

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790670

研究課題名（和文） 化学療法抵抗性大腸癌における CDX2 およびチロシンキナーゼの
 関連とメカニズム

研究課題名（英文） The Association between CDX2 and tyrosine kinases in chemotherapy
 refractory colorectal cancer and its mechanism.

研究代表者

船越 信介 (FUNAKOSHI SHINSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20297352

研究成果の概要（和文）：

CDX2 強制発現大腸癌 Colo205 安定細胞株(M-X2)と MIGR1 強制発現コントロール株(MIGR1)を用いて、様々な受容体型チロシンキナーゼ蛋白質のリン酸化状態および細胞接着マーカーの発現解析をした。続いて、CDX2 が caveolin1 の mRNA、蛋白発現を制御し PDGFR, c-Abl, CrkL シグナル伝達系を抑制的に制御することを示した。さらに現在 CDX2 による Rac1 発現の制御のメカニズムを追及している。

研究成果の概要（英文）：

Using MIGR1- control and MIGR-Cdx2-infected Colo205 cells, the phosphorylation states of several receptor tyrosine kinases and the expression of cell adhesion marker were analyzed. Secondly, in Colo 205 cells, Cdx2 increased caveolin in mRNA and protein levels and suppressed PDGF receptor, IGF-I receptor, downstream molecules c-abl and CrkL. This was mediated by caveolin-1, which was induced by Cdx2. Furthermore, we are determined to pursue the mechanism the regulation of Rac1 expression by Cdx2 in colorectal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：CDX2 強制発現大腸癌細胞株、細胞接着、Rac1、IGF、c-MET、sp 細胞

1. 研究開始当初の背景

大腸癌はわが国の癌死の主要な原因のひとつである。大腸癌に関係する癌遺伝子は ras, src, c-myc, c-erbB2 などである。特に K-ras の変異は大腸癌で最も発生頻度の高い遺伝子で、通常の大腸癌の 50%、大きさ 1cm 以上の腺腫症例の 50%に認められる。さらに本邦でも K-ras の変異の測定に関する日本臨床

腫瘍学会によるガイドランスが作成され、K-ras 遺伝子解析が行われ、抗 EGFR 抗体薬と K-ras 遺伝子との関係が注目されている。一方、大腸癌に関係する癌抑制遺伝子は APC, DCC, SMAD4/SMAD2, p53 があげられる。APC 遺伝子の両対立遺伝子の体細胞変異は通常の大腸癌の 80%にみられる。家族性大腸ポリポーシスでは単一の APC 遺伝子の生植

細胞系列の変異が診断基準のひとつとなる。近年、Oxaliplatin, Cetuximab などの新規抗癌剤や分子標的治療薬の開発・応用の進歩により、大腸癌の治療成績は劇的な改善を認めている。しかしながら、抗癌剤の有効性は限界があり、今後 2 次治療、3 次治療に続く新たな抗癌剤のレジメンの確立が必須である。大腸癌に対する化学療法の実状は、消化器系固形癌の中では他の癌種（膵臓癌、胆管癌など）に比べて化学療法に対する奏効率が比較的高いことが特徴であるといえる。後天的治療抵抗性の原因として、腫瘍細胞の薬剤感受性、腫瘍増殖速度の問題、drug-delivery の難しさ、転移、浸潤などが問題となっているが、細胞増殖シグナル（K-ras、BRAF、Epidermal Growth Factor 受容体など）の過剰活性化が比較的多く見られる大腸癌細胞においては、治療薬剤に対するアポトーシス抵抗性が治療抵抗性を規定する重要な因子になっていると考えられる。したがって、大腸癌細胞における後天的治療抵抗性に関わる規定分子の同定・制御が治療成績改善に重要であり、分子標的治療における有効な標的分子の決定が急務である。

