

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07973

研究課題名（和文）サイトカイン共通受容体 c鎖によって制御される大腸がん幹細胞の解析

研究課題名（英文）Role of common gamma chain in colorectal cancer

研究代表者

涌井 祐太（Wakui, Yuta）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・特任研究員

研究者番号：50756939

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）：進行大腸癌は現在でも難治性の疾患であり、新しい治療標的が望まれている。申請者は、サイトカイン IL-2 の受容体サブユニットの1つ、c鎖がデータベース上、上皮細胞では比較的低発現である一方で、癌、特に大腸癌において発現亢進していることに気づいた。複数の実験を実施した結果、これまで知られているc鎖とは異なる下流シグナルによって制御されている可能性が示唆された。現在、c鎖に結合するタンパクを網羅的に同定して新しいシグナル分子を同定することを試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行大腸癌は現在でも難治性の疾患であり、新しい治療標的が望まれている。私たちの研究はこの疾患に対して新しい治療薬を開発するために実施している。大腸癌細胞の増殖を制御する新規分子を同定し、その経路を阻害する小分子化合物を同定することを最終目標として研究を続けている。

研究成果の概要（英文）：Advanced colorectal cancer remains an intractable disease and new therapeutic targets are needed. We noticed that c chains, one of the receptor subunits of the cytokine IL-2, are up-regulated in cancers, especially in colorectal cancer, while their expression is relatively low in epithelial cells in the public database. We performed several experiments and found that c chains may be regulated by downstream signals that are different from the previously known c chains. We are now attempting to identify novel signaling molecules by comprehensively identifying proteins that bind to c chains.

研究分野：がん生物学

キーワード：IL2R

1. 研究開始当初の背景

進行大腸癌は現在でも難治性の疾患であり、新しい治療標的が望まれている。サイトカイン IL-2 の受容体サブユニットの1つ、 γ c 鎖は申請者のグループの菅村によりクローニングされた (Science 1992)。IL-2 以外に IL-4、-7、-9、-15、-21 の受容体サブユニットとして共有され (このため common chain、 γ c 鎖と表記される)、免疫系の制御に重要な役割を果たしている。同じく菅村により作成された γ c 鎖ノックアウトマウスは免疫系以外では異常を示さなかったことから、上皮細胞での機能解析は進められていなかった。申請者は、この γ c 鎖がデータベース上、上皮細胞では比較的低発現である一方で、癌、特に大腸癌において発現亢進していることに気づいた。そこで大腸癌細胞株で本遺伝子をノックアウトしたところ、*in vitro* での増殖能の低下や、幹細胞性遺伝子の発現低下が観察された。興味深いことに、 γ c 鎖からの重要なシグナルである JAK/STAT 伝達系には、変化がみられなかった。これらのことから、癌細胞における γ c 鎖の機能は、これまで解析されてきたものとは全く異なる機能を有する可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、 γ c 鎖が大腸癌の発症/悪性化に機能していることを細胞株と臨床検体を用いて検証し、さらに、その分子機構を解明することにある。 γ c 鎖に関しては長年免疫系細胞における機能が研究されてきたが、大腸癌を含め上皮系癌での発現制御や機能は顧みられていなかった。免疫系のシグナル伝達として重要な NFkB シグナル伝達系は、大腸癌においても重要な役割を果たしていることが示され、大腸癌の分子病態の理解、さらには阻害剤による治療法開発へと展開された。同様に、大腸癌における γ c 鎖機能解析は、大腸癌の基礎研究ならびに臨床応用研究における新たな展開をもたらすことが期待される。

