

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461025

研究課題名(和文) 肝癌由来TCF-4 isoformにはWnt5a/b発現の分子スイッチが内在する

研究課題名(英文) Molecular switch for WNT5A/B expression through TCF-4 isoforms in human liver cancer cells

研究代表者

古賀 浩徳 (Koga, Hironori)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90268855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TCF-4アイソフォームTCF-4Kに内在するSxxSS motifの変異体K-mutant 269AにおいてWNT5A mRNAおよび蛋白発現を強く認めた。ChIPアッセイではK-mutant 269AのWNT5A promoter領域への直接結合が確認されたことより、TCF-4はSxxSS依存的にWNT5Aの発現を調節していることが示唆された。また、WNT5AをノックダウンによりSLUG発現が顕著に低下したことから、TCF-4はSxxSSモチーフ依存性にWNT5Aの発現調節を介しEMTを制御している可能性が示唆された。SxxSSのセリン残基のリン酸化にはHIPK-2の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that a mutant isoform (269A) of the SxxSS-harboring TCF-4K robustly expressed WNT5A at both mRNA and protein levels in human liver cancer cells. ChIP assay revealed that the mutant TCF-4 could directly bind to promoter region of WNT5A gene, suggesting the motif contributed to regulate the gene expression. Knockdown of WNT5A resulted in upregulation of the EMT regulator SLUG. These findings suggest that TCF-4 regulates WNT5A expression in a SxxSS motif-dependent manner, thereby contributing to phenotypic changes, including EMT. In addition, HIPK-2 was suggested to be responsible for phosphorylation of serine residues of SxxSS.

研究分野：消化器病学

キーワード：Wntシグナル T-cell factor-4 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト肝癌細胞株から Wnt シグナル中枢転写因子である T-cell factor (TCF)-4 の isoform を 14 クローン同定した (Exp Cell Res 2011).そして, Isoform に内在する機能モチーフ「SxxSS」と癌(幹)細胞形質との関わりに焦点を当て、「SxxSS」が肝癌細胞の1)造腫瘍能,2)低酸素耐性(以上,PLoS ONE 2012),3)抗アポトーシス形質を鋭く制御していること(投稿準備中)を見出してきた.

このTCF-4 isoformのヒト肝細胞癌進展への関与に関し,我々は以下の仮説を考えている。「仮説:実際にヒトHCCで発現しているTCF-4JやTCF-4Kなどのisoformは,通常の*in vitro*における転写アッセイ系ではその活性が低いがゆえに看過されがちであるが,実際には低酸素耐性や造腫瘍能,薬剤耐性(抗アポトーシス)などの,いわゆる癌幹細胞(CSC, cancer stem cell)や幹細胞などにおける重要な形質を制御している可能性がある」。実際,“quiescent CSC”では増殖能はむしろ低く,Wntシグナルが“Off”の状態であることも(Li & Clevers, Science 2010),上記の仮説に矛盾しない.

このような背景のもと,我々は「SxxSS」の新たな機能を見出した。「Wnt5a/b-SLUG軸を介した上皮間葉移行(EMT)制御の可能性」である。予備実験では,「SxxSS」先頭のセリン残基 S269 をアラニンに置換した変異体(269A)を過剰発現させた細胞(269A細胞)でWnt5a/bの強い発現が認められ,それに伴いEMTに関連するSLUGの強発現やJNKの活性化も見られた。また,SLUGで誘導されるEMTの際に活性化するIGF-IR (Sivakumar et al., Int J Oncol 2009)も確認され,細胞形態も変化した。次に,その269A細胞のWnt5aを特異的にノックダウンしたところ,SLUG発現の顕著な低下を認めた。これらの結果から,ヒト肝癌細胞では,「SxxSS」先頭のセリンが脱リン酸化されたときにのみWnt5aを介するSLUGのupregulationが惹起され,EMTが誘導される可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では「SxxSS」が“non-canonical Wntシグナル伝達系”の主要リガンド**Wnt5a/b**の転写制御に直接関わっていることや,その機構が上皮間葉移行(EMT)といかに関連しているかを追及することである。とくに,「SxxSS」の先頭のセリン残基が,脱リン酸化を介したWnt5a/b分泌およびEMT誘導の“分子スイッチ”になっている可能性があり,それに関わる酵素群が癌治療における分子標的になりうるかについても検討することである。