治療成績向上のためには、①受容体型チロシンキナーゼ遺伝子変異の解析、②遺伝子変異とシグナル始動機能の相関、③受容体型チロシンキナーゼシグナル経路における後天的治療抵抗性決定分子の同定、④多剤併用療法を踏まえた感受性決定分子の機能制御、などの課題を含む検討が必要である。申請者らはこれまで、消化管特異的に発現する転写因子 Cdx2(caudal type homeobox)に着目し、消化器系癌とくに大腸癌細胞における細胞接着および columnar morphogenesis のシグナル伝達経路に関する研究を行ってきた。Cdx2 は多面性を有し、細胞の増殖、アポトーシス、分化、細胞周期、細胞接着などに関与する。現在まで多くの研究者により Cdx の標的分子が同定されている。Guo らは E-cadherin を介した細胞間接着と Wnt シグナリングの中心的役割を担う β -catenin の転写活性を調べ、大腸癌において悪性度が高まると、E-cadherin- β -catenin が Cdx により阻害されることを報告している²⁾。さらに β -catenin の翻訳後の修飾を介して Cdx が大腸癌細胞の分化を誘導する。大腸癌において悪性度が高まると、E-cadherin- β -catenin あるいは p120-catenin の結合能が減弱し、細胞の運動能、転移能が増加することがいわれている。Ezaki らは Cdx が protein tyrosin phosphatase 1B(PTP1B) を介して β -catenin あるいは p120-catenin の結合能を阻害することによって E-cadherin の機能を抑制し、癌の浸潤を抑えることを報告した。周知のとおり、チロシンキナーゼは最も多い癌遺伝子産物で細胞の増殖、分化、生存に関

わる分子である。申請者は Cdx が PTP1B のみならず受容体型チロシンキナーゼあるいは非受容体型チロシンキナーゼに影響し、 β -catenin、p120-catenin および E-cadherin の機能を抑制し、癌の浸潤を抑えると仮説した。Preliminary data として CDX2 強制発現ヒト大腸癌細胞株とコントロール株の細胞抽出液を用いて、phospho Tyrosine receptor kinase protein array により 44 種類の受容体型チロシンキナーゼのリン酸化状態を調べた。特に EGF, IGF, c-MET のリン酸化に着目し、研究を継続する。

2. 研究の目的

本申請研究は、大腸癌細胞においてその細胞接着、columnar morphogenesis、浸潤、転移の抑制作用を担う転写因子 Cdx の分子機構を解明し、大腸癌治療戦略に応用することを目的とする。大腸癌細胞のシグナル伝達過程にかかわる遺伝子群の中で、後天的治療抵抗性克服のために有効な標的分子を同定し、RNA Interference (RNAi) による抑制効果を検討し、新たな創薬への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) MIGR-CDX2 強制発現大腸癌細胞株と MIGR コントロール株における受容体型チロシンキナーゼ蛋白質の発現および遺伝子変異の解析と細胞接着、上皮間葉転換、転移能との相関

MIGR-CDX2 強制発現ヒト大腸癌細胞株と MIGR コントロール株における受容体型チロシンキナーゼ蛋白質の発現と遺伝子変異を解析する。変異の有無と細胞接着、上皮間葉転換、転移能との相関を検討する。

(2) 内因性 CDX2 発現大腸癌細胞株と ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株の形態的変

化、細胞接着の変化および癌転移抑制効果とシグナル修飾機構の解析

内因性 CDX2 発現ヒト大腸癌細胞株に対して、ヘアピン型 siRNA 発現ベクター (ShRNA) を用いて安定細胞株を作成し、主要なチロシン受容体シグナルの細胞接着、転移、浸潤への関与を明らかにする。EGF (あるいは IGF, c-Met) 受容体特異的 ShRNA の安定細胞株を作成し非導入株と、比較検討する。シグナル伝達経路を各段階ごとに比較検討し、シグナル修飾の作用点を明らかにするとともに、細胞接着あるいは転移、浸潤に関与する標的分子を同定する。

