

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15493

研究課題名(和文) 大腸がんにおける β -カテニン核移送に作用する核膜孔複合体因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of nuclear pore complex components that function to transport beta-catenin between cytoplasm and nucleus

研究代表者

源 利成 (Minamoto, Toshinari)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：50239323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：核移行成分のない β -カテニンの細胞質-核間移行の仕組みを理解する目的で、分子の核移送に機能する核膜孔複合体因子(Nups)と β -カテニンの発現や相互作用を調べた。正常細胞、大腸がん細胞と大腸がん症例のがん、正常粘膜を対象にNupsの発現を比べ、がん細胞である種のNup(NupX)の発現が β -カテニン核集積と逆相関することを見いだした。大腸がん細胞で β -カテニンとT細胞因子4の抗体により免疫沈降するNupsのうちの1つがNupXであった。大腸がん組織における発現解析とがん細胞における機能解析により、NupXは β -カテニンの核排出に作用し、大腸がんのWnt経路には抑制的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism by which β -catenin with no nuclear localization signal transits between cytoplasm and nucleus, this study investigated expression of and interaction between β -catenin and nucleoporins (Nups) that constitute nuclear pore complex and participate in nucleocytoplasmic trafficking of various functional macro-molecules. Comparative analysis of expression of 30 Nups in normal cells, colon cancer cell lines, human colorectal cancer (CRC) tissues and the non-neoplastic mucosa found an inverse association between the expression of a certain Nup (here called NupX) and the nuclear accumulation of β -catenin in colon cancer cells and CRC tissues. Subsequent analysis identified NupX among Nups coimmunoprecipitated with β -catenin and T-cell factor (Tcf)4 in protein extracts from colon cancer SW480 and HCT116 cells. Analysis of its expression and function indicated that NupX functions to excrete β -catenin from nucleus, thereby inactivating the Wnt signal pathway in CRC.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：大腸がん β -カテニン 核移送 核膜孔複合体

1. 研究開始当初の背景

大腸癌と進行過程を推進する Wnt 経路活性化は、その指令伝達因子 β -カテニンが核に移入し、腸型転写因子 T-cell factor (Tcf)7L2 (Tcf4) と協働することにより全うされる^{1,2)}。我々の研究や国内外の研究では、 β -カテニン活性化の仕組みは蛋白質安定性や Tcf7L2 (Tcf4) との協働に焦点が当てられてきた^{1,2)}。しかし、Wnt 経路活性化の必須要件でありながら、分子内に核移行モチーフを持たない β -カテニンが細胞質と核を往来する仕組みや、それに作用する細胞内微細構造は明らかではない。

核封膜(nuclear envelope)に内在する核膜孔は約 30 種類の核膜孔複合体(nuclear pore complex: NPC)因子(Nups)から構成される。NPC による細胞質-核間の分子移送は綿密に制御され、その誤送は疾患の発症や病態に関与するが、NPC とがんに関する研究は国内外で始められたばかりである^{3,4)}。

2. 研究の目的

本研究は、分子の核移送や排出に機能する核膜孔複合体因子(nucleoporins: Nups)^{3,4)}と β -カテニンの発現の関連性、相互作用や機能解析を行い、 β -カテニンの細胞質-核間移送に機能する Nup(s)の同定を試みる。また、大腸がんにおけるこれら Nup(s)の発現や役割を解析する。そして、Wnt 経路活性化の根幹をなす β -カテニン核移行のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんにおける Nups 発現と β -カテニン活性化の比較解析

がん細胞で β -カテニンの核移行に関与する Nups を探索するために、正常細胞とがん細胞の Nups 発現を比較した。実際には、非腫瘍性腎上皮細胞 HEK293、 β -カテニンの核移行・活性化を示す大腸がん細胞 SW480 (adenomatous polyposis coli [APC] 変異)と HCT 116 (CTNBI [β -カテニン遺伝子] 変異)、および 12 例の大腸がん症例のがん組織と非がん部粘膜 1 検体を対象に、30 種類の Nups^{3,4)}の発現を定量的 reverse transcription (RT)-PCR により比較測定した。がん細胞や組織における β -カテニンの発現と局在は免疫蛍光および組織化学染色により観察した。

(2) 細胞核で β -カテニンと会合する Nups の探索

正常細胞 HEK293 と β -カテニン核局在を示す大腸がん細胞 SW480 と HCT116 からそれぞれ核蛋白質を抽出し、 β -カテニン抗体あるいは抗体 Tcf4 抗体で免疫沈降した。そして、がん細胞で β -カテニンと共沈する蛋白質分画を、sodium dodecyl sulfate (SDS)-電気泳動や二次元電気泳動により分離、同定した。

