

令和元年6月13日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07142

研究課題名(和文) 低密度リポタンパク受容体の  $\beta$ -cateninシグナル制御機構の解明研究課題名(英文) Involvement of low-density lipoprotein receptor in the regulation of  $\beta$ -catenin signaling

研究代表者

武藤 倫弘 (Mutoh, Michihiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・社会と健康研究センター・室長

研究者番号：30392335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸腫瘍部位で強発現している脂質受容体LDLRをsiRNA処理することにより、LDLRが $\beta$ -cateninシグナル経路において、リン酸化の制御によってTcf/LEF転写活性を調節していることを見出した。LDLR全長分子を強制発現させることによって、純粋にLDLR発現量変動によってTcf/LEF転写活性が変動しうることを示した。さらに、クラスリン依存性のエンドサイトーシスの分子機構がLDLRから $\beta$ -cateninへのシグナル経路において寄与していることを示した。また、エンドサイトーシスの阻害により、Minマウスにおける腸ポリープ生成数が有意に減少することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LDLR分子がLDL取り込みに利用される受容体機能のみならず、シグナル伝達機能分子としても重要な働きを有していることが明らかとなれば、上皮増殖因子の受容体などと同じくLDLRからの刺激をエンドサイトーシスにより制御されているシグナル伝達経路として捉えることが出来、新たな分子機作に関する知見を得たことになる。このような新しいエビデンスを用いることにより、エンドサイトーシスなどの細胞基本的メカニズムと発がん過程という新たな領域が創設され、がん領域のみならず様々な応用分野でも世界をリードできるシーズ開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：<Aim> Although epidemiological studies suggest that dyslipidemia is associated with the development of colorectal cancer, the underlying molecular mechanisms are poorly understood. Thus, we focused on the lipid receptor LDLR, which is strongly expressed in colon tumor tissue, and aimed to reveal that LDLR is a modifier of  $\beta$ -catenin signaling. <Methods & Results> LDLR regulates Tcf/LEF transcriptional activity by regulating phosphorylation of  $\beta$ -catenin. Over-expression of full-length LDLR showed that Tcf/LEF transcriptional activity can be affected by variations in LDLR expression levels. Furthermore, we showed that the molecular mechanism of clathrin-dependent endocytosis contributes to the LDLR- $\beta$ -catenin signaling pathway. In addition, inhibition of endocytosis resulted in a significant decrease in the number of intestinal polyps produced in Min mice. <Future plan> We are now searching for an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis with anti-neoplastic character.

研究分野：がん予防学

キーワード：LDLR  $\beta$ -catenin エンドサイトーシス 腸ポリープ がん化学予防剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

疫学的調査により肥満や糖尿病、脂質異常症(高コレステロール血症や高トリグリセリド血症など)は大腸がん発症と強い関連性が存在すると示唆されている。しかしながら、脂質異常症を原因として大腸がんが発症し易くなるメカニズムに関し、現在までに明らかにされている実験的事実は殆ど無い。

我々の研究グループは、家族性大腸腺腫症モデルマウス(*Apc* 遺伝子変異マウス: Min マウス)の血清脂質値が加齢とともに急激に上昇することを世界に先駆けて報告し、その原因として血清脂質であるトリグリセリド(TG)を分解する lipoprotein lipase (LPL)の発現が顕著に低下していることを報告した(*Cancer Res*, 63: 6090-6095, 2003)。またこの時、TG を構成成分として含む血中 low-density lipoprotein (LDL)量が大きく上昇していることを見出した。Min マウスではヘテロに有した *Apc* 変異に更に変異が加わる事によって $\beta$ -catenin シグナル抑制が解除され易く、その結果増殖関連分子の発現を導く Tcf/LEF 転写活性系が恒常的に活性化し、多数の腸ポリープが生成される。このことから Min マウスは大腸発がんや脂質異常症との関連を示す上でも有用なモデルであることを提唱した。

