

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19590910  
 研究課題名（和文）胸膜中皮腫における WNT シグナル活性の意義  
 研究課題名（英文）Significance of Wnt signaling in pleural mesothelioma  
 研究代表者  
 植松 和嗣（UEMATSU KAZUTSUGU）  
 埼玉医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：10297880

研究成果の概要（和文）：胸膜中皮腫における Wnt シグナル活性の意義を検討するために、胸膜中皮腫細胞株の Wnt シグナル伝達体 Dishevelled (Dvl) の発現を small interfering RNA により抑制した。その結果、中皮腫細胞株の細胞増殖は抑制され、さらに抗癌剤シスプラチンを併用することで相乗的に細胞増殖は抑制された。Dvl の発現抑制による Wnt シグナル伝達経路の遮断が既存の抗癌剤による中皮腫の治療効果を増強する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the effect of blocking Wnt signaling in mesothelioma, we down-regulated the expression of dishevelled (Dvl), an intermediary of Wnt signaling, by a small interfering RNA (siRNA). Mesothelioma cell lines were transfected with siRNA of Dvl, and cell growth was examined. The synergistic effect on cell growth of Dvl siRNA and cisplatin in combination was evaluated. Dvl siRNA down-regulated the expression of Dvl in mesothelioma cells, which caused suppression of cell growth. Combination of Dvl siRNA and cisplatin suppressed cell growth synergistically. Our data suggest that inhibition of Wnt signaling leads to significant anti-tumor effects.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：胸膜中皮腫、WNT シグナル、Dishevelled (Dvl)

## 1. 研究開始当初の背景

胸膜中皮腫の発症には、アスベスト曝露が強く関与する。アスベスト曝露から、発症まで20-50年を要すると考えられている。わが国でのアスベスト使用状況を考えると今後、胸膜中皮腫罹患患者が増加することが予想される。

進行した胸膜中皮腫の治療法は確立されていない。葉酸代謝拮抗薬 Pemetrexed や Raltitrexed と Cisplatin の併用と Cisplatin とプラセボとの併用の無作為比較試験が行われ、生存期間中央値は、Cisplatin 単独投与群に比べ、葉酸代謝拮抗剤を加えることにより約3ヶ月延長された。それでも、生存期間中央値は1年前後と、予後は依然として厳しい。今後治療効果をさらに改善していくために、新たな有効な薬剤や手法の開発が強く求められる。中皮腫発症のメカニズムの解明が試みられ、そこで得られた知見を利用した新たな治療法が開発が期待される。

Wnt シグナル(図)の活性化は、大腸癌などでその発症機構に関与することが知られている。これまでの研究で、Wnt シグナル中の $\beta$ -Catenin またはその抑制因子である Apc 遺伝子の突然変異や、その上流に作用する Wnt シグナルの抑制因子 secreted frizzled related protein のメチル化などにより、細胞質で安定的に存在可能となった $\beta$ -Catenin が核に移行し転写活性を示し、下流の Cyclin D1 や Mycなどを活性化させ、癌発症または増殖の維持に関与することが示された。我々は、 $\beta$ -Catenin または Apc 遺伝子の突然変異を認めない胸膜中皮腫や非小細胞肺癌においても、Wnt シグナル中の $\beta$ -Catenin の上流にある Wnt や Dvl の活性化が、癌細胞の増殖の維

持や腫瘍原性に関与していることを示した。これらの研究で、Wnt-1 あるいは Wnt-2 の small interfering RNA (siRNA) や抗体、シグナル系のより下流に存在する Dishevelled (Dvl) の siRNA や PDZ ドメイン欠損 Dvl 変異体による Wnt シグナルの遮断が、中皮腫細胞株および非小細胞肺癌細胞株の増殖や腫瘍原性を抑制することを示した。胸膜中皮腫発症における Wnt シグナルの関与する新たなメカニズムを解明することで、難治性腫瘍である胸膜中皮腫の新たな治療法の開発につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

(1) siRNA を用いた Dvl 発現抑制による胸膜中皮腫細胞へ与える影響を検討した。さらに Dvl 発現抑制と抗癌剤シスプラチンとの併用効果を検討した。

(2) siRNA を用いた Dvl 発現抑制が胸膜中皮腫細胞のタンパク発現へ与える影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) Dvl-3 を高発現している胸膜中皮腫細胞3株 (REN, NCI-H290, H28) を用いた。

(2) Dvl-3 を標的とした siRNA あるいはコントロール siRNA を各細胞へ導入した。

(3) 各細胞の増殖曲線、コロニー形成数、細胞周期の変化を検討した。

(4) siRNA 導入後にシスプラチンを加え併用効果を検討した。

(5) Dvl-3 を標的とした siRNA あるいはコントロール siRNA を各細胞へ導入し、48 時間後に細胞を回収し、タンパクを抽出した。タンパクの2次元電気泳動を行い、各細胞における

Dvl-3 発現抑制によるタンパク発現の変化を検討した。

(6)Dvl-3 発現抑制により発現に差を生じたスポットのうち3細胞株で共通したスポットを回収してタンパクの同定を行った。

(7)同定されたタンパクの発現変化を、細胞への siRNA 導入前後でウエスタンブロット法により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1)結果

