

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06368

研究課題名(和文)細胞増殖における新規 Wnt5a シグナルの解明

研究課題名(英文) Investigation of a new Wnt5a signaling target in cell proliferation

研究代表者

庄嶋 健作 (SHOJIMA, KENSAKU)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80757211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Wnt5a シグナルにより発現が誘導される遺伝子候補として、Egr-1 や c-Fosを見出し、成体で Wnt5a をノックアウトしたマウスの心臓や肝臓で発現が抑制されていることを明らかにした。さらに、 β -カテニン経路の下流の新規シグナルである Arl4c 経路による腫瘍形成の分子機構解明にも取り組み、膵癌で Arl4c が高発現しており、膵癌細胞株で Arl4c を発現抑制することで運動能が抑制されることを明らかにした。

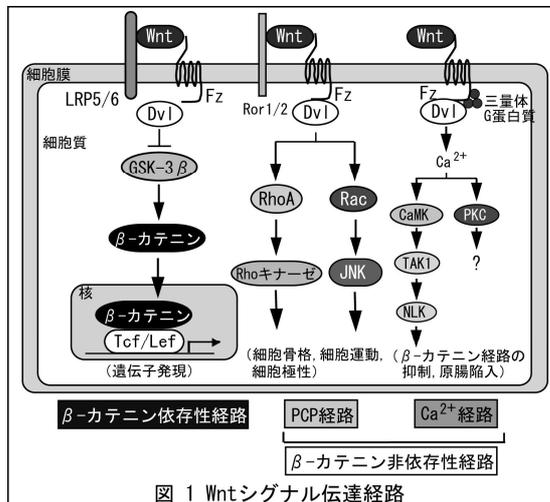
研究成果の概要(英文)：In this study, we identified Egr-1 and c-Fos as a candidate of new Wnt5a signaling targets. These expressions were suppressed in the heart and the liver of adult Wnt5a conditional knockout mice. Moreover, we are now under investigation how the Arl4c, which is identified as a new target by Wnt/ β -catenin dependent signaling, is involved in tumorigenesis in pancreatic cancer. We found that Arl4c was expressed in more than 80 % of pancreatic cancer cases immunohistochemically. Inhibition of Arl4c expression reduced pancreatic cancer cells metastasis.

研究分野：分子生物学

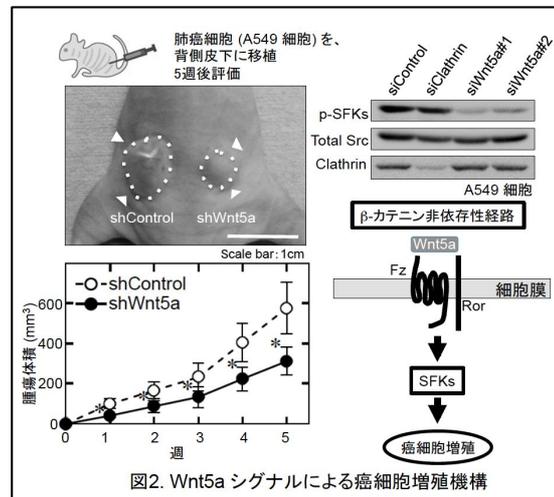
キーワード：Wnt シグナル経路 β -カテニン経路 β -カテニン非依存性経路 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

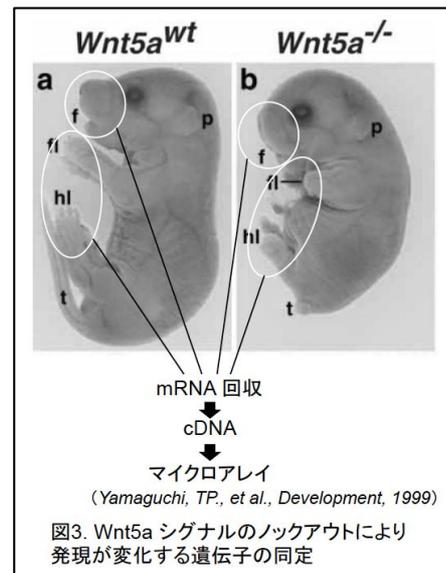
Wnt は線虫やショウジョウバエからヒトまで種間を越えて高度に保存された分泌性の糖タンパク質であり、ヒト・マウスにおいては 19 種類存在する。Wnt によって活性化される細胞内シグナル伝達経路には、 β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路が存在する(図1)(Kikuchi, A., et al., Trends Cell Biol., 2009)。 β -カテニン経路では、Wnt が受容体に作用すると細胞質の β -カテニンが安定化する。細胞質内で蓄積した β -カテニンは核内に移行した後、転写因子 Tcf と複合体を形成し、種々の標的遺伝子の発現を促進して、その結果、細胞の増殖や分化を制御する。一方、 β -カテニン非依存性経路の活性化は、Rho、Rac 等の small GTPase や Protein kinase C (PKC)、Jun-N-terminal kinase (JNK) 等を活性化することで、細胞骨格や細胞極性、細胞運動を制御する。



