

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591589

研究課題名(和文) 大腸癌発生におけるWNT受容体FZD10の関与の解明

研究課題名(英文) A role of FZD10, a WNT receptor, in the colon carcinogenesis.

研究代表者

長山 聡 (NAGAYAMA SATOSHI)

財団法人癌研究会・有明病院消化器外科・医長

研究者番号：70362499

研究成果の概要(和文)：Wnt受容体のひとつFZD10は細胞膜蛋白であり、正常重要臓器での発現は殆ど認められないため、FZD10を標的にした新しい治療法(抗体療法)の開発を進めてきた。正常大腸粘膜、大腸腺腫、大腸癌(原発巣および肝転移巣)におけるFZD10の発現を検討したところ、正常大腸粘膜と正常肝組織での発現は認められず、原発巣および転移巣の大腸癌細胞に特異的にFZD10発現を認めた。大腸癌進展においてFZD10が関与していることを示唆しており、さらにFZD10が大腸癌治療(特に肝転移に対する治療)に有望な標的遺伝子であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Since FZD10 is located in plasma membranes as a cell-surface receptor for Wnt ligands and its expression is very low or absent in vital organs, we have focused on this molecule as a likely candidate for antibody-based therapy. We investigated the immunohistochemical expression patterns of FZD10 in tissue samples derived from patients with colorectal cancers. There was no immunoreactivity for FZD10 in normal colonic mucosa or normal liver parenchyma, whereas cancer cells in the primary and metastatic lesions showed an increased level of FZD10 expression. These results suggest that FZD10 may play a role in the progression of colorectal cancers and can be a promising candidate for a novel therapy of metastatic liver lesions from colorectal cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌、浸潤、Wnt伝達系、FZD10

1. 研究開始当初の背景

(1) 滑膜肉腫という軟部組織発生悪性腫瘍の遺伝子発現プロファイリングをcDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、滑

膜肉腫特異的遺伝子の一つとしてWNTに対する7回膜貫通型細胞膜受容体Frizzled familyの一つ、FZD10を同定し、以下の事実を見出した。

①ノザン解析及び免疫組織化学染色によってFZD10は滑膜肉腫に高発現しているのに対し、生命維持に重要な正常臓器では mRNA レベルでもタンパク質レベルでも発現が認められなかった。

②FZD10 陽性の滑膜肉腫 Xenograft 担癌マウスを用いて蛍光標識抗体による in vivo イメージング並びにインジウム 111 標識抗体による体内動態評価を行なった結果、抗 FZD10 抗体が腫瘍特異的に集積することが示された。

③治療モデルとして FZD10 陽性の滑膜肉腫 Xenograft が形成された後に、この担癌マウスにイットリウム 90 (⁹⁰Y) を付加した抗 FZD10 抗体を単回で静脈投与を行ったところ、検討した 11 匹全例で腫瘍の縮小効果を認め、そのうち 2 匹では投与後 1 ヶ月の時点でもほぼ完全消失し、腫瘍の再増大は認めなかった。これらの実験結果から、抗 FZD10 抗体は滑膜肉腫の治療に応用できる可能性が示唆された。

(2) 続いて、FZD10 が大腸癌においても分子標的治療の対象となるかどうかを検討した。正常大腸粘膜および大腸癌組織での FZD family (FZD1-10) の発現を RT-PCR で検討したところ、10 種類の FZD のうち FZD10 のみが大腸癌組織で特異的に発現亢進していることが明らかとなった。

以上の結果より、大腸癌における抗 FZD10 抗体の治療の可能性を追求することにした。

2. 研究の目的

大腸癌において FZD10 をターゲットとした治療の可能性を追求するために、

(1) 外科的切除されたヒトの腫瘍組織標本で FZD10 の発現状況を検討すること、

(2) 細胞株を利用した *in vitro* 実験で FZD10 が関与するシグナル伝達系およびその機能を明確にすること、を主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸腺腫、大腸癌、大腸癌肝転移巣における FZD10 の発現状況の検討

FZD10 に対する特異的抗体を作成し、大腸癌切除 104 例を対象に抗 FZD10 抗体を用いて免疫染色にて FZD10 発現状況を調べた。また、このうち 30 例では並存する腺腫でも FZD10 の発現を検討し、別の 17 症例では切除された肝転移巣と原発巣で発現状況を比較し、癌進展に伴う FZD10 発現の変化を検討した。さらに患者の臨床病理学的因子ならびに予後と FZD10 発現との相関の有無を検討した。

(2) FZD10 シグナル伝達系の解明

大腸癌切除標本を用いて、Wnt シグナル伝達系の主要な構成因子である β -catenin 蛋白と FZD10 蛋白の発現状況の相関性を免疫染

色にて検討し、FZD10 シグナル伝達系と β -catenin (canonical pathway) との関連性を考察した。

(3) FZD10 発現制御メカニズムの解明

Luciferase を用いた reporter assay によって、FZD10 遺伝子の転写調節領域および core region の同定を試みた。ゲノム配列の情報から転写調節領域に結合しうる候補転写因子を類推し、EMSA および ChIP assay にて転写を制御している転写因子を追求した。

4. 研究成果

(1) 大腸腺腫、大腸癌、大腸癌肝転移巣における FZD10 の発現状況の検討

①正常大腸粘膜、正常肝組織での発現は認められず、腫瘍特異的に FZD10 の発現が認められた (図 1)。

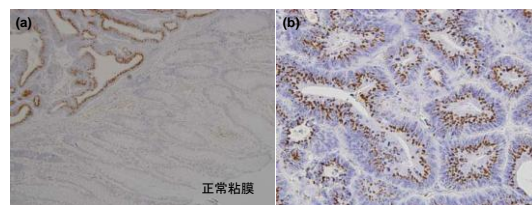


図1 免疫組織化学的染色によるFZD10の発現検討。
同一患者における原発巣(a)と肝転移巣(b):正常粘膜や肝実質には発現は認められず、原発巣と転移巣で癌細胞は同様に染色された。

