

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860261

研究課題名(和文) 胃がんの進行過程におけるWntシグナル活性の制御

研究課題名(英文) Regulation of Wnt signaling in the development of gastric cancer

研究代表者

高岸 麻紀 (Takagishi, Maki)

名古屋大学・医学系研究科・研究機関研究員

研究者番号：10723918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃がんの発生や進行において、どの細胞内シグナルが活性化されるのかを解析しています。癌細胞が胃粘膜からより深部へ広がり、他の組織へ転移していく過程で、癌細胞内ではWntシグナル非古典的経路によって、癌細胞の運動性が増していました。今回我々は、細胞内足場タンパクDapleが、胃がん細胞内でWntシグナルによる細胞運動を制御していることを発見しました。胃がん細胞内のDapleタンパク質の発現を抑制することによって、胃がんの転移を抑えることができました。Dapleタンパク質を利用して、胃がんの分子標的治療へ応用できる可能性が示唆されました。

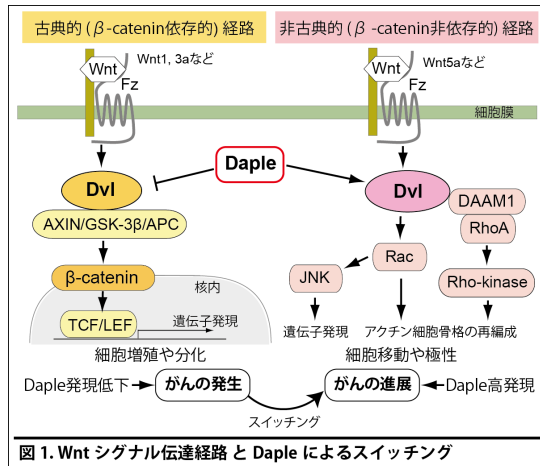
研究成果の概要(英文)：We analyze which intracellular signals are activated during the development and progression of gastric cancer. When cancer cells infiltrate and metastasize, its motility has been increased by the non-canonical Wnt signaling pathway. Here we have discovered that the intracellular scaffold protein Daple controls cell motility by the non-canonical Wnt signaling in gastric cancer cells. Daple depletion also suppressed liver metastasis in a mouse xenograft model of gastric cancer. These results suggest that the non-canonical Wnt signaling pathway contributes to gastric cancer progression at least in part via Daple, which provides a new therapeutic opportunity for the treatment of the disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：Wntシグナル 胃がん Daple

1. 研究開始当初の背景

個体発生やがんの進展において、細胞内シグナル伝達の一つ、Wnt シグナルの活性が細胞増殖や分化を制御している。Wnt シグナルには、 β -catenin 依存的に遺伝子の転写を引き起こす古典的経路と、 β -catenin 非依存的に細胞極性や細胞運動をもたらす非古典的経路が存在する (図 1)。



胃がんの組織において、細胞内 Wnt シグナルの古典的・非古典的経路の活性化見られる領域は棲み分けられており、それぞれの活性化状態で組織像が異なっている。Lauren 組織型分類の Intestinal type (腸型) 胃がんにおいては、古典的 Wnt シグナル経路の活性を表す β -catenin の核内局在が多いと報告されている (*J.Clin.Oncol*, 2003)。一方 Diffuse type (びまん型) 胃がんでは非古典的経路のリガンド Wnt5a の発現が報告され、がんの悪性度や予後と相関することが示された (*Cancer Res*, 2006)。この棲み分けは、古典的経路から非古典的経路へ、増殖・分化するがん細胞から浸潤・転移するがん細胞へ、がん細胞の進行過程を表しているのではないかと考えた。

研究代表者はこれまでに、Wnt シグナル古典的・非古典的経路両シグナルに必須の足場蛋白質 Dvl と結合する分子 Daple (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) の機能を解析しており、Daple が Dvl 蛋白質複合体形成を改変することで、非古典的経路の Rac 活性や細胞移動を誘導していることを報告した (図 1, *Nat Commun*, 2012)。一方で、Daple は非古典的経路である β -catenin の蓄積を抑制していることが報告されている (図 1, *Genes Cells*, 2003)。しかし、個体内やがん組織において、Daple が Wnt シグナル両経路をどのように制御しているのかは、わかって

いなかった。

2. 研究の目的

本研究では、古典的経路を抑制する一方で非古典的経路を促進する Wnt シグナル制御分子 Daple を用いて、胃がんの進行過程において Wnt シグナル両経路の切り替えが起こり得るのか検証し、さらにその制御機構を解明する。Daple の発現パターンと Wnt シグナル両経路の活性状態が相関するのか解析し、Daple が古典的経路から非古典的経路へ、シグナル活性の切り替えに機能しているのかを検証する。