3. 研究の方法

まずベクター系の構築をおこなう。Empty

vector (EV),TCF-4J(SxxSSなし),TCF-4K(SxxSSあり),K-mutant 269A(AxxSS),K-mutant 272A(SxxAS),K-mutant 273A(SxxSA)作成し,それぞれを過剰発現させた細胞株を樹立する。

それらを用いて,TCF-4K内の機能モチーフ「SxxSS」先頭のセリン残基 S269 について,以下の分子生物学的解析をおこなう。Wnt5a/bの発現調節機構, non-canonical Wnt5a/bシグナル系とSLUG関連EMTのクロストーク。次にK変異体269A発現細胞の特徴的形質とその意義を検討する。産生されるWnt5a/bが分泌され機能するか,別のHCC細胞等との共培養系でその役割を解析する。さらに,このユニークな「SxxSS」モチーフを有するTCF-4KがヒトHCC組織のどこに存在するのかをレーザーマイクロダイセクション法にて検出する。最後に,S269をリン酸化する酵素を同定する。候補としてNLKやHIPK2との共発現系での会合などから検討していくが,プロテオミクスの手法で「SxxSS」のセリン残基に対する責任キナーゼを同定し,標的に資するかを評価する。

4. 研究成果

Wnt5a/bの発現調節機構およびnon-canonical Wnt5a/bシグナル系とSLUG関連EMTのクロストークに関して:予備実験で見られたように,「SxxSS」先頭のセリン残基 S269 をアラニンに置換した変異体(269A)を過剰発現させた細胞(269A細胞)で最もWnt5aの発現が増強していた。その程度は対照群に比しmRNAレベルで40~50倍程度であった。この発現は「SxxSS」がないTCF-4Jを強発現させた細胞(J細胞)では見られず,また272A細胞,273A細胞でも見られなかった。したがって,S269がWnt5aの発現に極めて重要な働きをしていることが示唆された。この269A細胞ではSLUGの発現も恒常的に亢進しており,細胞形態もやや紡錘形に変化するなどEMT誘導状態に合致する所見が観察された。その条件でWnt5aをノックダウンするとSLUGの発現が減少したことから,分泌されたWnt5aがautocrine的にSLUG発現亢進をもたらし,EMT誘導とその保持に積極的に働いている可能性が示唆された。

K変異体269A発現細胞の特徴的形質とその意義:本細胞のEMTはグルコース欠乏状態で増強し,生存に寄与した。このことは栄養飢餓状態など細胞生存にとって必ずしも有利でない状態への形態的・機能的適応において,「SxxSS」依存的TCF-4シグナルが極めて大きい影響を与えている可能性を示唆する。

このユニークな「SxxSS」モチーフを有するTCF-4KがヒトHCC組織のどこに存在するのか:そこでこのTCF-4K isoformを多く有する肝癌細胞のヒト組織での局在を求め

るべくレーザーマイクロダイセクション法で検討を試みた。低酸素・低栄養状態が想定される腫瘍カプセル内癌組織，門脈腫瘍栓組織，IVR 治療生存癌組織などから FFPE 法により RNA の抽出をおこなった。RNA レベルは解析可能であったが，isoform の同定は困難であった(14 isoforms が存在する性質上，PCR 法が使えないため)。

S269 をリン酸化する酵素を同定する：NLK (Nemo-like kinase) や HIPK-2 (Homeodomain-interacting protein kinase 2) を候補キナーゼとして取り組んだ。その結果，NLK では「SxxSS」の有意なリン酸化は観察されなかったが，HIPK-2 によってリン酸化が促進されることがわかった。TOP/FOP assay による検討では，「SxxSS」のセリン残基のリン酸化はそれを内在する TCF-4K の転写活性を低下させた。また，HIPK-2 と TCF-4K とを共発現させた細胞において TCF-4K と複合体を構成する蛋白を免疫沈降によって調べたところ，リプレッサーである CtBP や TLE が結合していることがわかった。したがって，HIPK-2 が「SxxSS」のリン酸化を介して TCF-4 の beta-catenin 依存的転写活性を負に制御している機構の一端がわかった。ただし，269 番目のセリン残基特異的リン酸化か否かに関しては結論が得られなかった。したがって，siRNA を用いて HIPK-2 をノックダウンした際，TCF-4K の転写活性は確かに上昇するものの，それが Wnt5a/SLUG の発現増強を伴った EMT と連動しなかった。269 番目のセリン残基を特異的に脱リン酸化する酵素の同定が課題として残った。

