

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月18日現在

Wnt シグナルネットワークの異常によるがん発症の新規分子機構の解明

Novel mechanisms that cause cancers due to the abnormality of Wnt signal network

課題番号：16H06374

菊池 章 (KIKUCHI, AKIRA)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要（4行以内）

Wnt シグナルの異常による新規の細胞がん化の分子基盤を、がんモデルマウスや網羅的遺伝子発現解析等を用いて確立することを目的とする。本研究成果は、がん細胞の多様な増殖や転移の分子機構の理解の進展に寄与するとともに、新たな創薬シーズの発見の端緒となる可能性が高く、社会的意義が大きい。

研究分野：総合生物

キーワード：Wnt シグナル、Ar14c、DKK1、CKAP4、Wnt5a、炎症

1. 研究開始当初の背景

Wnt は胎生期において器官形成に必須の分泌タンパク質であり、Wnt が活性化する2つのシグナル経路、 β -カテニン依存性経路と β -カテニン非依存性経路の意義が幹細胞生物学を含めた発生生物学的な視点で精力的に解析されてきた。一方、出生後 Wnt シグナルは器官のホメオスターシスの維持に関与するとされているが、その分子機構は十分に理解されていない。Wnt シグナルの異常はがんとの関わりが深く、この10数年間 β -カテニン依存性経路を構成する分子を標的としたがん治療の開発が試みられてきたが、いまだに成果を得るに至っていない。一方、 β -カテニン非依存性経路もがんや炎症に関与することが明らかになってきたが、本経路を活性するリガンド Wnt5a の発現と腫瘍形成の関連はがん種により異なる可能性があり、その全貌は明らかでない。これらの不明な点を解明することは、がん研究領域における新規の分子機構の理解の進展に寄与するとともに、新たな創薬シーズの発見の端緒となる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では Wnt シグナルの異常による発がん機構において未解決な問題、すなわち β -カテニン依存性経路の新規下流シグナル経路による腫瘍形成の分子機構と、 β -カテニン非依存性経路による腫瘍形成と炎症応答の制御機構明らかにすることにより、Wnt シグナルの異常による新規の細胞がん化の分子基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

①腫瘍形成における Ar14c の発現制御と作用機構の解明 Ar14c の発現制御機構と作用機構を、がん細胞株を用いて解析した。マウスがんモデルを用いて、Ar14c の発現による腫瘍形成機構を解析した。

②腫瘍形成における CKAP4 の細胞内局在と作用機構の解明 CKAP4 の小胞体から細胞膜への輸送機構ならびに細胞膜上のマイクロドメインにおける局在と DKK1-CKAP4 経路による細胞増殖機構を、がん細胞株を用いて解析した。マウスがんモデルを用いて、DKK1-CKAP4 経路の異常による腫瘍形成機構を解析した。

③炎症を伴った腫瘍形成における Wnt5a の発現制御と作用機構の解明 Wnt5a の発現制御と細胞増殖機構を、がん細胞株を用いて解析した。マウスがんモデルを用いて、Wnt5a を介した腫瘍細胞と炎症細胞との相互作用を解析した。

4. これまでの成果

①腫瘍形成における Ar14c の発現制御と作用機構の解明 (1) Ar14c は Wnt シグナルと EGF シグナルの相乗作用により高発現し、大腸がんおよび肺腺がんの悪性化に関与することを明らかにしてきた。腺がん以外の Ar14c の発現について検討したところ、肺扁平上皮がんでは81%、舌扁平上皮がんでは74%の症例で過剰発現していた。これらのがん細胞では、Ar14c DNA の3'非翻訳領域が低メチル化状態となり、Ar14c は高発現していた。がん細胞において、Ar14c が増殖因子シグナル以外でも、DNA のメチル化によっても発現制御されることが明らかとなった。(2) Ar14c に対す

るアンチセンス核酸 (ASO) を合成し、肝がんモデルに皮下投与したところ、腫瘍の形成と腫瘍部における Arl14c の発現が抑制された。また、肺がんモデルに対して、経気道的に Arl14c ASO を投与しても、腫瘍サイズが減少した。したがって、Arl14c を標的とした ASO が、肝がんと肺がんに対して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。(3) Arl14c の標的分子として ARNO が知られていたが、肝がんにおいて PI3K が、膵がんでは IQGAP が Arl14c の下流で機能することが明らかになった。がん細胞の種類により、Arl14c によるがん細胞増殖機構が異なる可能性が考えられた。