最終的には、胃がんが進行する過程の分子メカニズムと組織像の変化を明らかにし、胃がんの進行を防ぐことを目的とした。

3. 研究の方法

胃がんの各ステージにおける古典的・非古典的経路 Wnt シグナルの活性化状態と Daple の発現パターンを解析する。名古屋大学附属病院にて胃がん手術で摘出された腫瘍組織から組織切片を作成し、免疫染色によって Daple の発現部位や Wnt シグナル各経路の活性化状態を解析する。古典的経路の活性化状態は β -catenin の免疫染色をして核内もしくは細胞質内局在で判定し、非古典的経路の活性化は、Wnt5a/b 抗体の染色陽性度で判定した。同一症例内においても、非古典的経路活性化部位と非古典的経路活性化部位で組織像が異なるため、それぞれの活性化状態と組織像、Daple 発現パターンが相関するのか解析する。また、Daple の染色陽性度と組織型やがんの進行度、転移、予後との関連性を統計解析する。

同時に、胃がん細胞株を用いて、Wnt シグナルの活性化状態とがん細胞の運動性、浸潤能を解析する。Daple の発現を変えることで、胃がん細胞の浸潤能を抑制できないか、in vitro invasion assay で解析する。最終的に、マウス脾臓に Daple 発現パターンを変えた胃がん細胞を導入し、肝臓への転移度を評価する。

なお本研究では臨床情報や手術検体を利用するため、名古屋大学生命倫理審査委員会の承認を得た。

4. 研究成果

まず胃がん組織切片の免疫染色によって、Wnt シグナル古典的経路の活性化状態を示す β -catenin の核内局在と、非古典的経路を活性化するリガンド Wnt5a の発現パターン

表1. 胃がん組織におけるDaple陽性度とWnt5a/b陽性度、β-catenin 活性の関連

	Total		Daple positive		P - value
	n	(%)	n	(%)	
Wnt5a/b positivity					
Wnt5a/b positive	75	(57.7)	66	(88.0)	<0.001
Wnt5a/b negative	55	(42.3)	19	(34.5)	
β-catenin activity					
Nuclear/cytoplasm	65	(50.0)	29	(44.6)	0.32
Others	65	(50.0)	11	(16.9)	

(Wnt5a/b 染色陽性度) を検証した結果、先行論文と同様に両者の染色パターンは棲み分けられており、非古典的経路 Wnt5a は散在して浸潤する低分化な胃がん細胞に高発現していた。一方古典的経路 β-catenin の局在化は、高分化で接着性の強い胃がん細胞に見られた

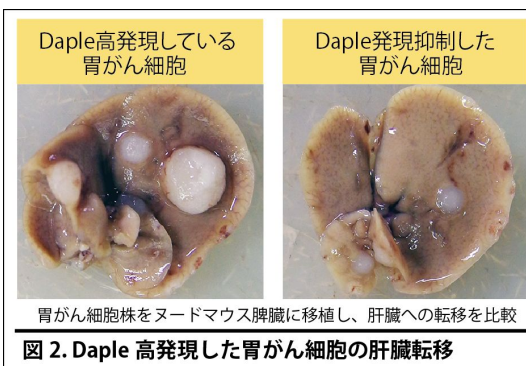
Daple の陽性度は Wnt5a/b の陽性度と相関が見られたが、β-catenin の活性とは負の相関も見られなかった(表1)。当初予測していた「Daple の高発現による古典的経路 β-catenin 活性の抑制」は、胃がん組織では証明できなかった。Daple が低発現でも古典的経路の活性が見られない場合が多く、Wnt シグナル以外の機序による胃がんの発生も考えられた。

さらに in vitro においても、Daple の過剰発現は胃がん細胞株の増殖には影響しなかったことから、Daple の発現パターンによる Wnt シグナル経路のスイッチングは、胃がんでは確認できなかった。

しかし、Daple の染色陽性度は胃がんの浸潤度と相関し、特に、細胞の接着性が低下し散在して浸潤する Diffuse-scatter type の胃がん細胞に Daple の発現が高かった。これは Wnt5a や非古典的経路によって転写誘導される Laminin-gamma2 と同じ発現パターンであった。