Wnt5a は、 β -カテニン非依存性経路を活性化する代表的な Wnt であり、胃癌や前立腺癌において、その高発現とそのシグナルの異常活性化が癌の浸潤・転移を促進することで悪性化に関与することが示唆されている (Wang Y., Mol. Cancer Ther., 2009; Kikuchi, A., Cancer Sci., 2008)。最近になり、ある種の癌細胞では Wnt5a シグナルの異常活性化により増殖能が高まることが報告されており、私共は Wnt5a シグナルが肺癌、子宮頸癌、食道癌由来の癌細胞の増殖能を制御することを見出した。さらに、Wnt5a が制御する癌細胞の増殖機構の一因として、Wnt5a シグナルが Src Family Kinases (SFKs) の活性化を介して癌細胞増殖を促進していることを明らかにした(図2)(Shojima, K., et al., Sci. Rep., 2015)。しかし、Wnt5a シグナルが遺伝子発現制御を介して細胞増殖を促進しているのか否かに関しては、未だ明らかになっていない。一方で、胎生期における Wnt5a は、伸張過程の四肢や尾部・頭部で高発現しており、実際に Wnt5a ノックアウト(KO)マウスでは、四肢や体軸、顔面で形成不全が観察される。そこで、私共は Wnt5a KO マウスの表現型



が明確に観察される四肢と頭部顔面領域から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、野生型と比較して発現量が変化する遺伝子群を同定した(図3)。これら遺伝子群の発現をマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) において確認したところ、Wnt5a KO MEF において依然として有意に発現の減弱が観察される遺伝子を複数同定できた。Wnt5a KO マウスでは体軸、肢芽、腸管等の伸長抑制を伴い胎生致死となることから、今回マイクロアレイで得られたいずれかの分子を介して、Wnt5a シグナルは、細胞運動・極性制御と共に細胞増殖に関わるのではないかと考えた。



一方で私共は Wnt/ β -カテニンシグナルの標的遺伝子にも注目し、Wnt による細胞増殖制御が癌などのヒト疾患に関与する新たな機構の解明を目指している。最近、ラット正常腸管上皮細胞株 (IEC6) を用いて、3 次元培養下で Wnt シグナル依存性の上皮細胞の極性化と形態形成を解析している。その過程で、低分子量 G 蛋白質である ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4c (Arl4c) が、Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF/Ras シグナルの直接の標的分子として協調的に活性化することで発現誘導され、上皮細胞の運

動能と増殖能を促進することを見出した (Matsumoto, S., et al., EMBO J., 2014)。生体内でおこる正常上皮細胞の管腔形態形成は、癌細胞が運動能と増殖能を獲得して間質内に侵入していく機構と類似していると考えられる。そこで Arl4c は癌細胞において過剰発現しているのではないかと考え、探索した所、大腸癌や肺腺癌で高頻度に発現しており、Arl4c が高発現すると手術後の無再発期間が短縮することを明らかにした。さらに、Arl4c 高発現細胞株を用いたゼノグラフト腫瘍形成は、Arl4c を *in vivo* siRNA 法によりノックダウンすると減弱した (Fujii, S., et al., Oncogene, 2015)。β-カテニン経路の下流の新規シグナルである Arl4c 経路を解明することは、新規の腫瘍形成の分子基盤の確立に寄与すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Wnt5a シグナルにより発現が誘導される遺伝子を探索し、その遺伝子発現を介する細胞増殖機構を解明することを第一の目的とした。

また Wnt5a シグナルの解析と並行して、β-カテニン経路の下流の新規シグナルである Arl4c 経路による腫瘍形成の分子機構を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) Wnt5a の成体での機能解析において、Wnt5a KO マウスは胎生致死となるため、既に私共は CAG-CreER トランスジェニックマウスと Wnt5a flox マウスを掛け合わせることで、薬剤により時期特異的 (conditional) に Wnt5a を KO できるマウス (Wnt5a cKO マウス) を作製している。マイクロアレイで得られた標的遺伝子候補が、この Wnt5a cKO マウスの各臓器で発現抑制されているか解析する。さらにこの標的遺伝子候補が Wnt5a シグナルにより発現が誘導されるか否かを明らかにするため、培養細胞に精製 Wnt5a で処理を行うことや、発現抑制を行うことで、その遺伝子発現への影響を観察する。

