

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290043

研究課題名(和文)大腸癌と卵巣癌におけるLgr5の機能の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Lgr5 in colon and ovary cancer

研究代表者

川崎 善博(Kawasaki, Yoshihiro)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：10376642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：7回膜貫通型受容体のLgr5は腸管上皮の幹細胞マーカーとして注目されているが、癌発症における具体的な役割は十分に明らかにされていなかった。申請者らは、Lgr5が大腸がん細胞の造腫瘍性に必須の役割を果たしていることを見出した。また、大腸がん細胞においてmiR-363-GATA6(転写因子の一種)経路がLgr5の発現を直接促進していることを見出し、miR-363からLgr5へ至るカスケードが大腸癌細胞の造腫瘍性に重要であることを明らかにした。さらに、Reg4(増殖因子)もmiR-363-GATA6の標的因子として機能し、Lgr5と協調して癌細胞の腫瘍形成促進に関わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Lgr5 is specifically expressed in stem cells of the intestine and has an essential role in maintaining tissue homeostasis. However, the function of Lgr5 in colorectal tumorigenesis is unclear. We showed that Lgr5 is required for the tumorigenicity of colorectal cancer cells. We also showed that the transcription factor GATA6 directly enhances the expression of Lgr5. Furthermore, we demonstrated that GATA6 is upregulated in colorectal cancer cells due to the downregulation of miR-363, which directly targets GATA6. We found that Reg4, a member of the regenerating islet-derived (REG) family, is also a target of GATA6 and GATA6-mediated activation of Reg4 enhances the tumorigenicity of colon cancer cells. These results suggest that the miR-363-GATA6-LGR5/Reg4 pathway is critical for colorectal tumorigenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：Lgr5

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) の一種 Lgr5 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) は、腸管上皮を含むいくつかの組織の幹細胞マーカーとして注目を集めている。興味深いことに、H. Clevers らは癌抑制遺伝子 APC の変異が腸管上皮 Lgr5 陽性細胞に起きたときにのみ腸管腺腫が発生することを報告し、Lgr5 陽性の幹細胞は大腸癌の起源であることを明らかにした。また、Lgr5 は大腸癌・卵巣癌・肝臓癌など様々な組織由来の腫瘍において発現が亢進していることも示されている。さらに最近、Lgr5 のリガンドが増殖因子 R-Spondin であることが明らかとなり、R-Spondin/Lgr5 は幹細胞性の維持に重要な Wnt シグナル伝達経路の活性化に関わっていることが報告された。このように Lgr5 に関する研究は大きく進歩したが、癌発症における具体的な役割についてはほとんど研究が進んでいなかった。

2. 研究の目的

申請者らは Lgr5 が大腸癌細胞株の造腫瘍性に必須の役割を果たしていることを見出し、さらに GATA6 が Lgr5 の発現を直接促進していることを明らかにしてきた。また、Lgr5 の下流シグナルについても解析を進めている。本研究では、これまでの研究成果をふまえ以下の研究を行う。(1) 大腸癌における Lgr5 関連シグナル伝達経路を明らかにする。(2) Lgr5 に対するリガンドは R-spondin 以外にも存在することを示唆する結果を得ているので、その実体を明らかにし、機能を解析する。(3) 我々の樹立した卵巣癌幹細胞株を用いて、Lgr5 の癌幹細胞における役割を解析する。これらの解析を通して、癌発症における Lgr5 の役割、機能を具体的に明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

癌発症における Lgr5 の役割、機能を具体的に明らかにするために以下の研究を行う。(1) 大腸癌における Lgr5 の発現制御機構を miR-363 に注目して解析する。(2) Lgr5 の活性制御機構と関連するシグナルの実体を次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析により明らかにする。(3) shRNA を用いたノックダウン実験、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析等により卵巣癌幹細胞株における Lgr5 の役割を解析する。

4. 研究成果

(1) GATA6-Lgr5 経路を制御する因子の探索・同定

大腸癌発生初期に働く因子を捉える為に GATA6 の上流で働く因子の同定を試みた。Lgr5 と GATA6 蛋白質は多くの大腸癌組織での発現が亢進しているが、GATA6 mRNA の発現に変化は認められなかった。その為、GATA6 は翻訳調節機構を通じた発現制御が行われている可能性が高いと予想し、microRNA による発現制御に着目した解析を遂行した。GATA6 mRNA の 3'UTR に結合する microRNA を推測し (microRNA 結合サイト予測プログラムの TargetScan を使用)、得られた候補 microRNA の中で大腸癌における発現が減衰しているものを選別したところ、miR-363 が GATA6 転写産物の翻訳制御候補因子として得られた。