(3) β -カテニン核集積と特異的に関係する Nups の発現と機能解析

上記の解析から同定された Nup(s)の発現と大腸がんの臨床病理学的所見や病期を比較解析した。大腸がん細胞における当該 Nup(s)の機能を RNA 干渉法により検討した。

4. 研究成果

正常細胞 HEK293、大腸がん細胞 (SW480, HCT116)と 12 例の大腸がん症例のがんおよび非がん部粘膜の組織検体について、30 種類の Nups 発現を定量的 RT-PCR により測定、比較した。その結果、がん細胞におけるある種の Nup (Nup X)の発現が β -カテニン核集積(活性化)と逆相関を示した。

ヒト大腸がん細胞 SW480 と HCT116 を対象に β -カテニンと Tcf4 に対する抗体で免疫沈降するタンパク質分画において、複数の Nups を同定した。そのなかに、上記の発現解析により同定された NupX が含まれていた。同じがん細胞に対する RNA 干渉法による機能解析の結果、NupX が核膜に発現しているがん細胞では β -カテニン核集積は少なかった。これらの細胞で NupX の発現を抑制すると β -カテニンの細胞質集積と核局在が顕著になった(図1)。これに伴い、 β -カテニン/Tcf4 経路の分子発現が亢進した(図2)。ヒトがん組織の解析により、腫瘍における NupX 発現は大腸がんの病期と逆相関を示した。

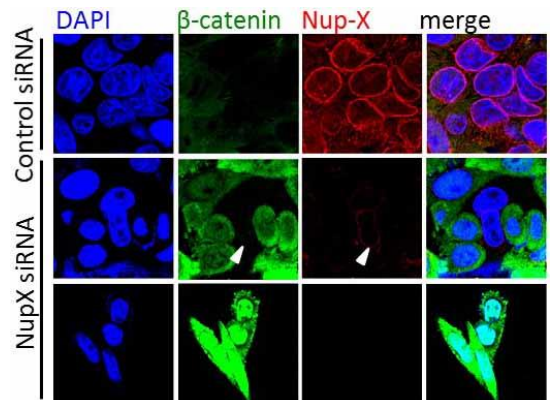


図1. 大腸がん SW480 細胞に非特異的 small interfering (si)RNA (Control siRNA)あるいは NupX 特異的 siRNA (NupX siRNA)を導入したときの β -カテニン(緑)と NupX (赤)の発現と局在。細胞核は 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色した。上段、中段、下段の各画像は同一視野を観察した。最右側は DAPI、 β -カテニンと NupX の視野を融合した画像。

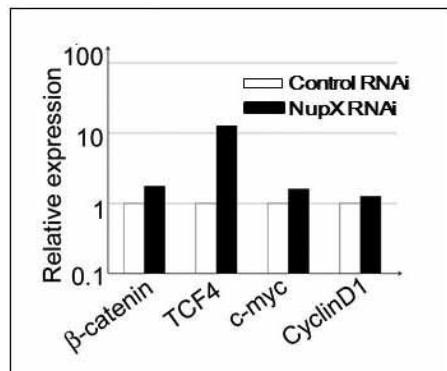


図2. 大腸がん SW480 細胞に非特異的 siRNA

(Control siRNA)あるいは NupX siRNA を導入したときの Tcf4, c-myc および cyclin D1 の相対的発現レベルを定量的 RT-PCR により比較した。

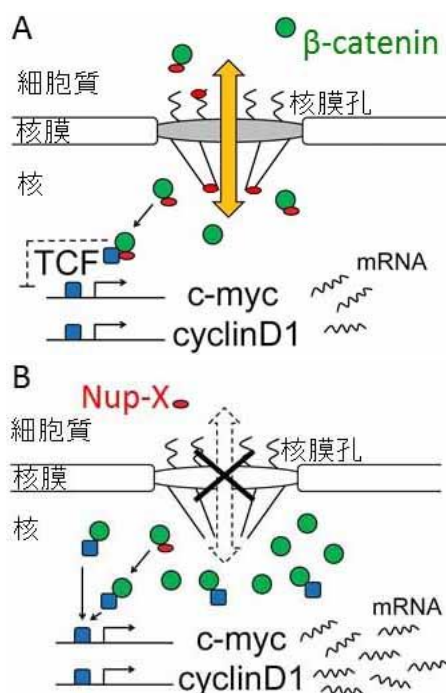


図3. β-カテニンと NupX の細胞内局在と機能の関係を図示した。(A) NupX は β-カテニンに結合して、その核移行を阻止あるいは核からの排出を促進している。(B) 何らかの原因で NupX の発現が低下することにより、β-カテニンは核に移行し Tcf4 による遺伝子転写を促進する。