(3) In Vitro における腫瘍縮小効果の検討
各種細胞株を 3D ゲルで培養し抗癌剤および新規分子標的薬を添加し、アポトーシス感受性、増殖能、浸潤能を比較検討する。 β

-cateninの転写活性をみるため TOPFLASH assay を行う。

(4) In Vivoにおける腫瘍縮小効果の検討、signaling pathway 解析
ヌードマウスを用いた腫瘍皮下移植モデルを作成し、腫瘍縮小効果を検討する。レンチウイルスベクターを用いた RNAi により、変異 EGF 受容体あるいはその下流シグナル分子の発現抑制を行う。有効な腫瘍縮小効果を誘導する分子を同定し、RNAi 遺伝子導入を応用した新たな創薬の可能性を模索する。

4. 研究成果

(1) GFP をコードする MIGR expression vector (米国 university of Pennsylvania 大学 John P. Lynch 准教授より既に供与済み)を用いた CDX2 強制発現大腸癌 Colo205 安定細胞株(M-X2)と MIGR1 強制発現コントロール株(MIGR1)に対して、受容体型チロシンキナーゼ蛋白質 EGF, IGF, c-MET の mRNA レベル、蛋白発現レベルおよび遺伝子変異の解析を行った。総蛋白質の発現量に変化を認めなかったため、次に MIGR1 および M-X2 における EGFR, IGF, c-MET 受容体遺伝子および細胞接着マーカー E-cadherin、 β -catenin、p120catenin、DSC2、N-Cadherin、vimentin のリン酸化状態を解析した。CDX2 の強制発現により EGFR は変化なく、IGF、c-MET で低下、間葉系マーカーが低下し、細胞接着が増強した。細胞運動能、浸潤能の検討では MIGR1 に比し、M-X2 細胞にて細胞運動能、浸潤能が低下した。さらに small GTPase の RhoA, Rac1, CDC42 の活性化の検討においては Rac1 が減少した。CDX2 強制発現大腸癌細胞株において活性化状態にある受容体型チロシンキナーゼの下流標的分子の探索し、非受容体型 src, c-cbl, さらには Rac1 に注目した。

(2) CDX2 強制発現大腸癌 Colo205 安定細胞株(M-X2)と MIGR1 強制発現コントロール株(MIGR1)を用いて転写因子 CDX2 が caveolin1 の mRNA, 蛋白発現を抑制し PDGFR, c-Abl, CrkL シグナル伝達系を抑制的に制御することを示した。さらにこの伝達経路の下流シグナルをつきとめるべく、small GTPase の RhoA, Rac1, CDC42 の活性化の検討においては Rac1 が減少した。ヒトの大腸癌組織を用いた免疫染色の検討において CDX2 の高発現大腸癌では Rac1 の発現は認められなかったが、癌先進部において CDX2 の発現を認めない癌細胞においてのみ Rac1 発現を認めたことは特筆すべき現象である。一方 CDX2 発現のない低分化型大腸癌で Rac1 は高発現を認めた。Caveolin1, PDGFR, IGF1R, phosphoPDGFR, phospho IGF1R, c-Abl, CrkL の免疫染色を検討したが、CDX2 発現による差

は少なかった。現在 CDX2 による Rac1 発現の制御のメカニズムを追及するために、内因性 CDX2 を高発現する CaCO2 大腸癌細胞株、T84 大腸癌細胞株および siRNA, ShRNA を用いて CDX2 をノックダウンし、mRNA および蛋白発現レベル、細胞接着能、細胞浸潤能、細胞増殖能を検討した。

