

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861196

研究課題名(和文)大腸癌進展におけるSPINK1の分子機構の解明と新規分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of molecular pathway of SPINK1 in colorectal cancer and its application to new molecular target therapy

研究代表者

井田 智 (Ida, 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：80583038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1)は上皮増殖因子との構造上の類似点があり、細胞増殖活性を有するユニークなトリプシンインヒビターである。まずヒト大腸癌組織の55%でSPINK1が発現していることを確認した。次に大腸癌細胞株および遺伝子改変マウスを用いて、SPINK1の過剰発現系および抑制系モデルを作製し、大腸癌の増殖を検討した。その結果、SPINK1の発現に応じて、腫瘍の増殖が有意に変化した。以上より、SPINK1は大腸癌細胞の増殖に寄与しており、大腸癌の進展に影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：Serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) is mainly produced in pancreatic acinar cells. However, SPINK1 is expressed in various cancers and inflammatory states, such as colon cancer and inflammatory bowel disease. There are structural similarities between SPINK1 and epidermal growth factor (EGF).

Here, immunohistochemical staining for SPINK1 was observed in a high percentage of colorectal cancer patient specimens and SPINK1 induced proliferation of human colon cancer cell lines. To clarify its role in colon cancer in vivo, a mouse model exposed to the colon carcinogen azoxymethane and nongenotoxic carcinogen dextran sodium sulfate revealed that Spink3 (mouse homolog of SPINK1) is overexpressed in cancerous tissues. In Spink3 heterozygous mice, tumor multiplicity and tumor volume were significantly decreased compared with wild-type mice. These results suggest that SPINK1/Spink3 stimulates the proliferation of colon cancer cells and is involved in colorectal cancer progression.

研究分野：消化器外科

キーワード：SPINK1 大腸癌 EGFR

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) はじめに:

セリンプロテアーゼインヒビター Kazal タイプ 1 (serine protease inhibitor Kazal, type 1; SPINK1、マウス相同体 Spink3)は 1948 年 Kazal らがウシ膵臓から分離、精製したトリプシン・インヒビターであり、哺乳動物の膵液中に分泌される。プロテアーゼの機能解析は進んでいるが、そのインヒビターの生理的意義はまだよく知られていない。

### 2) SPINK1 と炎症性疾患との関連:

SPINK1 はクローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患患者の非活動期の粘膜に高発現しており、腸管粘膜損傷時の修復や安定化に関与しているといわれている。

### 3) SPINK1 と癌の関連:

SPINK1 は胃癌、大腸癌、膵癌、卵巣癌、前立腺癌といった様々な癌種で発現していることが確認されており、とくに前立腺癌では腫瘍マーカーとしての有用性が報告されている。また SPINK1 は NIH 3T3 fibroblast、ヒト内皮細胞、腸管上皮細胞やラット膵癌細胞の増殖を促進すると以前より報告されており、その細胞増殖活性が注目されてきた。SPINK1 に細胞増殖促進活性があるとの報告以来、SPINK1 と上皮増殖因子 (Epidermal growth factor; EGF) との構造上の類似点が指摘されていた。いずれのタンパクとも分子量が約 6 kDa であり、約 50% のアミノ酸配列相同性と 3 つの分子内ジスルフィド結合を有する。我々は SPINK1 が EGF 受容体 (EGFR) のリガンドとして働き、膵癌細胞株の増殖を促進させることを報告してきた。

このように SPINK1 はプロテアーゼ・インヒビター以外にも癌において重要な役割を担っている可能性が示唆されるが、その機能解析は進んでいない。

## 2. 研究の目的

大腸癌に対して新規抗癌剤、分子標的治療薬など様々な治療戦略が研究されている。本研究ではユニークなプロテアーゼ・インヒビターである SPINK1 に注目し、大腸癌増殖における SPINK1 の機能を解明し、新規治療ターゲットとしての可能性を見出すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

SPINK1 が EGF と構造上類似し、細胞増殖活性をもつ点、炎症性腸疾患患者において腸管粘膜損傷時の再生に SPINK1 が関与している点、また慢性膵炎モデルマウスにて、前癌病変とされる膵管上皮の過形成にともない Spink3 が強発現する点などから、SPINK1/Spink3 が慢性炎症と癌化をつなぐ一因子である可能性に注目している。

そこで、今回は以下の方法にて SPINK1 の機能解析を行った。

1) 炎症性腸疾患モデルでの Spink3 の発現: 大腸炎の作製にはヒト炎症性腸疾患に類似するマウスモデルとして汎用されるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium; DSS) 投与モデルを用いた。生後 8 週齢の C57BL/6J マウスに 5%DSS を 7 日間自由飲水させ、体重減少、下血の有無、便の性状より算出される Disease activity index (DAI) にて臨床的な腸炎の重症度を判定し、また hematoxylin-eosin (HE) 染色にて腸炎の組織学的変化を評価した。

### 2) 炎症関連大腸癌における Spink3 の発現

大腸癌の作製には、化学発癌物質であるアゾキシメタン (azoxymethane; AOM) に DSS を併用したマウスモデルを用いた。

AOM 投与後 16 週後にマウスを sacrifice し、腫瘍個数および体積を計測した。また、癌部、非癌部よりタンパクを抽出し、ウェスタンブロットティングにて、Spink3 の発現を評価した。

