

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19584

研究課題名（和文）幹細胞マーカーLgr5の新規リガンドとReg4受容体の探索

研究課題名（英文）Search for novel Lgr5 ligands and receptor of Reg4

研究代表者

川崎 善博（Kawasaki, Yoshihiro）

東京大学・定量生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：10376642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らはLgr5とその関連分子であるReg4が大腸癌細胞株の造腫瘍性に必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた。Lgr5のリガンドは増殖因子Rspo（R-spondin）であることが知られているが、申請者らはR-spondin以外の新たなLgr5リガンドが存在していることを示唆する予備的な結果を得ていた。本研究では、細胞培養液や細胞抽出液からアフィニティークロマトグラフィーによってLgr5結合蛋白質やReg4結合蛋白質の単離・同定を行うシステムの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、疾患発症におけるLgr5の役割や重要性は十分に明らかにされていなかった。そのため、Lgr5やその関連因子を標的とした治療法や診断法の開発は進んでいない。今後、本研究によって得られた知見を基にして新規Lgr5リガンドを同定することができれば、Lgr5関連シグナル経路の異常による癌発症メカニズムが明らかになるだけでなく、これまでに類を見ない分子標的治療法の開発にも繋がる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have found that cooperation between Lgr5 and Reg4 is important for the tumorigenicity of colon cancer cells. It has been shown that LGR5 is an R-spondins receptor. However, we have obtained some preliminary data showing the existence of novel ligands for Lgr5. In this research project, we created a system that could purify Lgr5 and Reg4 binding proteins from cell culture medium and cell lysates by affinity chromatography.

研究分野：分子生物学

キーワード：Lgr5

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

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は細胞膜を 7 回貫通する特徴的な分子構造を有し、細胞外からのシグナルを細胞内に伝える重要な役割を担っている。GPCR は多種多様なリガンドに対応して重要な生理機能の制御を司るが、低分子化合物や抗体によりその機能を制御できることから、疾患に関わる GPCR の機能を明らかにすることは創薬の開発に直接結び付く重要な研究課題であると考えられている。

2. 研究の目的

GPCR の一つである Lgr5 は腸管上皮幹細胞や大腸癌幹細胞のマーカーとして考えられているが、癌発症との関連性については解析されていなかった。申請者らは Lgr5 とその関連分子である Reg4 (増殖因子の一種) が大腸癌細胞株の造腫瘍性に必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた。Lgr5 のリガンドは増殖因子 R-spondin であることが知られているが、申請者らは R-spondin 以外の新たな Lgr5 リガンドが存在していることを示唆する予備的な結果を得ていた。そこで本研究では、Lgr5 新規リガンドと Reg4 受容体 (GPCR と想定されている) の同定に挑戦し、大腸癌の新たな診断法や分子標的治療法開発の為に足掛かりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規 Lgr5 リガンドの探索

Wnt 経路活性化作用を持つ増殖因子の R-Spondin が Lgr5 のリガンドとして同定されたが (1-4)、R-Spondin と Lgr5 の結合では GPCR の一般的セカンドメッセンジャーである cAMP やカルシウムイオンの濃度に変化は起こらない (1,2)。一方で申請者らは、Lgr5 を強制発現すると GPCR の代表的な下流因子である転写因子 CREB の cAMP 依存的リン酸化が亢進すること、大腸癌細胞馴化培地 (SW620 もしくは Caco-2 細胞由来) を HeLa 細胞の培地に添加すると CREB の転写活性が増大するが、この現象は Lgr5 をノックダウンした HeLa 細胞では観察されないことを見出していた。また、1 種類の GPCR に対して複数種類の内在性リガンドが存在することも稀ではないことから、大腸癌細胞馴化培地には cAMP/CREB pathway を促進する新たな Lgr5 リガンドが含まれている可能性があると考えられた。そこで本研究では、Glutathione-Sepharose (GEヘルスケア) に結合した GST 融合 Lgr5 (細胞外領域のみ: Lgr5-Ex) を用いて、細胞培養液からアフィニティークロマトグラフィーによって結合蛋白質を回収し、LC-MS/MS 分析によって Lgr5 リガンドを同定することを目指した。

(2) Reg4 受容体の探索

His タグを融合した Reg4 (His-Reg4) を用いて、細胞抽出液からアフィニティークロマトグラフィーによって結合蛋白質を回収し、LC-MS/MS 分析によって Reg4 受容体を同定することを目指した。

< 引用文献 >

- Carmon KS, et al. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:11452-11457. 2011.
- de Lau W, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. Nature. 476:293-297. 2011.
- Glinka A, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/β-catenin and Wnt/PCP signalling. EMBO Rep. 12:1055-1061.2011.
- Ruffner H, et al. R-Spondin potentiates Wnt/β-catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. PLoS One. 7:e40976. 2012.

