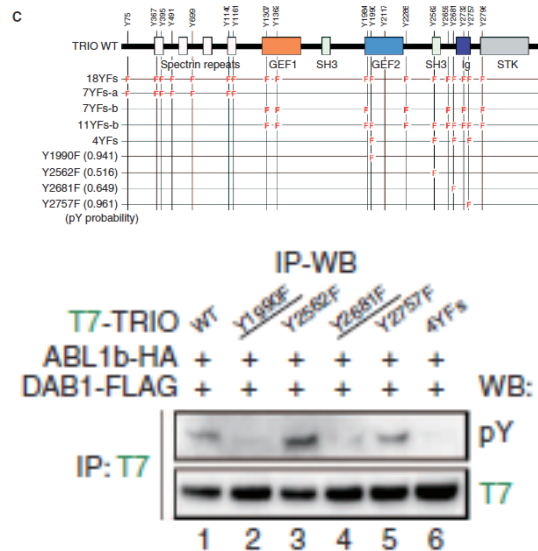
ヒト大腸がん細胞への発現プラスミド導入と免疫沈殿物のウェスタンブロット解析により、ABL キナーゼに依存した *DAB1* のリン酸化と、それに伴う ABL の自己リン酸化促進が見られた。

③大腸がん細胞で活性化した ABL によりリン酸化される標的の一つは RAC/RHO-GEF タンパク TRIO である。



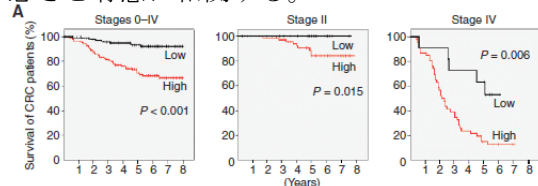
ヒト大腸がん細胞に *TRIO* 遺伝子の shRNA を発現させて、マトリゲルでの浸潤活性や (D) ヌードマウス直腸への移植による肝転移活性を (E) 測定すると、いずれも有意に抑制された。

④大腸がん細胞において *DAB1-ABL* によりリン酸化される *TRIO* の主要なチロシン残基は Y2681 である。



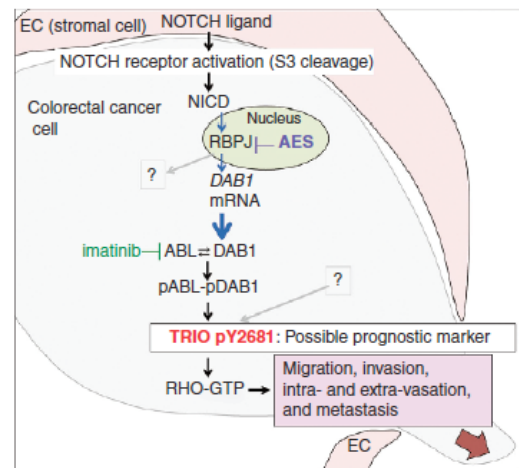
TRIO 分子の Tyr 残基を系統的に Phe 置換することで、転移を促進する ABL によるリン酸化は Y2681 であると同定。

⑤*TRIO* pY2961 は大腸がん患者の予後の悪さと有意に相関する。



これは、新規の予後予測マーカーとなる。

⑥まとめ :



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 5 件)

Hirai H, Fujishita T, Kurimoto K, Miyachi H, Kitano S, Inamoto S, Itatani Y, Saitou M, Maekawa T, Taketo MM.

CCR1-mediated accumulation of myeloid cells in the liver microenvironment promoting mouse colon cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* (2014) 31:977-989.

Inamoto S, Itatani Y, Yamamoto T, Minaguchi S, Hirai H, Iwamoto M, Hasegawa S, Taketo MM, Sakai Y, Kawada K.

Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by accumulation of myeloid derived suppressor cells through CCL15-CCR1 chemokine axis. *Clin Cancer Res* (2016), in press.

Itatani Y, Kawada K, Fujishita T, Kakizaki F, Hirai H, Matsumoto T, Iwamoto M, Inamoto S, Hatano E, Hasegawa T, Uemoto S, Sakai Y, Taketo MM.

Loss of SMAD4 from colorectal cancer cells promotes CCL15 expression to recruit CCR1+ myeloid cells and facilitate liver metastasis. *Gastroenterology* (2013) 145:1064-1075.

Sonoshita M, Itatani Y, Kakizaki Y, Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y, Sakai Y, Taketo MM.

Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF Protein TRIO. *Cancer Discovery* (2015) 5:198-211.

Itatani Y, Sonoshita M, Kakizaki F, Okawa K, Stifani S, Itoh H, Sakai Y, Taketo MM. Characterization of Aes nuclear foci in colorectal cancer cells. *J Biochem* (2016) 159:133-140.

[学会発表] (計 5 件)

AACR Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA (Apr. 18-21, 2015)

Taketo MM.

CRC invasion via Trio.

AACR Metastasis Meeting, Austin, TX, USA (Nov. 29-Dec. 2, 2015)

Sonoshita M, Itatani Y, Kakizaki F, Sakai Y, Taketo MM.

Promotion of Colorectal Cancer Invasion and Metastasis through Activation of

Notch-Dab1-Abl-RhoGEF Protein Trio

Notch Meeting (Oct 2-5, 2015)

M. Mark Taketo and Masahiro Sonoshita.

Promotion of Colorectal Cancer Invasion and Metastasis through Activation of Notch Signaling.

第 24 回日本がん転移学会学術集会シンポジウム (H27.7.23~24;大阪)

武藤 誠、園下将大

演題:大腸がんの転移機構の解明とその臨床応用の可能性

第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋、2015 年 10 月 8 日~10 日)

Taketo MM, Sonoshita M. (英語シンポジウム)

Mechanisms of Colorectal Cancer Metastasis (日本語演題:大腸がんの転移機構の解明とその臨床応用の可能性)

[図書] (計 1 件)

武藤 誠・青木正博 訳、南江堂、ワインバーグ 「がんの生物学」 第二版、2016、印刷中。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: METHOD FOR DETERMINING PROGNOSIS OF CANCER (癌の予後を診断する方法)

発明者: 武藤 誠 他 4 名

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: JP2024/063527

出願年月日: 2013. 5. 13 (2014. 6. 3)

国内外の別: 国内 (PCT)

各国移行: 米国、EU、カナダ、中国に申請済み

○取得状況 (計 1 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：
<http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/indexjp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 誠 (TAKETO, Makoto)
京都大学国際高等教育院・特定教授
京都大学大学院医学研究科・特命教授
研究者番号：70281714

(2) 研究分担者

柿崎文彦 (KAKIZAKI, Fumihiko)
京都大学大学院医学研究科・特定研究員
研究者番号：00609076

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

(3) 連携研究者