γ c 鎖は血球系細胞にほぼ普遍的に発現するサイトカイン共通受容体として以前から知られていたが、非血球系細胞、中でも、上皮系癌細胞での γ c 鎖の発現に関する研究は膀胱癌での発現を報告した上記1報のみで、発現の意義は明らかにされていない。大腸癌の治療標的としてこれまで VEGFR シグナル、EGFR シグナル、NFkB シグナルが同定され、一部治療応用へと展開されているが、適応が限られることや、再発の問題が残されており、新たな治療標的の同定が望まれている。このような現状において、大腸癌の病態に関与する新規シグナル伝達系を明らかにする本研究の意義は大きいと考える。また、本研究は臨床検体を用いて、腫瘍と腫瘍環境を構成する細胞(間質細胞、浸潤血球系細胞)における γ c 鎖を中心としたサイトカインシグナルのネットワークを明らかにすることも計画している。その成果は大腸癌の癌免疫療法開発への寄与が期待される。さらに、本研究では γ c 鎖下流のシグナルとして、既に明らかな JAK/STAT シグナルに加え、他のシグナル伝達系への影響を評価する。上皮系細胞で異所性に発現した γ c 鎖の機能を明らかにすることで、サイトカインシグナルの基礎研究において、新たな展開をもたらす可能性が期待される。以上から、学術的にも社会的にも意義深いテーマであると考えている。

3. 研究の方法

大腸がん細胞株 HT-29、DLD-1、HCT-116 を用いて検討した。

サイトカインを株化大腸癌細胞に投与したときに活性化されるシグナル伝達系を同定する。さらに最終的に発現が変動する遺伝子を網羅解析で同定する。サイトカイン投与後の細胞からタンパク抽出液を調製し、シグナル分子の活性化をウェスタンブロットにより検討する。既に作製した γ c 鎖遺伝子ノックアウト細胞とその親株で活性化を比較し γ c 鎖に依存するシグナル伝達系を同定する。これまで調べた大腸癌細胞株 (DLD-1、HT-29) では IL-4 刺激後、STAT5 のリン酸化が亢進することを確認した。また、菅村グループの解析では成人 T 細胞白血病由来の細胞株で γ c 鎖遺伝子をノックアウトした場合、JAK/STAT 以外に MAPK、AKT 関連のシグナル分子活性化の変動が観察されたことから、JAK/STAT 以外のシグナル伝達系に関してもその活性化を検討する。さらにサイトカイン投与後の細胞から RNA を調製し RNAseq により遺伝子発現の変動を調べる。また、前述の通り、大腸癌における γ c 鎖の機能は従来知られているものとは全く異なる可能性がある。これを明らかにするために、大腸癌細胞株において γ c 鎖を免疫沈降して会合分子を LC-MS/MS (外注) で同定する。同定したタンパクを siRNA でノックダウンし、癌形質 (*in vitro* での増殖、浸潤能、スフェア形成能、xenograft での造腫瘍能) が変化するかどうかを確認する。

4. 研究成果

大腸癌細胞の HT-29、DLD-1、HCT-116 で γ c 鎖ノックアウト細胞を作成した。同細胞を用いて、

in vitro 増殖能を MTT 試験にて検討したところ、ノックアウト細胞では増殖能が低下することが分かった。そこで、さらに以下の実験を実施したが、有意な差を認めなかった：

- 1) NOG での造腫瘍性
- 2) スフェアアッセイ
- 3) 5-FU 感受性
- 4) シグナル分子の活性化 (AKT, ERK, STAT/ウェスタン)

上記の実験からは、in vitro での増殖能低下が何に依るものなのかははっきりとしなかった。すなわち、これまで知られている c 鎖の機能とは違うものが存在することが予想された。そこで、当初の予定通り c 鎖を免疫沈降して会合分子を同定することで新しい下流分子を同定することを実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasumoto Akihiro, Fujimori Haruna, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Shindo Norihisa, Yamaguchi Kazunori, Fukushi Daisuke, Wakui Yuta, Sugai Takahiro, Iwai Wataru, Abue Makoto, Sato Ikuro, Satoh Kennichi, Katayose Yu, Yasuda Jun, Shibata Chikashi, Tamai Keiichi	4. 巻 655
2. 論文標題 BEX2 is poor prognostic factor and required for cancer stemness in gastric cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.025	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukushi Daisuke, Shibuya Takahashi Rie, Mochizuki Mai, Fujimori Haruna, Kogure Takayuki, Sugai Takahiro, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Murakami Kazuhiro, Nakamura Yasuhiro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Shibata Chikashi, Katayose Yu, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 112
2. 論文標題 BEX2 is required for maintaining dormant cancer stem cell in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4580 ~ 4592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15115	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉井 恵一 (Tamai Keiichi) (40509262)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長 (81303)	
研究分担者	山口 壹範 (Yamaguchi Kazuonori) (80373215)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・研究員 (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------