胃がん細胞株を用いた in vitro invasion assay においても、Daple の発現パターンと Wnt シグナル非古典的経路によるがん細胞の浸潤度は相関していた。Daple と Wnt5a が高発現する胃がん細胞株は浸潤度が高かった。Wnt5a の発現が低い胃がん細胞株に Wnt5a を強制発現させるとがん細胞の浸潤度は増すが、Daple の発現を抑制すると、Wnt5a による浸潤誘導は抑制された。

また、マウス肝臓に胃がん細胞を導入して肝臓への転移を評価した結果、Daple の発現を抑制した胃がん細胞は、Daple が高発現している胃がん細胞に比べて、肝臓への転移が減少していた(図2)。



これらの結果から、Daple は胃がん細胞において、Wnt シグナル非古典的経路を特異的に調節し、がん細胞の浸潤能を促して転移を誘導していると考えられた。本研究成果は科学雑誌「Cancer Science」にて発表した。

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3件)

Hosne Ara, Maki Takagishi, Atsushi Enomoto, Masato Asai, Kaori Ushida, Naoya Asai, Yoshie Shimoyama, Kozo Kaibuchi, Yasuhiro Kodera and Masahide Takahashi. 「A role for Daple in non-canonical Wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis」『Cancer Science』 vol.107.2, pp133-139, 2016. doi: 10.1111/cas.12848. 査読あり

Liang Weng, Atsushi Enomoto, Hiroshi Miyoshi, Kiyofumi Takahashi, Naoya Asai, Nobuhiro Morone, Ping Jiang, Jian An, Takuya Kato, Keisuke Kuroda, Takashi Watanabe, Masato Asai, Maki Ishida-Takagishi, Yoshiki Murakumo, Hideki Nakashima, Kozo Kaibuchi and Masahide Takahashi. 「Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin」『The EMBO Journal』 vol. 33, 18, pp2098-2112, 2014. doi: 10.15252/embj.201488289. 査読あり

Takuya Kato, Atsushi Enomoto, Takashi Watanabe, Hisashi Haga, Sumire Ishida, Yuji Kondo, Koichi Furukawa, Takeshi Urano, Shinji Mii, Liang Weng, Maki Ishida-Takagishi, Masato Asai, Naoya Asai, Kozo Kaibuchi, Yoshiki Murakumo and Masahide Takahashi. 「TRIM27/MRTF-B-Dependent Integrin 1 Expression Defines Leading Cells in Cancer Cell Collectives」『Cell Reports』 vol.7, 22, pp 1156-1167, 2014. doi: 10.1016/j.celrep. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

高岸麻紀, 高橋雅英 「先天性水頭症をもたらす Daple 遺伝子改変マウスの脳室壁繊毛異常」第 9 回日本水頭症脳脊髄液学会学術集会, 名古屋市立大学桜山キャンパス (愛知県名古屋市), 2016 年 11 月 13 日

Maki Takagishi, Masahide Takahashi. 「Daple coordinates planar polarized microtubule dynamics」第 6 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム, 名古屋大学医学部付属病院 (愛知県名古屋市), 2016 年 9 月 26 日

高岸麻紀, 高橋雅英 「先天性水頭症をもたらす Ccdc88c 遺伝子改変マウスの解析」第 105 回日本病理学会総会, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2016 年 5 月 14 日

高岸麻紀, 高橋雅英 「Loss of Ccdc88c cause hydrocephalus」BMB2015, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市), 2015 年 12 月 1 日

Hosne Ara, Maki Takagishi, Masahide

Takahashi 「Daple regulates Wnt5a-mediated cell migration and metastasis of gastric cancer cells.」第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 10 月 8 日

高岸麻紀, 高橋雅英 「Daple regulates planar polarity in the multi-ciliated cells」第 5 回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム, 生理学研究所 (愛知県岡崎市), 2015 年 9 月 19 日

Hosne Ara, Maki Takagishi, Masahide Takahashi 「Daple regulates Wnt5a-mediated cell migration and metastasis of gastric cancer cells.」第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 4 月 30 日

高岸麻紀, 高橋雅英 「Unpolarized ependymal cilia lead to hydrocephalus」第 4 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム, 名古屋大学医学部付属病院 (愛知県名古屋市), 2014 年 11 月 12 日

Hosne Ara, Maki Takagishi, Masahide Takahashi 「Involvement of Daple in Wnt5a-mediated gastric cancer progression」第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014 年 9 月 26 日

高岸麻紀, 高橋雅英 「Wnt シグナル関連分子 Daple による微小管の安定性制御」第 11 回日本病理学会カンファレンス, 神戸六甲山ホテル (兵庫県神戸市), 2014 年 8 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岸 麻紀 (TAKAGISHI Maki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号: 10723918