4. 研究成果

(1) 新規 Lgr5 リガンドの探索

GST 融合 Lgr5-Ex を用いて細胞培養液からアフィニティークロマトグラフィーによって結合蛋白質を回収する実験系の構築を試みた。まず、pGEX5x-1 ベクター (GEヘルスケア) に Lgr5 の細胞外領域部分 (Lgr5-Ex) をクローニングし、GST を融合した Lgr5-Ex (GST-Lgr5-Ex) 蛋白質を発現するコンストラクトを作成した。その後、GST-Lgr5-Ex を大腸菌で発現誘導し Glutathione-Sepharose を利用して一般的な GST たんぱく質精製プロトコールに従って精製を試みたが、実験開始当初は充分量の GST-Lgr5-Ex を回収することができなかった。そこで、GST

蛋白質調整法について様々な条件検討を行った。その結果、 GST たんぱく質の発現誘導に必要な IPTG 添加を行った後の大腸菌培養温度を 16 ℃へ変更、 GST たんぱく質を精製する過程で Glutathione-Sepharose から GST-Lgr5-Ex を溶出する際に使用する Buffer の pH を 7.5 から 8.8 へ変更、 溶出 Buffer への Tween-20、 NaCl の添加等の変更を行った結果、 大腸菌から GST-Lgr5-Ex を効率良く精製することに成功した。そこで、 Glutathione-Sepharose に再結合させた GST-Lgr5-Ex を bait として、細胞培養液からアフィニティークロマトグラフィーによって Lgr5 に結合する蛋白質の探索を行った。現在までに様々な精製条件で Lgr5-Ex に特異的に結合する因子の同定を試みたが、 結合候補因子を見出すことはできていない。本研究では大腸癌細胞馴化培地のみを実験材料としていたが、 今後はこれまでのリガンド探索研究で多くの実績がある動物(ラットやブタなど)の組織抽出物から新規 Lgr5 リガンドを単離・同定するシステムを構築する必要があると考えられた。

(2) Reg4 受容体の探索

His-tag を融合した Reg4 蛋白質を発現するコンストラクトを作成した。その後、 His-Reg4 を大腸菌で発現誘導し、 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid)アガロースレジンを用いて His-Reg4 たんぱく質の精製を行った。そこで、 Ni-NTA アガロースレジンに結合させた His-Reg4 を用いて細胞抽出液からアフィニティークロマトグラフィーによって結合蛋白質の回収を目指したが、 Reg4 結合因子を単離・同定することはできなかった。これまでは比較的温和な条件下で可溶化した細胞抽出液を実験に用いてきていることから、 今後はコール酸などの強力な可溶化を検討していく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Miyamoto M, Hayashi T, Kawasaki Y, Akiyama T*. SP5 negatively regulates the proliferation of HCT116 cells by upregulating the transcription of p27. *Oncol. Lett.* 15, 4005-4009, 2018. 査読有り
doi: 10.3892/ol.2018.7793.

Matsumura K, Kawasaki Y, Miyamoto M, Kamoshida Y, Nakamura J, Negishi L, Suda S, Akiyama T*. The Novel G-quadruplex-Containing Long non-coding RNA GSEC Antagonizes DHX36 and Modulates Colon Cancer Cell Migration. *Oncogene.* 36,1191-1199, 2017. 査読有り
doi: 10.1038/onc.2016.282.

〔学会発表〕(計3件)

川崎 善博、宮本 昌弥、松村 厚佑、根岸 瑠美、小田 健昭、中戸 隆一郎、須田 咲希子、横田 直子、白髭 克彦、秋山 徹

新規 lncRNA: *CALIC* は AXL の発現を誘導して大腸がん細胞の転移を引き起こす
第 19 回 東京大学生命科学シンポジウム, 2019

Kawasaki Y, Akiyama T

MYU, a target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates induction of CDK6 to promote cell cycle progression

Keystone Symposia-Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics- 2017

Yoshihiro Kawasaki, Masaya Miyamoto, Sakiko Suda and Tetsu Akiyama

The novel lncRNA CASCA induces the expression of AXL to promote colon cancer cell migration and drug resistance

第 76 回日本癌学会, 2017

〔図書〕(計1件)

川崎善博, 秋山徹 医歯薬出版

がん微小環境による造腫瘍性促進機構の解明を目指して,
別冊「医学のあゆみ」がん微小環境の病態理解と制御, 79-82, 2017.

〔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

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/akiyama-pathology/>

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：
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。