

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19890

研究課題名(和文) Wnt/ cateninシグナルを制御する新規核酸創薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel nucleic acid drug discovery based on WNT/beta-catenin signal regulation

研究代表者

菅生 貴仁 (Sugase, Takahito)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10745425

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)：Wnt/beta-catenin とRasは、大腸癌の発癌や癌幹細胞と深く関与しており、両シグナルの抑制により強い抗腫瘍効果が得られると期待される。本研究では、同シグナルを制御するmicroRNA の同定と、核酸治療法の開発を目的とした。シグナル受容体としてLgr5の解析を行い、splicingによって下流シグナルが変化することを見出した。また、正常細胞と大腸癌細胞でTOP-Flashルシフェラーゼアッセイを確立し、下流標的分子であるAXin2、MYC、CD44のタンパク発現を確認した。microRNA arrayを行い、3' UTRやCDSに結合し得るmicroRNAの分離を進めている

研究成果の概要(英文)：Wnt / beta-catenin and Ras are deeply involved in carcinogenesis and cancer stem cells of colorectal cancer, and it is expected that strong antitumor effect will be obtained by suppression of both signals. In this research, we aimed to identify microRNAs that can control the Wnt / beta-catenin and Ras signals to develop novel nucleic acid therapy. We analyzed Lgr 5, one of Wnt / beta-catenin signal receptor, and identified that the downstream signal changes based on the splicing of Lgr5. In addition, TOP-Flash luciferase assay was established in normal cells and colon cancer cells, and protein expression of downstream target molecules AXin 2, MYC, and CD 44 was confirmed. We performed microRNA array to identify microRNAs that can bind to 3 'UTR and CDS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 WNT/beta-catenin シグナル 核酸医薬 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

約 85% 以上の大腸癌では、APC, beta-catenin, Axin の複合体における変異により Wnt シグナルの活性化が認められる。Wnt シグナルの活性化は、beta-catenin の細胞質や核への異常蓄積を誘導し、核内に移行した beta-catenin が転写因子である Tcf / Lef と複合体を形成し Tcf / Lef の転写活性を促進し、c-myc や cyclin D などの遺伝子の発現を誘導する。そのため、もともと beta-catenin 経路が制御している細胞周期や細胞増殖メカニズムの破綻を引き起こし、細胞のがん化が進行すると考えられている。これまで beta-catenin を標的とした治療法が研究されているが、根治を目指した治療に至っていないのが現状である。これは、KRAS をはじめとして様々な変異を大腸癌が持っているという背景に起因することが示唆されている。KRAS 野生型大腸癌には抗 EGFR 抗体が効果を発揮するが、大腸癌の約半数に認める KRAS 変異型では、その恩恵を受けることができない (Van Cutsem et al. Bokemeyer et al. 2008 ASCO)。これは KRAS 遺伝子変異によって KRAS/ERK、MEKK/SEK/JNK pathway の下流 pathway が恒常的に活性化する結果、細胞表面の EGF 刺激に関わらず癌細胞が浸潤・増殖を続けるためである。我々は、これまで、ヒト胎児腎細胞 HEK293 とヒト肺線維芽細胞 MRC5 に、KRASG12V 変異遺伝子を導入し microRNA(miR)発現の変化を miR array で解析した。microRNA とは、22~24 ヌクレオチドからなる内在性の小さな non-coding RNA であり、様々な遺伝子の発現を調節することがわかってきた (Calin et al. Nat Rev Cancer2006)。microRNA が RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるリボ核酸と Argonaute 蛋白の複合体に取りこまれることで miRNA-RISC 複合体を形成し、mRNA の 3' 末端非翻訳領域と相補的に結合することで遺伝子発現を抑制する。microRNA と mRNA の結合は不完全であるため標的遺伝子は 1 つとは限らず、複数の遺伝子を標的として制御することが可能であるということが重要な特徴である。そこで、上記に記した二つの pathway の下流で働く転写因子 Elk-1/SRF および AP-1 が結合する SRE element, AP1 element を含む reporter plasmid をそれぞれ作成し、Luciferase Assay により KRAS 下流シグナルを抑制する miR を解析・同定することに成功した。この miR は、SW480 (KRASG12V), DLD1 (KRASG13D), HCT116 (KRASG13D) の KRAS 変異型細胞株に対して高い抗腫瘍効果を認め、またアポトーシス促進分子群 (BAD, BAX, BAK, Cyt C) の活性化と抑制分子群 (BCL2, BCLXL) の不活化が確認され apoptosis も誘導した。この miR は、KRAS と Akt1 に対する多分子制御を通じて MAPK/ERK と PI3K/AKT pathway を制御

することで、KRAS 変異型大腸癌に対して強い抗腫瘍効果を発揮することがわかった。これまでに Wnt/beta-catenin シグナルの活性化に対して Activator または suppressor として働く microRNAs の報告が散見されるが、その多くは、Wnt/beta-catenin シグナルを制御する特定の miRNA を報告するものであり、APC, beta-catenin, Axin の複合体に変異が起こった場合に、その下流のシグナル伝達経路で働く分子群が microRNA によってどのように制御されているのかについては全く不明である。これらの Wnt/beta-catenin に関連する分子群を制御する miR を同定し、抗腫瘍効果を確認し、さらには、KRAS 変異シグナルを制御する microRNA との相乗的、相加的な抗腫瘍効果を期待することができ新規核酸治療につながるかと考える。