②腫瘍形成における CKAP4 の細胞内局在と作用機構の解明 (1) CKAP4 は細胞質内の Cys100 がパルミチン酸化されることが報告されていたが、その生理的意義は不明であった。DKK1 で細胞を刺激すると、AKT の活性化を介して、CKAP4 が脱パルミチン酸化され、CKAP4 が脂質ラフトから非脂質ラフトへ移行した後、エンドサイトーシスされることにより AKT の活性化が减弱した。また、CKAP4 のパルミチン酸化は AKT の活性化とがん細胞増殖に必要であった。CKAP4 のパルミチン酸化を介する DKK1-CKAP4 経路による細胞増殖の制御機構が解明された。(2) 細胞膜に発現する CKAP4 がインテグリン $\beta 1$ と結合し、インテグリン $\alpha 5 / \beta 1$ のリサイクリングを抑制した。CKAP4 をノックダウンすると、インテグリン $\alpha 5$ の細胞膜への発現が増加し、フィブロネクチンとの結合が増す結果、細胞運動が抑制された。細胞膜 CKAP4 に受容体以外の新規の機能が存在することが明らかになった。(3) 抗 CKAP4 抗体が DKK1 と CKAP4 の結合を阻害して、AKT 活性を阻害するとともにがん細胞増殖を阻害した。DKK1 と CKAP4 が発現するヒトがんにおいて、抗 CKAP4 抗体が分子標的治療薬になる可能性が考えられた。

③炎症を伴った腫瘍形成における Wnt5a の発現制御と作用機構の解明 (1) Wnt5a は炎症やがん組織において線維芽細胞に発現することを見出していた。AOM と DSS 投与を組み合わせ合わせた (AOM/DSS) 大腸がんモデルにて、Wnt5a の発現は活性化線維芽細胞マーカー陽性細胞とは一致しなかった。AOM/DSS 大腸がんマウスにおいて形成されたがん組織から線維芽細胞を単離し、1 細胞 RNA シーケンスを行なったところ、Wnt5a は既知の線維芽細胞マーカーの発現しない集団に属することが確認され、AOM/DSS に特異的な線維芽細胞サブセットが存在した。(2) AOM/DSS 大腸がんマウスにおいて、Wnt5a の発現上昇を抑制したところ、腫瘍形成が抑制された。Wnt5a 発現細胞は既知の細胞とは異なる細胞群に属し、Wnt5a は発がんに伴うがん微小環境因子の一つとしてがん細胞増殖を促進した。

5. 今後の計画

採択後 3 年間で研究は順調に進行しており、

計画通りに目的を達成できると判断している。Arl14c シグナルに関しては、膵がんにおける下流分子として IQGAP を同定できたので、Ras-Arl14c-IQGAP 経路の膵がん細胞における浸潤機構を明らかにする。DKK-CKAP4 シグナルに関しては、CKAP4 の小胞体から細胞膜への輸送機構、CKAP4 のパルミチン酸ターナーオーバーの分子基盤を確立する。Wnt5a シグナルに関しては、Wnt5a 発現線維芽細胞の遺伝子プロファイルを決定して、本細胞の大腸がんにおける役割を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Kimura, H., Yamamoto, H., Harada, T., Fumoto, K., Osugi, Y., Sada, R., Maehara, N., Hikita, H., Mori, S., Eguchi, H., Ikawa, M., Takehara, T., Kikuchi, A. CKAP4, a DKK1 Receptor, is a biomarker in exosomes derived from pancreatic cancer and a molecular target for therapy. Clin Cancer Res. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2124, 2019

2. Harada, T., Matsumoto, S., Hirota, S., Kimura, H., Fujii, S., Kasahara, Y., Gon, H., Yoshida, T., Itoh, T., Haraguchi, N., Mizushima, T., Noda, T., Eguchi, H., Nojima, S., Morii, E., Fukumoto, T., Obika, S., *Kikuchi, A. Chemically modified antisense oligonucleotide against ARL4C inhibits primary and metastatic liver tumor growth. Mol. Cancer Ther. 18: 602-612, 2019

3. Kajiwar, C., Fumoto, K., Kimura, H., Nojima, S., Asano, K., Odagiri, K., Yamasaki, M., Hikita, H., Takehara, T., Doki, Y., Morii, E., Kikuchi, A. p63-dependent Dickkopf3 expression promotes esophageal cancer cell proliferation via CKAP4. Cancer Res. 78: 6107-6120, 2018

4. Shinno, N., Kimura, H., Sada, R., Takiguchi, S., Mori, M., Fumoto, K., Doki, Y., and Kikuchi, A. Activation of the Dickkopf1-CKAP4 pathway is associated with poor prognosis of esophageal cancer and anti-CKAP4 antibody may be a new therapeutic drug. Oncogene 37: 3471-3484, 2018

5. Fujii S., Shinjo K., Matsumoto S., Harada T., Nojima S., Sato S., Usami Y., Toyosawa S., Morii E., Kondo Y., Kikuchi A. Epigenetic upregulation of ARL4C, due to DNA hypomethylation in the 3'-untranslated region, promotes tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma. Oncotarget 7: 81571-81587, 2016

6. Kimura, H., Fumoto, K., Shojima, K., Nojima, S., Osugi, Y., Tomihara, H., Eguchi, H., Shintani, Y., Endo, E., Inoue, M., Doki, Y., Okumura, M., Morii, E., and Kikuchi, A. CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. J. Clin. Invest. 126: 2689-2705, 2016

7. 第 11 回柿内三郎記念賞 菊池章 「Wnt シグナルによる細胞機能制御とその異常による病態」

7. ホームページ等

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