胸膜中皮腫細胞 3 株ともに、Dvl-3 を標的とした siRNA により Dvl-3 発現は抑制された。

胸膜中皮腫細胞 3 株ともに、コントロール siRNA を導入した時と比べ、細胞増殖、コロニー形成数ともに抑制された。

細胞周期の解析では、Dvl-3 の抑制により G1 期の増加および S 期の低下がみられた。

Dvl-3 を標的とした siRNA 導入後にシスプラチンを併用することにより中皮腫細胞の増殖は相乗的に抑制された。

Dvl-3 発現抑制に伴い 2 細胞株で共通して発現が変化したスポット (H290 と H2052 で 11 スポット、H290 と H28 で 21 スポット、H2052 と H28 で 51 スポット) 及び 3 細胞で共通し

て発現変化した 6 スポットの同定を試みた。

3 細胞で共通して発現が抑制されたスポットから、Hsp70 が同定された。

ウエスタンブロット解析で、胸膜中皮腫細胞株 H28 において Dvl-3 の発現抑制により Hsp70 のタンパク発現の抑制が認められた。

##### (2)結論

胸膜中皮腫細胞株では、高発現されたDvlによるWntシグナルの活性化が細胞増殖に関与していることが示唆された。

Dvlの発現抑制によるWntシグナル伝達経路の遮断が既存の抗癌剤による中皮腫の治療効果を増強する可能性が示唆された。

Dvl-3発現抑制により、胸膜中皮腫細胞3株に共通したタンパク発現の変化を認めた。

胸膜中皮腫細胞株H28は、WntシグナルにおけるDvl下流のβ-カテニン欠損細胞である。Dvl-3発現抑制によるH28細胞増殖抑制は、β-カテニンを介さない新たな伝達経路に基づく可能性がある。Wntシグナルの腫瘍細胞増殖に関わるβ-カテニンを介さない新たなメカニズムの解明が期待される。

Wnt シグナル活性遮断が、根治不可能な進行性胸膜中皮腫の有効な治療法の開発につながる可能性が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Takenaka T, Gemma A, Yoshimura A, Hosoya Y, Nara M, Hosomi Y, Okano T, Kunugi S, Koizumi K, Fukuda Y, Uematsu K, Shimizu K, Kudoh S. Reduced transcription of the Smad4 gene during pulmonary carcinogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis. Molecular Medicine Reports. 査読有. Vol. 2, 2009, 73-80

Tanaka T, Matsuoka M, Sutani A, Gemma A, Maemondo M, Inoue A, Okinaga S,

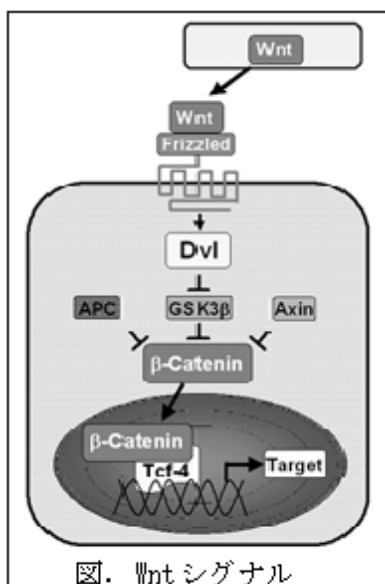


図. Wnt シグナル

Nagashima M, Oizumi S, Uematsu K, Nagai Y, Moriyama G, Miyazawa H, Ikebuchi K, Morita S, Kobayashi K, Hagiwara K. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. International Journal of Cancer. 査読有, 126, 2010, 651-655

Seto T, Yamanaka T, Nakano M, Ota M, Maruyama R, Okamoto T, Wataya H, Uematsu K, Seki N, Eguchi K, Semba H, Ichinose Y. Tegafur-uracil plus gemcitabine combination chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with platinum. Journal of Thoracic Oncology. 査読有, Vol.3, 2008, 637-642

Uematsu K, Seki N, Seto T, Isoe C, Tsukamoto H, Mikami I, You L, He B, Xu Z, Jablons DM, Eguchi K. Targeting the Wnt Signaling Pathway with Dishevelled and Cisplatin Synergistically Suppresses Mesothelioma Cell Growth. Anticancer Research. 査読有, Vol.27, 2007, 4239-4242

植松和嗣. 中皮腫発症の分子機構. 呼吸器科. 査読無, 12 巻, 2007, 296-303

〔学会発表〕(計2件)

森山岳, 山本和男, 山名一平, 大岩健満, 杣知行, 植松和嗣, 小林国彦, 弦間昭彦, 工藤翔二. 当院における若年者肺癌臨床的検討. 第48回日本呼吸器学会総会, 2008年6月15日, 神戸

植松和嗣、関 順彦、大岩健満、北村和広、森山岳、山本和男、杣知行、篠田欣也、江口

研二. 胸膜中皮腫細胞における Wnt シグナル伝達体 Dishevelled (Dvl) の発現抑制によるタンパク発現の変化の検討. 第47回日本呼吸器学会総会, 2007年5月12日, 東京

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植松 和嗣 (UEMATSU KAZUTSUGU)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10297880

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

森山 岳 (MORIYAMA GAKU)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 30364798