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)

Yoshida T, Akiba J, Matsui T, Nakamura K, Hisamoto T, Abe M, Ikezono Y, Wada F, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Yamagishi SI, Torimura T. Pigment Epithelium-Derived Factor Prevents Hepatic Fat Storage, Inflammation, and Fibrosis in Dietary Steatohepatitis of Mice. *Dig Dis Sci*. 査読有, 2017, 62(6), 2017, 1527-1536.

Doi: 10.1007/s10620-017-4550-x

Ikezono Y, Koga H, Akiba J, Abe M, Yoshida T, Wada F, Nakamura T, Iwamoto H, Masuda A, Sakaue T, Yano H, Tsuruta O, Torimura T. Pancreatic Neuroendocrine Tumors and EMT Behavior Are Driven by the CSC Marker DCLK1. *Mol Cancer Res*. 査読有, 2017, 15(6), 2017, 744-752.

Doi: 10.1158/1541-7786

Kawaguchi T, Ueno T, Nogata Y, Hayakawa M, Koga H, Torimura T. Wheat-bran autolytic peptides containing a branched-chain amino acid attenuate non-alcoholic steatohepatitis via the suppression of oxidative stress and the upregulation of AMPK/ACC in high-fat diet-fed mice. *Int J Mol Med*. 査読有, 39(2), 2017, 407-414.

Doi: 10.3892/ijmm.2016.2831

Koga H, Ikezono Y, Torimura T. Pancreatic DCLK1 marks quiescent but oncogenic progenitors: a possible link to neuroendocrine tumors. *Stem Cell Investig*. 査読有, 3:37, 2016.

Doi: 10.21037/sci.2016.08.03.

Nakano M, Tanaka M, Kuromatsu R, Nagamatsu H, Satani M, Niizeki T, Okamura S, Iwamoto H, Shimose S, Shirono T, Noda Y, Koga H, Torimura T; Kurume Liver Cancer Study Group Of Japan. Alternative treatments in advanced hepatocellular carcinoma patients with progressive disease after sorafenib treatment: a prospective multicenter cohort study. *Oncotarget*. 査読有, 7(39), 2016, 64400-64409.

Doi: 10.18632/oncotarget.10794

Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Abe M, Ikezono Y, Wada F, Sakaue T, Masuda H, Hashimoto O, Koga H, Ueno T, Yano H. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Aflibercept, a Soluble VEGF Receptor-1 and -2, in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasia*. 査読有, 18(7), 2016, 413-424.

Doi: 10.1016/j.neo.2016.05.001

Nakamura T, Koga H, Iwamoto H, Tsutsumi V, Imamura Y, Naitou M, Masuda A, Ikezono Y, Abe M, Wada F, Sakaue T, Ueno T, Ii M, Alev C, Kawamoto A, Asahara T, Torimura T. Ex vivo expansion of circulating CD34(+) cells enhances the regenerative effect on rat liver cirrhosis. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 査読有, 3, 2016, 16025.

Doi: 10.1038/mtm.2016.25

Nagamatsu H, Sumie S, Niizeki T, Tajiri N, Iwamoto H, Aino H, Nakano M, Shimose S, Satani M, Okamura S, Kuromatsu R, Matsugaki S, Kurogi J, Kajiwara M, Koga H, Torimura T. Hepatic arterial infusion chemoembolization therapy for advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有, 77(2), 2016, 243-250.

Doi: 10.1007/s00280-015-2892-7

Ikezono Yu, Koga H, Abe M, Akiba J,

Kawahara A, Yoshida T, Nakamura T, Iwamoto H, Yano H, Kage M, Sata M, Tsuruta O, Torimura T. High expression of the putative cancer stem cell marker, DCLK1, in rectal neuroendocrine tumors. *Oncol Lett.* 査読有, 10(4), 2015, 2015-2020.