DLD-1 細胞に miR-363 に対する pre-miRNA を強制発現すると、GATA6 及び Lgr5 の発現が抑制された。GATA6 遺伝子の 3'UTR には miR-363 のシード配列が 1ヶ所存在している。そこで、GATA6 の 3'UTR (GATA6 WT 3'-UTR)、および miR-363 のシード配列に変異を入れた Mutant (GATA6 Mut 3'-UTR) をルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したコンストラクトを構築し、ルシフェラーゼアッ

セイを行った。DLD-1 細胞に miR-363 に対する pre-miRNA とレポータープラスミドを Transfection すると、GATA6 WT 3'-UTR を使用した場合はレポーター活性の減衰が認められた。一方、GATA6 Mut 3'-UTR ではレポーター活性の減衰が起こらなかつた。これらの結果から、miR-363 は GATA6 の発現を直接制御し、GATA6/Lgr5 の上流因子として働いている可能性が示唆された。

(2) miR-363-GATA6-Lgr5 経路と腫瘍形成

大腸癌細胞の腫瘍形成における miR-363-GATA6-Lgr5 経路の重要性を調べる為に、レンチウイルスを用いて miR-363 を安定的に発現した DLD-1 細胞を作成し、免疫不全マウスの皮下への移植実験を行ったところ、miR-363 の強制発現によって造腫瘍性が大きく抑えられた。また、miR-363 を安定的に発現する DLD-1 細胞は軟寒天コロニー形成能の低下も認められたが、Lgr5 の過剰発現でレスキューできた。これらの結果から、miR-363-GATA6-Lgr5 経路の存在とその造腫瘍性への関与が深く示唆された (Tsuji* and Kawasaki* et al. (* co-first author) *Nat. Commun.*, 2014)。

(3) Lgr5 関連経路の解明

本研究課題を進める過程において、Lgr5 だけでは GATA6 のノックダウンで起こる現象を全て説明できないことが明らかになった。そこで、造腫瘍性に関わる新たな GATA6 標的因子の探索を遂行した。その結果、増殖因子の一種 REG4 も miR-363/GATA6 経路の直接の標的因子として機能し、Lgr5 と協調して癌細胞の腫瘍形成促進に関わっていることを明らかにした (Kawasaki et al. *Sci. Rep.* 2015)。

(4) 癌幹細胞の発生・維持における miR-363-GATA6-Lgr5 経路の重要性の検討

癌幹細胞は生体癌組織中に極わずかにしか存在しないと考えられている。しかし、細胞表面マーカーを指標とした FACS/MACS による分取や無血清培地を用いた非接着培養

によって、生体癌組織から癌幹細胞が多く含まれる細胞集団を精製できる。事実、卵巣明細胞癌幹細胞を EGF および FGF2 を含む無血清培地で培養することに成功し、得られた細胞群は極めて高い造腫瘍能を持つことが確認できた。その為、申請者らが使用する細胞は癌幹細胞を多く含んでいる細胞集団であると考えられた。今後、上記の miR-363 から Lgr5 に至る経路が癌幹細胞の造腫瘍性、自己複製能、未分化性維持機構に与える影響を検討する予定である。

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 11 件)

1. Sawada G, Niida A, Uchi R, Hirata H, Shimamura T, Suzuki Y, Shiraishi Y, Chiba K, Imoto S, Takahashi Y, Iwaya T, Sudo T, Hayashi T, Takai H, Kawasaki Y, Matsukawa T, Eguchi H, Sugimachi K, Tanaka F, Suzuki H, Yamamoto K, Ishii H, Shimizu M, Yamazaki H, Yamazaki M, Tachimori Y, Kajiyama Y, Natsugoe S, Fujita H, Mafune K, Tanaka Y, Kellsell DP, Scott CA, Tsuji S, Yachida S, Shibata T, Sugano S, Doki Y, Akiyama T, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S*, Mori M*, Mimori K*.

Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population.