### 3) トランスジェニックマウスを用いた大腸癌増殖の検討

SPINK1 ゲノム DNA を改変した 2Kb の SPINK1 minigene を作成し、マウスにてユビキタスに発現する CAG プロモーターを結合させた、トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、SPINK1 の過剰発現モデルとした。また、Spink3 ヘテロマウスを用いて、発現抑制系のモデルとした。

これらの遺伝子改変モデルマウスに AOM+DSS を投与し、16 週後の腫瘍個数および体積を計測した。

さらに X-gal 染色にて Spink3 の局在を検討した。

### 4) 大腸癌細胞株を用いた in vitro 解析

まず、代表的な大腸癌細胞株 (HCT116、SW620、HT 29、Colo205) を用いて RT-PCR にて SPINK1 の発現を検討した。

大腸癌細胞株に SPINK1 をターゲットとした small interfering RNA (siRNA) を導入し、SPINK1 の発現を抑制した。また、ゲノム DNA を改変した minigene を作製し、細胞内へ導入することで SPINK1 の過剰発現系を作成した。72 時間培養後の細胞数をカウントした。

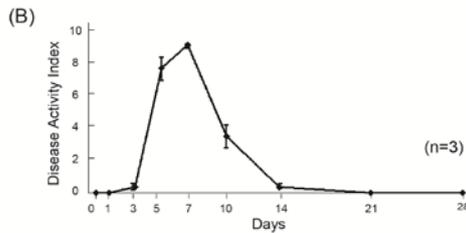
### 5) ヒト大腸癌での発現

大腸癌切除標本を用いて抗 SPINK1 抗体を用いた免疫染色を行い、大腸癌組織での SPINK1 の発現を検討した。

## 4. 研究成果

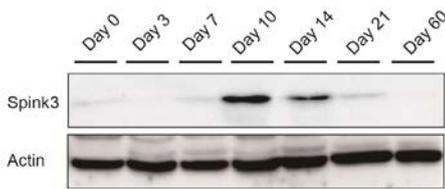
1) DSS 投与 2 日目より次第に軟便かつ便潜血が陽性になり、4 日目にはほぼ全例で肉眼的血便となった。臨床所見より算出した DAI は DSS 投与後 6 日目がピークとなり、その後漸減した。組織学的には DSS 投与後 7 日目より再生上皮が確認され、臨床所見とあわ

腸炎スコアの計時的変化



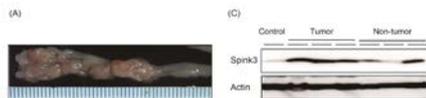
せると7日目以降を再生期とすることができる。さらに腸炎経過中のSpink3の発

Spink3の発現変化



現をウェスタンブロットにて経時的に検討したところ、腸管再生期の7日目以降にSpink3が顕著に発現した。Spink3は腸管上皮細胞の増殖により、腸管上皮の再生に寄与するのではないかと考えられた。

2) AOM投与後16週目に直腸より左側結腸にかけて1匹あたり平均4.6個の隆起型の腫瘍を認め、HE染色ではヒト大腸癌に類似する管状腺癌様の組織像だった。また、大腸癌部にてSpink3が強発現していた。

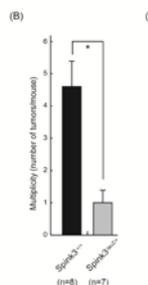


(A) 腫瘍肉眼像、(B) 腫瘍組織像  
(C) Spink3の発現 (ウェスタンブロットイング)

3) SPINK1Tgマウスでは有意に腫瘍個数と腫瘍体積が有意に増加した。SPINK1のマウスホモログであるSpink3のヘテロマウスに同様の方法で大腸癌を発癌させると、野生型と比較し有意に腫瘍個数が減少した。

X-gal染色にて、Spink3は大腸癌部で非癌部に比べて発現が強く、癌上皮に発現していた。

Spink3ヘテロマウスでの腫瘍個数



4) 細胞によりSPINK1の発現に差があり、Colo205、HT29での発現が最も強かった。大腸癌細胞株にこのSPINK1 minigeneを導入し、過剰発現させるとその細胞数は有意に増加した。またsiRNAを導入しSPINK1の発現を抑制すると、細胞数は有意に減少した。

5) 55%の大腸癌患者でSPINK1が発現していた。なかでもSPINK1は分化型および、より進行度の高い症例で有意に高発現していた。

以上の結果より、SPINK1/Spink3は炎症により誘導され、腸管粘膜再生過程での細胞増殖に貢献するが、その増殖刺激がプロモーター刺激となり大腸癌発癌に向かうのではないかと考えられた。SPINK1は大腸癌の発癌や進展において重要な役割を担っていると考えられる。

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)

1. Ida S, Ozaki N, Araki K, Hirashima K, Zaito Y, Taki K, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Oki E, Morita M, Watanabe M, Maehara Y, Yamamura K, Baba H, Ohmuraya M. SPINK1 status in colorectal cancer, impact on proliferation, and role in colitis-associated cancer. Mol Cancer Res. 査読有、13(7):1130-8, 2015. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0581.

[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 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

井田 智 (Ida Satoshi)  
公益財団法人がん研究会・消化器外科・  
副医長

研究者番号：80583038

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：