2. 研究の目的

大腸癌患者の約 30-60% において、Wnt/beta-catenin と Ras シグナルの変異が同時に起こっているとされている。Wnt/beta-catenin と KRAS の両シグナルは、大腸癌の発癌過程や癌幹細胞において深く関わっているという報告も散見されており、この二つのシグナルを同時に抑えることが、より強い抗腫瘍効果に繋がることを期待される。我々は、KRAS 変異型大腸癌に治療効果を認める KRAS シグナルを抑制する microRNA をこれまでに同定しており、Wnt/beta-catenin シグナルを制御する核酸薬を新たに同定し、上記 microRNA と併用することで、さらに相加・相乗効果を期待できる新規核酸治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

beta-catenin 遺伝子導入による miRNA の網羅的解析:
beta-catenin 発現 vector を導入し beta-catenin 過剰発現モデルを作成する。miR アレイを用いて導入前後の miRNA の変化を比較し、変化率の大きいものを抽出する。
Wnt/beta-catenin 伝達関連分子における候補 miR の機能解析:
APC 変異大腸癌細胞株 (LoVo, HT29) において Wnt/beta-catenin シグナル分子を制御するかどうかを調べる。TCF-LEF 応答配列 (TCF-LEF RE) をエレメントとする reporter plasmid を樹立し、候補 miR を導入後 luciferase 活性を測定することで評価する。そのシグナルを抑制する miR を同定し、そのシグナル活性の低下率を評価する。シグナルを制御した miR のうち、Wnt/beta-catenin シグナル関連分子を標的とする miR を選別する。TargetsScan などの sequence binding prediction program を用いて Wnt/beta-catenin シグナル関連分子の 3' UTR や CDS に binding する可能性のある

microRNA を抽出し、miR 導入前後で mRNA、タンパクを抽出し qPCR、ウエスタンブロッティングを用いて比較解析をする。また、Target 分子の binding site を pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega)に導入し、その Luciferase activity を評価することにより直接的な標的分子かどうかの検討を行う。

腫瘍増殖抑制効果の評価：

APC 変異型大腸癌細胞株に、候補となった miR を pre-miR, anti-miR を導入し腫瘍増殖抑制効果について解析する。

大腸癌臨床検体での候補 miR の発現の解析：

大腸癌患者の術後臨床検体を用いて、候補となる miR の発現レベルを解析し、予後との関連を調べる。

皮下腫瘍マウスでの抗腫瘍効果の評価：

APC 変異型大腸癌細胞株をヌードマウスの皮下に移植し 80-100mm³ に成長した段階で miRNA を腫瘍部の皮下に投与する。担体としてはアテロコラーゲンを用いて治療効果を評価する。In vivo で効果を示した miRNA については、尾静脈より全身投与を行い治療効果を評価する。担体にはこれまで私達が開発を進めてきた炭酸アパタイトを用いる。

KRAS シグナル抑制 miRNA との併用による抗腫瘍効果の評価：

APC 変異型大腸癌細胞株に KRAS 遺伝子を導入した細胞株を樹立し、KRAS シグナルを抑制する miRNA との併用による抗腫瘍効果を In vitro, In vivo で評価する。In vivo では、炭酸アパタイトを用いた miR の尾静脈からの全身投与による抗腫瘍効果を評価する。

4. 研究成果

ヒトにおける WNT/beta-catenin シグナルの制御機構が当初の想定以上に複雑に制御されており解析はかなり困難であった。WNT/beta-catenin シグナルに関する受容体の一つとして Lgr5 の解析を行い、Lgr5 に splicing variant が存在し、splicing によって下流シグナルが大きく変化することを見出した。また、大腸癌では APC 遺伝子変異が起きていることで恒常的に WNT/beta-catenin シグナルが活性化しており、シグナルの上流での遺伝子操作での結果を導き出すことも極めて難しく多大な時間と労力を有した。正常細胞並びに大腸癌細胞における TOP-Flash ルシフェラーゼアッセイを確立することはでき、WNT/beta-catenin シグナルの下流標的分子である AXin2、MYC、CD44 の遺伝子発現とタンパク発現が相関することまでは確認することができた。Tcf/lef の転写活性に関しては想定した結果がまだ得られていなく、microRNA array を行うことで WNT/beta-catenin シグナル関連分子に係る microRNA を分離し、database を用いることで 3' UTR や CDS に結合する可能性がある microRNA の分離を進めている。

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 3 件)

Osawa H, Takahashi H, Nishimura J, Ohta K, Haraguchi N, Hata T, Yamamoto H, Mizushima T, Takemasa I, Doki Y, Mori M. Full-length LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in colorectal cancer.

Br J Cancer. 2016 May 24;114(11):1251-60. doi: 10.1038/bjc.

Takahashi H, Suzuki Y, Nishimura J, Haraguchi N, Ohtsuka M, Miyazaki S, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Characteristics of carbonic anhydrase 9 expressing cells in human intestinal crypt base. Int J Oncol. 2016 Jan;48(1):115-22. doi: 10.3892/ijo.2015.3260.

Takahashi H, Nishimura J, Kagawa Y, Kano Y, Takahashi Y, Wu X, Hiraki M, Hamabe A, Konno M, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ishii M, Mimori K, Ishii H, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. Significance of Polypyrimidine Tract-Binding Protein 1 Expression in Colorectal Cancer. Mol Cancer Ther. 2015 Jul;14(7):1705-16. doi: 10.1158/1535-7163.

[学会発表](計 2 件)

大澤日出樹 大腸癌における Lgr5 スプライシングバリエーション 日本癌治療学会 2015/10/29 国立京都国際会館

Hidekazu Takahashi. LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in Colorectal cancer. Society of Surgical Oncology. 2016/3/2~3/4. Boston, USA.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅生 貴仁 (SUGASE takahiro)
大阪大学・医学系研究科・医員
研究者番号：10745425

(2) 研究分担者

山本 浩文 (YAMAMOTO hirofumi)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30322184

西村 潤一 (Nishimura junichi)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20379209

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()