②大腸腺腫と大腸癌が併存する 30 症例では、大腸腺腫での発現頻度 ($3.3 \pm 10.3\%$) に比較して大腸癌での発現頻度 ($20.5 \pm 31.7\%$) が有意に増加した ($P=0.0016$)。

③同一患者 (17 症例) における大腸癌の発現頻度 ($33.2 \pm 39.7\%$) は肝転移巣の発現頻度 ($26.4 \pm 33.4\%$) と有意差はなかった。また、原発巣と転移巣との発現頻度には正の相関が認められた (Pearson coefficient=0.90)。

④FZD10 発現と臨床病理学的因子および予後との間には有意な相関は認められなかった。

(2) FZD10 シグナル伝達系の解明

FZD10 陽性および FZD10 陰性癌細胞での β -catenin の発現強度ならびに核移行の状況を検討した結果、FZD10 陽性大腸癌細胞では β -catenin の核蓄積が有意に少なく、逆に FZD10 陰性癌細胞で β -catenin の核蓄積が有意に増加していた (図 2 次ページ)。このことは FZD10 が non-canonical pathway を介してシグナル伝達を行う、或いは canonical pathway に対して抑制的に作用する可能性を示唆している。

(3) FZD10 発現制御メカニズムの解明

FZD10 遺伝子の転写調節領域を決定し、Luciferase assay にて転写に関する core region を同定した。複数の転写結合領域を含んでいるが、転写調節に関与しうる主要因子

の同定にはまだ至っていない。

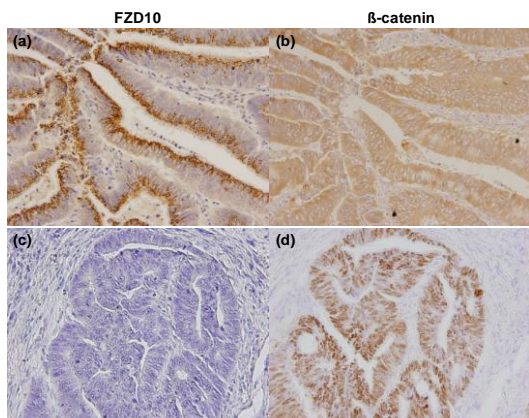


図2 免疫組織化学的染色によるFZD10とβ-cateninの発現の比較検討。連続切片におけるFZD10発現(a)(c)とβ-catenin発現(b)(d)：FZD10陽性癌細胞ではβ-cateninの核内蓄積は殆どなく、逆にFZD10陰性癌細胞ではβ-cateninの核内蓄積が認められた。

(4) 本研究成果の位置づけ

FZD10 の癌化への関与を検討した研究は国内外を問わず報告されておらず、新規性の高い研究と考えている。また、FZD10 をターゲットとした大腸癌に対する新しい治療を開発するにあたっての基盤研究になるものと理解している。

(5) 今後の展望

- ①FZD10 遺伝子の転写調節領域および core region のゲノム配列情報から候補転写因子を類推し、EMSA および ChIP assay にて転写を制御している転写因子を同定する。これにより、癌細胞で過剰発現している機序の解明の一助になると考えている。
- ②大腸癌は正常大腸粘膜を発生母地としているため、FZD10 の発現を認めない正常粘膜上皮にFZD10 を発現させた時に起きうる変化は癌化に関連している可能性がある。切除標本からの primary culture による正常大腸上皮細胞にFZD10 を外因性に発現させることによって機能や形態に変化が生じるかどうか検討することを計画している。
- ③FZD10 陽性大腸癌細胞株を脾注し肝転移モデルを作成したのち、蛍光ラベルした抗FZD10 抗体を静脈投与あるいは腹腔内投与し、肝転移巣に集積するかどうかを試みる予定である。可能であれば、さらに RI ラベルした抗FZD10 抗体を静脈投与し、肝転移巣の縮小がみられるかどうかを検討したいと考えている。

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)

- ① Radioimmunotherapy of human synovial

sarcoma using a monoclonal antibody against FZD10.

Chikako Fukukawa, Hirofumi Hanaoka, Satoshi Nagayama, Tatsuhiko Tsunoda, Junya Toguchida, Keigo Endo, Yusuke Nakamura and Toyomasa Katagiri
Cancer Sci 99: 432-440, 2008 査読有

② Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors.

Nagayama S, Yamada E, Kohno Y, Aoyama T, Fukukawa C, Kubo H, Watanabe G, Katagiri T, Nakamura Y, Sakai Y, Toguchida J
Cancer Sci 100: 405-412, 2009 査読有

③ Activation of the non-canonical Dvl-Rac1-JNK pathway by Frizzled homologue 10 in human synovial sarcoma
Fukukawa C, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Nakamura Y, Katagiri T
Oncogene 28: 1110-1120, 2009 査読有

[学会発表] (計0件)

[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

長山 聡 (NAGAYAMA SATOSHI)

財団法人癌研究会・有明病院消化器外科・
医長

研究者番号：70362499

(2)研究分担者

坂井 義治 (SAKAI YOSHIHARU)

京都大学医学研究科・教授

研究者番号：60273455

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)

京都大学再生医科学研究所・教授

研究者番号：40273502

久保 肇 (KUBO HAJIME)

京都大学医学研究所・講師

研究者番号：50362520

(3)連携研究者 なし