その後、我々は Min マウスで低下している LPL の発現を誘導する peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )リガンドや、PPAR $\gamma$ を介さない選択的な LPL 誘導剤 NO-1886 を用いて、血中 LDL 値が腸ポリープ生成に対する影響を検討してきた。その結果、PPAR $\gamma$ リガンド及び LPL 誘導剤で LPL の発現を上昇させ血清 LDL 値を下げた時には、腸ポリープの生成が顕著に抑制される事を明示してきた(*Cancer Sci* 94: 960-964, 2003; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2970-2974, 2005)。

我々はこの時、Min マウスの腸ポリープでは管腔側のポリープ表面の上皮細胞において脂質が蓄積していることを Oil-red O 染色と電子顕微鏡を用いて観察している(*Int J Cancer*, 125: 2505-2510, 2009)。腫瘍部位への脂質蓄積に関してはヒト大腸がん組織等においても、脂肪滴の存在が同様に報告されている(*Cancer Res*, 68: 1732-40, 2009)。このことはポリープ部位で特異的に脂質の取り込みが積極的に行われている可能性が有ることを示すと考えられる。そこで Min マウスの腸ポリープ部位で LDL の受容体である LDLR 分子の発現を解析した処、炎症関連分子である cyclooxygenase-2 分子の発現と共に高い発現が有る事を免疫組織化学的な検討、及び遺伝子発現解析を通じて明らかにした。

此処までの実験結果を踏まえると、Min マウスの腸ポリープ発生には LDLR が大きな役割を果たしていることが想起される。そこで我々は *Apc* 変異に加え LDLR 遺伝子を遺伝学的に欠損させた二重変異 Min マウスを作成し、以下の様な検討を行った。その結果、10 週齢の雄 Min マウスにおいて LDLR を欠損させると、LDL の細胞内への取り込みが減少するため、血清 LDL 値は大きく上昇した。この時、LDLR をホモ欠損させた雄二重変異 Min マウスでは、1 匹当たりの平均腸ポリープ生成数は有意に減少していた。これは雌においても同様であった。つまり LDLR 欠損 Min マウスでは血清 LDL 値が上昇しているのにも関わらず、腸ポリープ生成数が低下するという、これまでの一連の実験結果(血清 LDL 値が変化した場合、血清 LDL 値とポリープ生成数は正の相関関係に有る)とは相反する結果が得られたことになる。この時、腸ポリープ生成数減少を支持する様に、LDLR ホモ欠損マウスの腸ポリープ部位では $\beta$ -catenin の核移行が Min マウスと比較して減弱していることも免疫組織化学染色により確認出来た。

以上のことより、LDLR 遺伝子欠損が Min マウスの腸ポリープ生成に $\beta$ -catenin シグナル経路を介し減弱方向の影響を与える事、つまり LDLR 分子がシグナル方向の転換点となる重要な分子で有る事が確実となった。更に *in vitro*でも $\beta$ -catenin 変異がある SW48 細胞、及び *APC* 変異がある HCT15 細胞に LDLR の siRNA を導入して LDLR 蛋白質の発現を 70%程度減弱させた処、やはり $\beta$ -catenin シグナルの下流にある Tcf/LEF 転写活性が抑制されることを確認している。

LDLR はコレステロール・TG を含む LDL を細胞内へと取り込むための受容体として知られているが、同時にシグナル伝達作用を持ちうるかに関しては十分に分かっていない。これまでの実験で我々が得た結果では、LDLR 分子は $\beta$ -catenin シグナル経路へとリンクしており、Min マウス腸におけるポリープ生成過程の重要なシグナル伝達制御分子として機能していることを示している。

そこで、これまでにその存在すら明らかにされていない LDLR から $\beta$ -catenin へと続くシグナル経路の分子機構を明らかにすることで、環境要因が大腸発がんに与える影響に関する新たな知見を得て、大腸発がんへの理解を進め、さらにこの分子機構を利用した化学予防へと研究を実際に展開する事、を目指して本研究を立案した。

当研究の学術的特色と予想される結果/意義であるが、当研究の特色は、「脂質代謝異常が大腸発がんを促進する」という疫学研究の結果から、LDLR という受容体を起点としたその促進メカニズムをシグナル伝達系として実験的に解明することにある。脂質代謝異常という切り口で大腸発がん過程を研究しているグループは世界的に少なく、現時点では我々が世界をリードしている事は疑いないため、独創的で特色のある研究となることが期待される。

また、LDLR 欠損が $\beta$ -catenin シグナルに関与している事のメカニズム解明は学術的に価値の高い成果となることが期待される。LDLR 分子が LDL 取り込みに利用される受容体機能のみならず、シグナル伝達機能分子としても重要な働きを有していることが初めて明らかとなれば、従来未解明であった新たな分子機作に関する知見となる。更に LDLR は LDL 取込み時にエンドサイトーシスにより循環・再利用されていることが知られているため、上皮増殖因子の受容体などと

同じくエンドサイトーシスにより制御されているシグナル伝達経路として捉えることが出来るかもしれない。このような新しいエビデンスから、エンドサイトーシスなどの細胞基本的メカニズムの発がん過程への寄与という新たな領域が創設され、がん領域のみならず様々な応用分野でも世界をリードできるシーズ開発に繋がると考えられる。今後、経時的な分子挙動の可視化技術領域、数理的予測技術領域及び分子疫学領域との融合を介して、様々な分野への波及効果も大きく期待される。

## 2. 研究の目的

疫学的調査により脂質異常症と大腸がん発症との間に関連性があることが示唆されているが、両者を繋ぐ分子メカニズムについては、未だほとんど明らかになっていない。我々はこれまでに大腸腫瘍部位で強発現している脂質受容体 LDLR に注目し、LDLR 欠損 Min マウスに於いて腸ポリープ生成が抑制されること、そして $\beta$ -catenin 核移行が阻害される結果を得ている。また大腸がん培養細胞で LDLR 分子を siRNA 処理によりノックダウンすると、Tcf/LEF 転写活性が抑制されることも見出した。そこで本研究では、LDLR が $\beta$ -catenin シグナル経路に与える影響の分子メカニズムを明らかにする事を第一義の目的とした。さらに LDLR 分子が $\beta$ -catenin シグナル系へと与える影響とその分子的機構全般について統合的に解明することで、3 年以内の研究期間の中で有効な化学予防に結びつける事を目的とした。

## 3. 研究の方法

LDLR 分子を起点として、 $\beta$ -catenin シグナル経路へと連なる分子機構を明らかにするため、この課題を遂行するために以下の3つの局面からの研究を行った。

- (1) LDLR 分子ノックダウンによる $\beta$ -catenin の核内移行量変動と $\beta$ -catenin 修飾変化の解析
- (2) LDLR 全長分子の強制発現時における $\beta$ -catenin シグナル経路変動の解析
- (3) LDLR の細胞内取込み阻害(エンドサイトーシス阻害)処理時の $\beta$ -catenin シグナル経路変動解析

### <平成28年度の計画>

LDLR 分子をノックダウンさせる事で、その分子存在量を減弱させた環境下での $\beta$ -catenin 分子の局在別量的変動やその修飾の変化メカニズムを解明する。

また前項と逆に LDLR 全長分子を強制発現させその存在量を増やした時、さらにリガンドである LDL 添加量を変動させ受容体-リガンド結合割合を変化させた場合の $\beta$ -catenin シグナル経路への影響、を中心的に解明する。

### <平成29年度の計画>

H28 年度の実験計画同様、LDLR 強制発現系や蛍光リガンド(蛍光 LDL)などを応變的に用いながら LDLR 分子の挙動と経路下流分子のプロファイリングを行う。

具体的には、通常培養時、及び LDLR-siRNA を導入してその発現量をノックダウンした時に、クラスリン依存性のエンドサイトーシス特異的な阻害剤、及びカベオリン依存性エンドサイトーシス特異的な阻害剤を添加することで、両分子に依存して機能するエンドサイトーシスをどの程度抑制しているかの確認を行い、同時に各阻害剤添加時の Tcf/LEF 転写活性をレポーターアッセイによって定量検討する。