前年度に CDX2 と Rac1 発現に逆相関が疑われる事象が認められ、Rac1 の運動能と大腸癌の転移メカニズムを追及することとなった。さらに転移能が高く、化学療法抵抗性のポテンシャルを有するとされている side population 細胞(sp 細胞)に着目した。大腸癌の悪性化に重要な低分子量 GTPase の代表的分子が Ras ファミリーであるが、その類似分子である Rho ファミリーの RhoA, Rac1, CDC42 の活性化を各種大腸癌細胞株において調べた。その結果、Rac1 の活性化と sp 細胞分画の割合に相関関係を見出した。さらに Rac1 活性の高い sp 細胞株においてマトリジェル浸潤法にて高浸潤性を示し、RhoA 非依存的、Rac1 依存的な運動性亢進を示した。また Rac1 の標的分子である WAVE を阻害することにより運動能の著しい低下を認めた。一方 Rac1 活性の低い sp 細胞株においては細胞の運動能は低かったが、活性型 Rac1 を発現する遺伝子を導入することにより、運動能は明らかに増加した。Rac1 chemical inhibitor NSC23766 による sp 細胞株の著明な運動性低下とともに細胞間接着因子 E-カドヘリン、核内 β カテニンの膜分画への再移行、CDX2 の核への再移行を認めた。再びヒトの大腸癌組織を用いた免疫染色の検討に戻り、大腸癌原発巣の中心部、癌先進部および肝転移巣の同一症例 16 組の比較検討を行ったところ、癌先進部における CDX2、E カドヘリンの発現低下、 β カテニンの核内移入、活性型 Rac1 の核内移入を認め、CDX2 高発現 Rac1 低発現細胞株に対する CDX2 のノックダウンと CDX2 低発現 Rac1 高発現細胞株に対する CDX2 のノックイン細胞株作成し、Rac1 活性化、E-カドヘリン、 β カテニンの局在、sp 細胞分画を確認している。さらにこの仮説を一般化するためにさらなる実験が必要となる。

(3) In Vitro における腫瘍縮小効果の検討においては各種細胞株を 3D ゲルで培養し抗癌剤および新規分子標的薬を添加し、増殖能、浸潤能を比較検討したが、CDX2 低発現 Rac1 高発現細胞株に対する Rac1 inhibitor の増殖能、浸潤能の抑制を確認した。

(4) In Vivo における腫瘍縮小効果の検討、signaling pathway 解析においては、まだヌードマウスを用いた腫瘍皮下移植モデルは実施していない。今後の検討課題である。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Shinsuke Funakoshi et al: Rac1 Activation Promotes Invasive Phenotype of Side Population in Colon Cancer Cells by Destabilizing the E-cadherin- β -catenin Ligations. The AACR Annual Meeting 2013. April 9, 2013, Washington DC.
- ② Shinsuke Funakoshi et al: Inhibition of activated Rac1 signaling induces recovery of E-cadherin function and abrogation of invasive phenotype of side population in colon cancer cells. The 6th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS). 2013. 1. 26. Tokyo.
- ③ Shinsuke Funakoshi et al: Rac1 Activation Promotes Invasive Phenotype of Side Population in Colon Cancer Cells by Destabilizing the E-cadherin- β catenin Ligations. The 8th International Symposium on cancer research and therapy. 2012. 11. 9. Tokyo.
- ④ 船越信介 他: 大腸癌細胞株における side population cell の分離と活性型 Rac1 の発現および運動能の解析. 第 21 回日本癌病態治療研究会ワークショップ 2 「癌診療: 基礎医学からの提言」. 2012. 7. 6. 前橋.
- ⑤ Shinsuke Funakoshi et al: Intestine-specific transcription factor Cdx2 enhances E-cadherin function in colon cancer cells through caveolin-1 mediated suppression of the c-Abl/CrkL/Rac1 signaling pathway. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011. 10. 3. 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船越 信介 (FUNAKOSHI SHINSUKE)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 20297352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

JOHN P LYNCH (JOHN P LYNCH)
University of Pennsylvania,
Department of Medicine, Division of
Gastroenterology, Associate
Professor of Medicine

東 俊文 (AZUMA TOSHIFUMI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 00222612