(2) Arl4c が過剰発現している新たな癌腫を明らかにして、その発現が無再発生存期間に影響を与えているか検討する。また、その癌腫の細胞株で Arl4c が高発現しているか調べ、その発現が EGF-Ras-MAPK シグナルに依存するのか解析する。また、Arl4c の過剰発現や発現抑制が細胞運動能や浸潤能、増殖能に与える影響を明らかにしていく。

4. 研究成果

本研究期間内で次の成果を得た。

マイクロアレイで得られた Wnt5a シグナルの標的遺伝子候補

マイクロアレイによって同定された Wnt5a シグナルの標的遺伝子遺伝子候補のうち、

細胞増殖や分化に関与することが知られている Egr-1 や c-Fos が、Wnt5a KO MEF において依然として有意に発現の減弱が観察されることを確認した。

Egr-1 や c-Fos が、Wnt5a cKO マウスの各臓器においてどの程度発現しているか定量 PCR 法を用いて解析したところ、心臓や肝臓で、発現減少していることを確認する事ができた (図 4)。

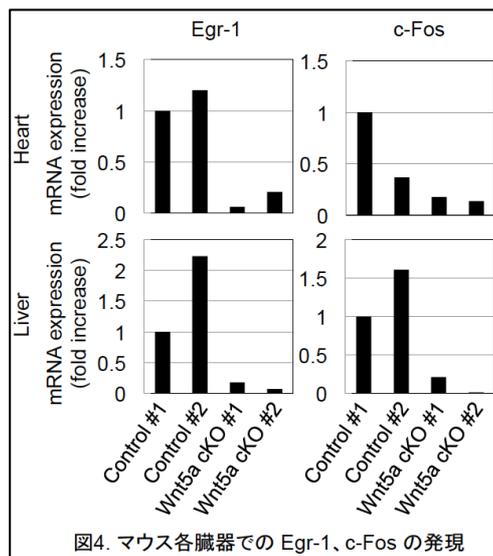


図4. マウス各臓器での Egr-1、c-Fos の発現

しかし、MEF 等各種培養細胞に精製 Wnt5a で処理を行うことや、Wnt5a の発現抑制を行っても、それらの標的遺伝子の発現変動に対する影響を確認できなかった。

膵癌における Arl4c の発現

Arl4c の高発現している癌種について探索したところ、ヒト膵癌において 87.5% (56 症例中 49 例陽性) の症例で過剰発現していた (図 5)。

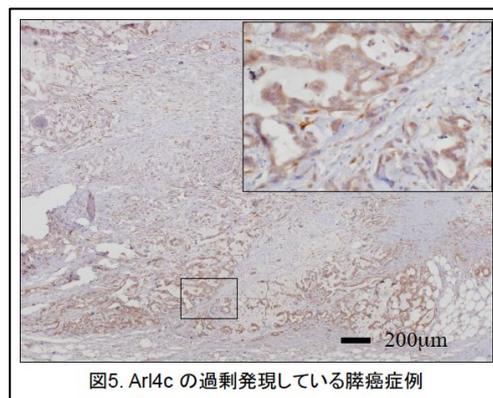


図5. Arl4c の過剰発現している膵癌症例

膵癌細胞株における Arl4c の機能解析

膵癌における Arl4c の機能を解析するため、ヒト膵癌細胞株における Arl4c の発現を検討すると、膵癌細胞株である S2CP-8 や SUI-2 において Arl4c が高発現していた。また MEK 阻害薬を用いると Arl4c の発現は抑制されることから、Arl4c の発現は EGF-Ras-MAPK シグナルに依存していることが示唆された (図 6)。

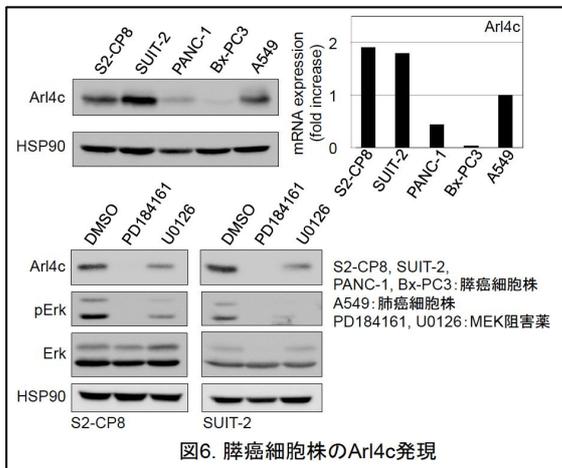


図6. 膵癌細胞株のArl4c発現

そこで、Arl4c を高発現している膵癌細胞株 S2CP-8、SUIT-2 において、Arl4c を発現抑制したところ、*in vitro* での癌細胞の運動能が抑制された（図7）。