Gastroenterology. 150, 1171-1182, 2016. doi:

10.1053/j.gastro.2016.01.035. 査読有り

2. Taniue K, Kurimoto A, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Iwasaki K, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Hiyoshi M,

- Kitayama J, Negishi L, **Kawasaki Y**, Akiyama T*.
Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 113, 1273-1288, 2016. doi: 10.1073/pnas.1500992113. 査読有り
3. **Kawasaki Y***, Matsumura K, Miyamoto M, Tsuji S, Okuno M, Suda S, Hiyoshi M, Kitayama J, Akiyama T*.
REG4 is a transcriptional target of GATA6 and is essential for colorectal tumorigenesis.
Sci. Rep. 5, 14291, 2015. doi: 10.1038/srep14291. 査読有り
4. Meng F, Meliton A, Moldobaeva N, Mutlu G, **Kawasaki Y**, Akiyama T, Birukova AA*.
Asef mediates HGF protective effects against LPS-induced lung injury and endothelial barrier dysfunction.
Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 308, L452-463, 2015. doi: 10.1152/ajplung.00170.2014. 査読有り
5. Hiraoka K, Hayashi T, Kaneko R, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, **Kawasaki Y**, Akiyama T*.
SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 460, 216-221, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.012. 査読有り
6. Tian X, Tian Y, Gawlak G, Meng F, **Kawasaki Y**, Akiyama T, Birukova AA*.
Asef controls vascular endothelial permeability and barrier recovery in the lung.
Mol. Biol. Cell, 26, 636-650, 2015. doi: 10.1091/mbc.E14-02-0725. 査読有り
7. Tian Y, Gawlak G, Shah AS, Higginbotham K, Tian X, **Kawasaki Y**, Akiyama T, Sacks DB, Birukova AA*.
Hepatocyte growth factor-induced Asef-IQGAP1 complex controls cytoskeletal remodeling and endothelial barrier.
J. Biol. Chem., 290, 4097-4109, 2015. doi: 10.1074/jbc.M114.620377. 査読有り
8. Sugimasa H, Taniue K, Kurimoto A, Takeda Y, **Kawasaki Y**, Akiyama T*.
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K upregulates the kinetochore complex component NUF2 and promotes the tumorigenicity of colon cancer cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 459, 29-35, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.043. 査読有り
9. Tsuji S[#], **Kawasaki Y**[#], Furukawa S, Taniue K, Hayashi T, Okuno M, Hiyoshi M, Kitayama J, Akiyama T*. ([#] co-first author)
The miR-363-GATA6-Lgr5 pathway is critical for colorectal tumourigenesis.
Nat. Commun., 5, 3150, 2014. doi: 10.1038/ncomms4150. 査読有り
10. Furukawa S, **Kawasaki Y**, Miyamoto M, Hiyoshi M, Kitayama J, Akiyama T*.
The miR-1-Notch3-Asef pathway is important for colorectal tumor cell migration.
PLoS One, 8, e80609, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080609. eCollection 2013. 査読有り
11. **Kawasaki Y**, Furukawa S, Sato R, Akiyama T*.

Differences in the localization of the adenomatous polyposis coli-Asef/Asef2 complex between adenomatous polyposis coli wild-type and mutant cells.

Cancer Sci., 104, 1135-1138, 2013. doi: 10.1111/cas.12180. 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

1. Kawasaki Y, Akiyama T.
MYU, a novel target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates CDK6 induction to promote cell cycle progression
第74回日本癌学会 2015.10.8 名古屋
2. Kawasaki Y, Akiyama T.
The Achilles' heel of cancers.
International Symposium on "Integrative Research on Cancer Microenvironment Network" 2015.9.11 東京
3. Kawasaki Y, Akiyama T.
MYU, a novel target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates CDK6 induction to promote cell cycle progression.
Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer
TGF- β Family and Cancer: Signal Network in Tumor Microenvironment.
2015.1.13 筑波
4. 川崎善博, 秋山徹.
APC 結合因子 Asef が関わる癌発症機構の解明
第1回 Tubulology 研究会 2013.8.25 東京

〔図書〕(計3件)

1. 川崎善博, 秋山徹
微小環境を標的とした分子標的治療,
日本臨床, 73, 1283-1287, 2015.
2. 川崎善博

Wnt シグナル : LRP5/6, R-spondin, LGR5,

サイトカイン・増殖因子キーワード事典 : 362-363, 371-372, 2015.

3. 古川史織, 川崎善博, 秋山徹
APC 結合タンパク質 Asef を標的としたがん微小環境の制御
がん基盤生物学, 64-70, 2013.

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

川崎 善博 (KAWASAKI, Yoshihiro)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号 : 10376642

(2) 研究分担者

岡本 愛光 (OKAMOTO, Aikou)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20204026

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :