

令和 4 年 10 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15619

研究課題名(和文)炎症誘導性大腸がんにおけるWnt5aの機能解析

研究課題名(英文)Wnt5a expression in cancer-associated fibroblasts promotes colitis-associated tumor formation

研究代表者

前原 奈都美 (Maehara, Natsumi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90783621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5aはbeta-catenin非依存的経路を担うWntリガンドの一つとして知られている。近年、腸管における炎症の増悪化因子としての役割が明らかになった。そこで本研究では、腸管での炎症に続いて起こる腫瘍形成過程における、Wnt5aの作用を検証した。その結果、大腸がん腫瘍において、通常のがん関連線維芽細胞マーカー陰性の線維芽細胞集団がWnt5aを発現しており、大腸がんの腫瘍形成を亢進することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が本研究に取り組んでいた期間に所属していた研究室では、2006年にWnt5aを均一タンパク質として精製することに成功して以来、一貫して精製Wnt5aの生化学的性質と細胞応答を解析してきた。また、Wnt5aの高発現は、ある種のがんの転移と関連すること、さらに腸管の慢性炎症を増悪化させることを明らかにしてきた。本研究では、これまでの知見に基づき、これまでは知られていなかったWnt5aを高発現するがん関連線維芽細胞の一集団が、Wnt5aによる炎症を背景とした大腸がんの腫瘍形成を亢進させることを示した点で、学術的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wnt5a is a key member of Wnt ligand that activates the  $\beta$ -catenin independent pathway and regulates the cytoskeletal reorganization, cell migration and polarity and gene expression. It is recently found that Wnt5a, which is expressed by fibroblast in the ulcer region, play a role in the development of colitis.

Here, we show the potent of Wnt5a developing the tumor formation of Colitis Associated- Colorectal Cancer (CA-CRC). In CA-CRC, we found that Wnt5a is expressed by unique fibroblast which does not express much of Cancer Associated Fibroblast (CAF) markers.

研究分野：病態医科学

キーワード：Wnt5a 大腸がん 潰瘍性大腸炎

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

### 1. 研究開始当初の背景

慢性的な炎症病態は、がんの発生や進展を促進することが知られている。しかし、炎症に関連したがん発症の分子メカニズムについては、未だ明らかでない点が多く存在する。

特に大腸での慢性炎症病態を有する炎症性腸疾患では、健常人と比較して、大腸がん発症の長期リスクが約 10 倍高いことが報告されている。近年の研究から、腸管炎症病態の増悪化において、Wnt5a という分泌タンパクの寄与が明らかになった。Wnt5a は、個体形成や細胞分化等において重要な分泌型タンパクであるが、腸管炎症病態においては、樹状細胞上の Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) 受容体を介して IL-12 の産生・分泌を亢進させる。その結果、Th1 細胞の分化が促進されることになり、腸管炎症病態が亢進する。

### 2. 研究の目的

本研究では、腸管炎症病態に続いて起こる大腸がんの腫瘍形成過程において、Wnt5a シグナルの役割を解明し、異常な Wnt5a シグナルによる大腸がん病態の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Wnt5a 発現様式 (発現細胞、発現時期) の同定

Wnt5a の発現上昇が、病態背景となる腸管炎症のみではなく、大腸がん腫瘍においても、その発現が観察されるかを検証した。

まず、炎症を背景とした大腸がん進行の各ステージにおける Wnt5a の発現を、AOM/DSS (アゾキシメタン / デキストラン硫酸ナトリウム) 誘導性大腸がんモデルマウス (図 1) を用いて継時的に、抗 Wnt5a 抗体を用いた免疫組織化学法によって解析した。

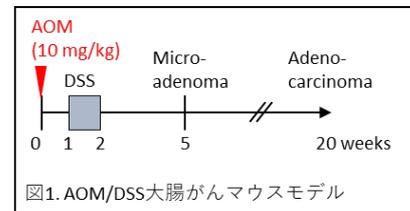


図1. AOM/DSS大腸がんマウスモデル

(2) AOM/DSS 誘導性大腸がんにおいて、Wnt5a を発現する細胞の種類を同定するために、各種細胞マーカーに対する抗体と抗 Wnt5a 抗体を用い、蛍光免疫染色法による解析を行った。

(3) 薬剤 (タモキシフェン) 誘導性全身性時期特異的 (CAG-CreERT) Wnt5a コンディショナルノックアウト ( $Wnt5a^{fl/fl}$ ) マウスを用い、炎症の鎮静化後の発がんに伴って、Wnt5a が高発現するDSS 飲水後、Wnt5a を欠失させた。腫瘍径や腫瘍数を計測し、野生型 ( $Wnt5a^{+/+}$ ) マウスと比較した。

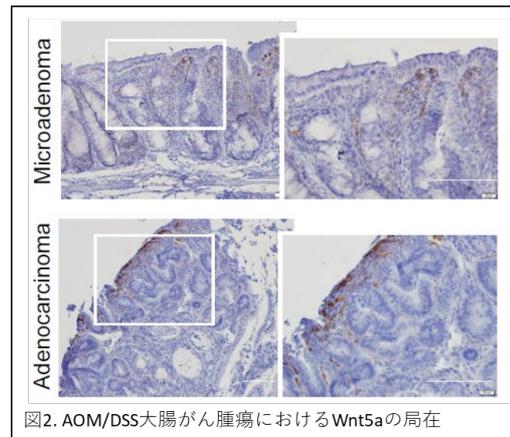


図2. AOM/DSS大腸がん腫瘍におけるWnt5aの局在

### 4. 研究成果

(1) AOM/DSS 誘導性大腸がんの線腫、腺がんにおいて、抗 Wnt5a 抗体を用いた免疫組織化学法による解析を行った。その結果、線腫、腺がんのどちらにおいても、間質領域における Wnt5a の局在が明らかになった (図 2)。

(2) AOM/DSS 誘導性大腸がんの腫瘍組織において、Wnt5a を発現する細胞の種類を同定するために、各種細胞マーカーと Wnt5a の共染色を行った。その結果、Wnt5a はマクロファージマーカーである F4/80 とは共局在しなかった。一方、線維芽細胞マーカーである gp38 (ポドプラニン) とは共局在した。この結果から、Wnt5a はがん関連線維芽細胞において、発現している可能性が考えられた。そこで、がん関連線維芽細胞マーカーである、alpha-SMA (alpha-Smooth Muscle Actin) や FAP (Fibroblast Activated Protein) に対する抗体を用い、解析を行った。その結果、Wnt5a と、alpha-SMA や FAP といった一般的ながん関連線維芽細胞マーカーとは共局在しなかった。

以上の結果から、腸管炎症を背景とする大腸がん腫瘍において、一般的に知られているがん関連線維芽細胞ではない線維芽細胞が、Wnt5a を発現することが明らかになった (図 3)。

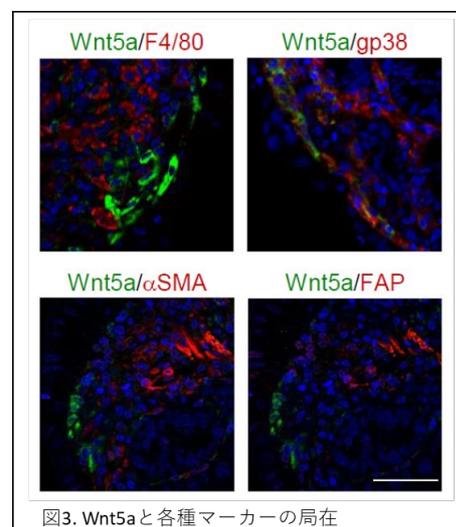


図3. Wnt5aと各種マーカーの局在

(3) まず、AOM 投与前から Wnt5a を欠損させたマウスを用い、*Wnt5a<sup>fl/fl</sup>* マウスとの比較を行った。その結果、Wnt5a 欠損マウスにおいて、大腸がん腫瘍の数・大きさともに減少することが明らかになった(図4)。

次に、DSS 処置後 2、4、6 週間の時点において、時期特異的に Wnt5a を欠損させた (*Wnt5a<sup>CAGΔΔ</sup>*) マウスと、*Wnt5a<sup>fl/fl</sup>* マウスを比較した。その結果、どの時点から Wnt5a を欠損させた場合においても、Wnt5a を欠損させることで大腸がん腫瘍の数・大きさともに減少することが示された(図5)。

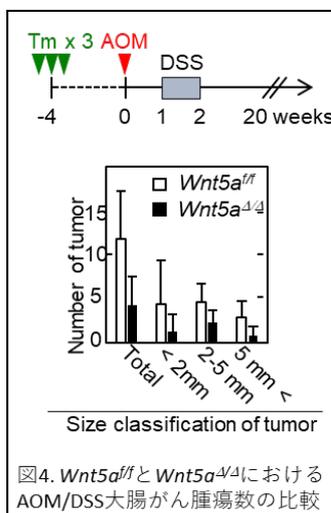


図4. *Wnt5a<sup>fl/fl</sup>* と *Wnt5a<sup>ΔΔ</sup>* における AOM/DSS 大腸がん腫瘍数の比較

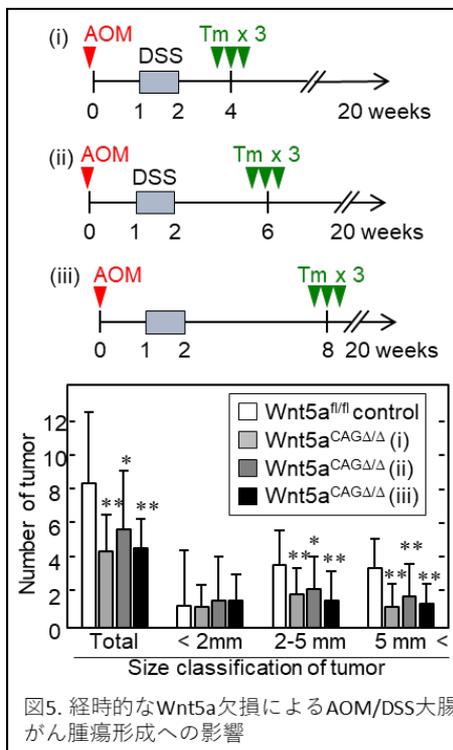


図5. 経時的な Wnt5a 欠損による AOM/DSS 大腸がん腫瘍形成への影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

前原奈都美、佐藤朗、麓勝己、菊池章 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 腸管炎症関連疾患における Wnt5a の機能解析 (2P-0839)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

該当なし

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：菊池 章

ローマ字氏名：KIKUCHI, Akira

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。