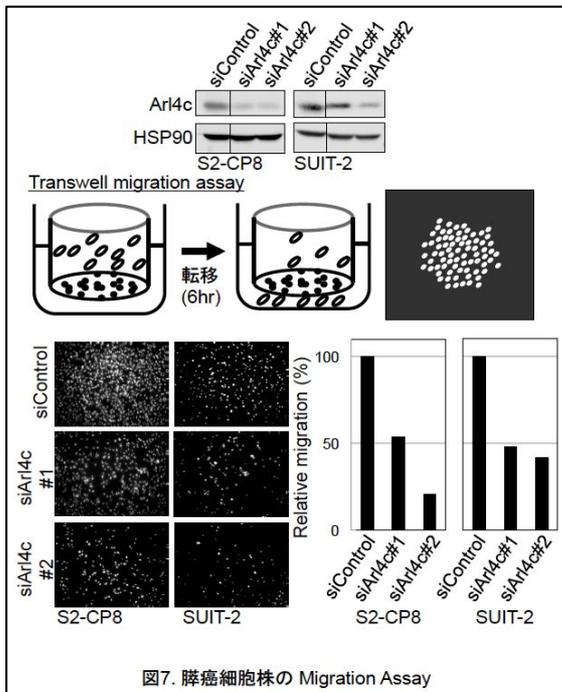


図7. 膵癌細胞株の Migration Assay

本研究では、Wnt5a シグナルにより発現が誘導される遺伝子を探索し、その遺伝子発現を介する細胞増殖機構を解明することを第一の目的としていたが、精製 Wnt5a の処理等の *in vitro* の手法では困難であった。

そこで今後は、成体内で Wnt5a の発現が変化している表現型を用いて、Wnt5a シグナルとその標的遺伝子候補の解析を進めようと考えている。既にデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）2.5% 溶液の自然飲料によって、マウスの大腸に高頻度に潰瘍を誘導できる系が確立されており、これまでの当研究室の研究から、潰瘍部間質領域において Wnt5a が高発現することが判明している(図5)(Sato, A., et al., Sci. Rep., 2015)。さらに、Wnt5a cKO マウスでは上皮修復の遅延が観察されており、この潰瘍からの腸管上皮の修復過程にお

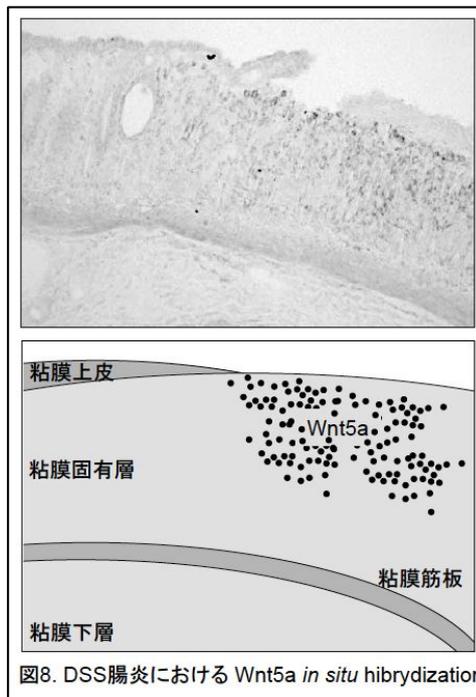


図8. DSS腸炎における Wnt5a *in situ* hybridization

いて、Wnt5a とそのシグナルがどのように関与するか否かを明らかにしていきたいと考えている。

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 2 件)

1. Kawanishi, K., Shojima, K., Nishimoto, M., Abe, H., Kakimoto, T., Yasuda, Y., Hara, T., and Kato, J.,

Superior mesenteric artery syndrome may be overlooked in thin women who were previously diagnosed with functional dyspepsia., *Inter. Med.* (査読有) *in press*, 2017

2. Kimura, H., Fumoto, K., Shojima, K.,

Nojima, S., Osugi, Y., Tomihara, H., Eguchi, H., Shintani, Y., Endo, H., Inoue, M., Doki, Y., Okumura, M., Morii, E. and Kikuchi, A.,

CKAP4 is involved in tumor progression as a Dickkopf1 receptor.,

J Clin Invest. (査読有) 126(7):2689-705., 2016

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 庄嶋 健作, Arl4c expression in pancreatic cancer promotes tumorigenesis., 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 7 日, 横浜

2. 庄嶋 健作, Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively., 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 10 日, 名古屋

〔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 0 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

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄嶋 健作 (SHOJIMA, Kensaku)
大阪大学 医学系研究科 招へい教員
研究者番号：80757211

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()