また H29 年中にエンドサイトーシス阻害剤の培養細胞での効果検証実験を行い、それ以降でこの結果を踏まえた化学予防剤効果検証の動物実験の計画を立てる。

### <平成30年度の計画>

Tcf/LEF 転写活性を抑制可能なエンドサイトーシス阻害剤が明らかになった場合、有用な阻害剤を用いて Min マウスへの *in vivo* 発がん予防試験を行う。具体的には、エンドサイトーシス阻害剤を混入した粉末飼料を給餌した Min マウスの腸ポリープ生成数の測定と評価を行う。この時各個体で組織を採取して、抗 $\beta$ -catenin 抗体を用いた核内移行評価や関連分子の発現解析を同時に行う。

さらに、LDLR 分子を起点とした $\beta$ -catenin シグナル経路へと連なる分子機構における与えるエンドサイトーシスの寄与を整理し、細胞において $\beta$ -catenin シグナル系を抑制するエンドサイトーシス阻害剤が、がん化学予防剤として実際に利用可能なのかについて、動物実験で得られた結果を取りまとめ、成果の発表を行う。

## 4. 研究成果

H28 年度では LDLR 分子をノックダウンさせることで、その分子存在量を減弱させた環境下での $\beta$ -catenin 分子の局在別量的変動やその修飾の変化メカニズムを、またリガンドである LDL 添加量を変動させ受容体-リガンド結合割合を変化させた時に与える $\beta$ -catenin シグナル経路への影響、を中心的に解明し、 $\beta$ -catenin のリン酸化の変化に関するデータを得た。

H29 年度では、H28 年度のマイルストーンから持ち越した LDLR 全長分子の強制発現時にお

るβ-catenin シグナル経路変動の解析の課題に取り組んだ。LDLR siRNA 導入によって抑制された Tcf/LEF 転写活性が、LDLR 遺伝子全長を強制発現させるプラスミドの同時トランスフェクションによって回復（レスキュー）された。ここでは非翻訳領域に siRNA を設定した実験系を利用することにより、LDLR-siRNA 処理時に他の分子の付加的な変化という要素を排除して、転写活性が回復可能かを検証した。この検討により、純粋に LDLR 発現量変動によって Tcf/LEF 転写活性が変動しうることを示すことができた。

さらに H29 年度では、通常培養時、及び LDLR-siRNA を導入してその発現量をノックダウンした時に、クラスリン依存性のエンドサイトーシス特異的な阻害剤 (chlorpromazine)、及びカベオリン依存性エンドサイトーシス特異的な阻害剤 (filipin, methyl-β-cyclodextrin) を添加することで、両分子に依存して機能するエンドサイトーシスをどの程度抑制しているかの確認を行うとともに、各阻害剤添加時の Tcf/LEF 転写活性をレポーターアッセイによって定量検討した。この結果、chlorpromazine を用いた検討によりクラスリン依存性のエンドサイトーシスの分子機構を用いたエンドサイトーシスが LDLR からβ-catenin へのシグナル経路において寄与していることが示された。

H30 年度は、chlorpromazine を用いて、Min マウスにおける腸ポリープ生成への影響について検討し、腸ポリープ生成数の有意な減少と、腸ポリープ部位における β-catenin シグナルの下流で制御される因子の mRNA 発現レベルの減少を見出した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1 発表者名：鱧屋隆博、藤井元、小宮雅美、黒川友理絵、高橋麻衣子、松澤優衣、三木洸平、十島二郎、武藤倫弘。

発表表題：クロルプロマジンを用いた腸発がん抑制。

学会等名：第 29 回日本消化器癌発生学会総会

発表年：2018 年

2 発表者名：Mutoh M

発表表題：Obesity and intestinal cancer development.

学会等名：International Symposium of Tokyo University of Science, Translational Research Center.

発表年：2018 年

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤井 元

ローマ字氏名：FUJII Gen

所属研究機関名：国立研究開発法人 国立がん研究センター

部局名：研究所

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：90321877

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。