PubMed PMID: 26622789; PubMed Central PMCID: PMC4579808

Nakano M, Tanaka M, Kuromatsu R, Nagamatsu H, Tajiri N, Satani M, Niizeki T, Aino H, Okamura S, Iwamoto H, Shimose S, Shirono T, Koga H, Torimura T; Kurume Liver Cancer Study Group of Japan. Sorafenib for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: a prospective multicenter cohort study. *Cancer Med.* 査読有, 4(12), 2015, 1836-43.

Doi: 10.1002/cam4.548

Kawaguchi T, Hayakawa M, Koga H, Torimura T. Effects of fucoidan on proliferation, AMP-activated protein kinase, and downstream metabolism and cell cycle-associated molecules in poorly differentiated human hepatoma HLF cells. *Int J Oncol.* 査読有, 46(5), 2015, 2216-2222.

Doi: 10.3892/ijo.2015.2928.

Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Izaguirre-Carbonell J, Kamisuki S, Sugawara F, Abe M, Iwabata K, Ikezono Y, Sakae T, Masuda A, Yano H, Ohta K, Nakano M, Shimose S, Shirono T, Torimura T. Inhibition of hypoxia-inducible factor via upregulation of von Hippel-Lindau protein induces "angiogenic switch off" in a hepatoma mouse model. *Mol Ther Oncolytics.* 査読有, 2:15020, 2015.

Doi: 10.1038/mto.2015.20

Nakamura T, Torimura T, Iwamoto H, Kurogi J, Inoue H, Hori Y, Sumie S, Fukushima N, Sakata M, Koga H, Abe M, Ikezono Y, Hashimoto O, Ueno T, Oho K, Okamura T, Okuda S, Kawamoto A, Ii M, Asahara T, Sata M. CD34(+) cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 査読有, 29(10), 2014, 1830-1838.

Doi: 10.1111/jgh.12622

〔学会発表〕(計 12 件)

古賀浩徳

「Wnt 下流分子 Claudin-2 による肝癌 Notch シグナルの制御」, 第 29 回 日本バイセラピイ学会学術集会総会、2016 年 12 月 1 日~2

日、久留米市

Hironori Koga

「Wnt isoform upregulates CLAUDIN-2, thereby activating NOTCH signaling in human liver cancer cells」, 第 75 回 日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日~8 日、横浜市

古賀浩徳

「幹細胞未分化状態維持因子 Hes1 は Notch および Wnt からの dual regulation を受ける」, 第 102 回 日本消化器病学会総会、2016 年 4 月 21 日~23 日、東京

Hironori Koga

「Regulation of Hes1 expression by the Wnt transcription factor T-cell factor-4」, AACR 2016、2016 年 4 月 16 日~20 日、New Orleans

Hironori Koga

「T-cell Factor-4 isoforms participate in EMT through Wnt5a induction in human liver cancer cells」, UEGW 2015、2015 年 10 月 24 日~30 日、Barcelona

Hironori Koga

「Expression of Hes1, a Notch regulator of biliary features, is regulated by T-cell Factor-4 isoforms」, JDDW 2015、2015 年 10 月 8 日~11 日、東京

Hironori Koga

「The SxxSS motif of T-cell Factor-4 isoforms regulates Wnt5a expression and EMT in human liver cancer cells」, APPLE 2015、2015 年 7 月 3 日~5 日、大阪市

古賀浩徳

「TCF-4 の構造的差異による肝癌細胞 stemness 形質の制御」, 第 51 回 日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21 日~22 日、熊本市

Hironori Koga

「The SxxSS motif of T-cell Factor-4 isoforms regulates Wnt5a expression and EMT in human liver cancer cells」, AACR 2015、2015 年 4 月 18 日~22 日、Philadelphia

古賀浩徳

「Wnt シグナル転写因子 TCF-4 による細胞機能調節機構」, 第 46 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会(シンポジウム 2)、2014 年 10 月 17 日、東京

Hironori Koga

「The SxxSS motif of T-cell Factor-4 isoforms regulates non-canonical Wnt signaling in liver cancer cells」, 第 73 回 日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜市

Hironori Koga

「The Wnt signal transcription factor TCF-4 directly regulates Bcl-xL expression in human hepatocellular carcinoma cells」, AACR 2014、2014 年 4 月 6 日、San Diego

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentana/staff/liver.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

古賀浩徳（KOGA, Hironori）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90268855