以上の結果より、NupX は β-カテニンの核排泄に作用し、大腸がんの Wnt 経路には抑制的に作用することが示唆された(図3)。本研究の当初の目的の 1 つであった β-カテニンの細胞質から核移行に作用する Nup(s)は、この研究期間内に同定できなかった。

<引用文献>

- 1) Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192-205.
- 2) White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/β-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012;142:219-32.
- 3) Chow KH, Rachel E. Factor RE, Ullman KS. The nuclear envelope environment and its cancer connections *Nat Rev Cancer* 2012;12: 196-209.
- 4) Funasaka T, Wong RW. The role of nuclear pore complex in tumor microenvironment and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30: 239-51.

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 8 件)

- (1) Domoto T, et al., Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3β is a pivotal mediator in cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci* 107 (10): 1363-72, 2016. doi: 10.1111/cas.13028. 査読あり
- (2) Shimozaki S, Minamoto T, et al. Efficacy of glycogen synthase kinase-3β targeting against osteosarcoma via activation of β-catenin. *Oncotarget* 7 (7): 77038-51, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12781. 査読あり
- (3) Menheniott TR, Minamoto T, et al. Loss of gastrin-2 drives premalignant gastric inflammation and tumor progression. *J Clin Invest* 126 (4):1383-400, 2016. doi: 10.1172/JCI82655. 査読あり
- (4) Wong RW, D'Angelo M. Linking nucleoporins, mitosis, and colon cancer. *Cell Chem Biol* 23 (5): 537-9, 2016. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.05.004. 査読あり
- (5) Wong RW. Nuclear pore complex: from structural view to chemical tools. *Chem Biol* 22 (10):1285-7, 2015. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.10.001. 査読あり
- (6) Wong RW, et al. Impact of nucleoporin-mediated chromatin localization and nuclear architecture on HIV integration site selection. *J Virol* 89 (19): 9702-5, 2015. doi: 10.1128/JVI.01669-15. 査読あり
- (7) Kobayashi A, et al., Wong RW. Therapeutic potential of mitotic interaction between the nucleoporin Tpr and aurora kinase A. *Cell Cycle* 14 (9): 1447-58, 2015. doi: 10.1080/15384101.2015.1021518. 査読あり
- (8) 橋爪智恵子, 源 利成, Richard W. Wong. 有糸分裂期のヌクレオポリン: 大腸がんの病態解明と治療への応用. *生化学* 88 (6): 748-51, 2016. doi: なし. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

- (1) 堂本貴寛, ほか, 源 利成. GSK3β はがん促進性オートファジーを介して大腸がん細胞の生存に関与する. Domoto T, et al., Minamoto T. Glycogen synthase kinase (GSK)-3β participates in colon cancer cell survival via sustaining tumor-promoting autophagy. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日(木)~8 日(土), パシフィコ横浜, 横浜.
- (2) Dewi FRP, et al., Minamoto T, Wong RW. Down modulation of glycogen synthase kinase (GSK)-3β disrupts Translocated Promoter Region (Tpr)-dynein axis during mitosis in colon cancer cells. 第 68 回日本細胞生物学学会大会, 2016 年 6 月 15 日(水)~17 日(金), 京都テルサ, 京都.
- (3) Minamoto T. Biological basis of cancer

treatment by GSK3 β inhibition. 2015 Kanazawa University Cancer Research Institute and Fudan University Shanghai Cancer Center Joint Symposium/International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, September 11, 2015, Kanazawa University School of Medicine Memorial Hall, Kanazawa, Japan.

- (4) 堂本貴寛, ほか, 源 利成. 大腸がん糖代謝特性における GSK3 β の役割. 第 3 回がん代謝研究会, 2015 年 7 月 16 日(木), 17 日(金), 石川県立音楽堂, 金沢.

[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://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/shuyoseigyoo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

源 利成 (MINAMOTO, Toshinari)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 50239323

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

ウォング リチャード (WONG, Richard)
金沢大学・自然システム系・教授
研究者番号: 30464035

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号: 20232275

太田 哲生 (OHTA, Tetsuo)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 40194170

宮下 知治 (MIYASHITA, Tomoharu)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 30397210

(4) 研究協力者

堂本 貴寛 (DOMOTO, Takahiro)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号: 80635540