

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300349

研究課題名(和文)腸管腫瘍形成における PLEKHG1 の役割

研究課題名(英文)Roles of PLEKHG1 in intestinal tumor formation

研究代表者

青木 正博 (AOKI, MASAHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・部長

研究者番号：60362464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000 円、(間接経費) 5,070,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は大腸がんの発生・進展における PLEKHG1 の役割の解明を目指した。Plekhg1^{-/-}; Apc^{+/-} 716 複合変異マウスでは、Apc^{+/-} 716 マウスと比較して直径 3 mm 以上の大腸ポリープ数が有意に多かった。in situ hybridization 法により、腸管では PLEKHG1 の発現は主に腸上皮細胞に認められた。一方、大腸がん細胞に上皮間葉転換(EMT)を誘導すると PLEKHG1 の発現が著しく増加し、大腸がん細胞株に PLEKHG1 を強制発現させるとマトリックス浸潤能が亢進した。PLEKHG1 は大腸がんの発生初期過程では抑制的に働くが、浸潤・転移は促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the roles of pleckstrin homology domain containing, family G member 1 (PLEKHG1) gene encoding a member of Dbl-family RhoGEFs, in development and progression of colon cancer. Knockdown of PLEKHG1 in HCT 116 colon cancer cells resulted in increased proliferation rate and decreased cell-cell adhesion in vitro. The Plekhg1 gene knockout in Apc mutant mice, a model for familial adenomatous polyposis (FAP) and the early stage of colon cancer development, resulted in increased number of colonic polyps in the large size class. On the other hand, induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colon cancer cells led to a dramatic increase in the PLEKHG1 mRNA level, and forced expression of PLEKHG1 in colon cancer cells resulted in enhanced invasion activity through Matrigel. These results suggest that although PLEKHG1 may have a tumor suppressor-like function in early stage of colon cancer formation, it may promote invasion at later stages.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：大腸がん がん抑制遺伝子 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス転写因子 CDX2 は、消化管の発生、消化管上皮細胞の分化、分化形質に深く関与し、大腸癌の抑制因子とされる。PLEKHG1 (pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain), member 1) は CDX2 の新規標的遺伝子候補として申請者が同定した遺伝子で、そのコードするタンパクは Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパクに対する GEF 活性を持つ Dbl ファミリーに属することが分かっていたが、この PLEKHG1 の機能に関する研究報告は全くなかった。申請時点までに、PLEKHG1 遺伝子の上流 30 kbp の領域に CDX2 及び CDX1 が結合すること、この領域が CDX 依存的なエンハンサー活性を持つことが分かっていた。また、ラットの正常腸上皮由来細胞株 IEC-6 で tet-on システムにより CDX2、CDX1 を誘導的に発現させると、Plekhg1 の発現が誘導され、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 で CDX2 をノックダウンしたところ、PLEKHG1 の発現は低下したことから、PLEKHG1 は CDX 転写因子の直接の標的遺伝子であると考えられた。また、Plekhg1 遺伝子の KO マウス作出を行い、その null allele を持つ変異マウスを既に得ていた。さらに PLEKHG1 の機能に関与する分子を同定するために PLEKHG1 の共沈タンパクを質量分析によって解析した結果、PLEKHG1 と 14-3-3ζ が結合すること、その結合は PLEKHG1 の Ser611 のリン酸化に依存することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究計画では、PLEKHG1 が腸管上皮細胞の分化及び大腸癌の発生・進展において果たす役割を解明し、大腸癌の新たな治療標的を同定することを目指した。Plekhg1 の KO マウス及びコンディショナル KO マウスを、腸管に腺腫性ポリープを発症する Apc 変異マウス及び腸がんを発症する cis-Apc/Smad4 マウスと交配し、腫瘍発生、進展に与える影響を調べることで、大腸癌細胞株、正常腸上皮由来細胞株を用いて、PLEKHG1 の細胞増殖、細胞間接着、細胞極性等における役割を明らかにし、さらに結合タンパクを介した機能調節について解析することを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞株を用いた解析

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 における PLEKHG1 のノックダウンは pLKO.1puro レンチウイルスベクターを用いて行った。EMT の誘導は、無血清培地に EGF/bFGF を添加した培地で 1 週間以上培養して行った。マトリゲル浸潤能は、Biocoat Fluoro Blok Invasion Assay (BD 社) を用いて定量化した。

(2) Plekhg1 変異マウスを用いた解析

Plekhg1^{-/-}マウスを、家族性大腸腺腫症のモデルである Apc^{+/-Δ716} マウスと交配し、Plekhg1 の欠失および減少が大腸、小腸のポリープの数、大きさ、組織像(浸潤、血管内侵入の有無)へ与える影響を調べた。Plekhg1 mRNA の *in situ* hybridization 法による解析は、RNAscope RNA *in situ* ハイブリダイゼーション (Advanced Cell Diagnostics 社) を用いて行った。

(3) PLEKHG1 の Ser611 リン酸化に関する解析

PLEKHG1 の Ser611 を認識するリン酸化抗体は、MBL 社にて作製された抗血清からアフィニティーカラムを用いて精製した。

4. 研究成果

(1) PLEKHG1 の腸管腫瘍形成における役割

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 にレンチウイルスベクターを用いて、PLEKHG1 に対する 2 種類の異なる shRNA を導入した (図 1)。

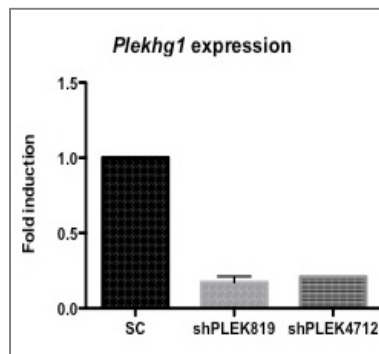


図 1. qRT-PCR による HCT116 細胞における PLEKHG1 ノックダウン効率の確認。

PLEKHG1 ノックダウン細胞とコントロール shRNA (SC) を発現させた細胞の増殖を比較したところ、ノックダウン細胞では増殖能が顕著に亢進していた (図 2)。

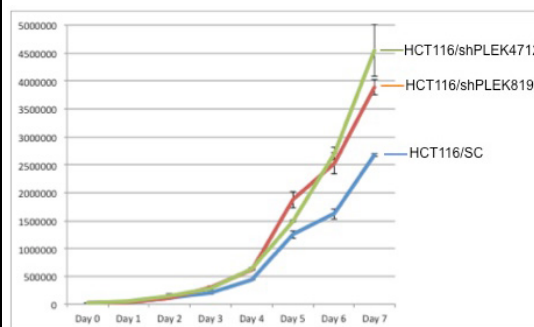


図 2. 細胞増殖曲線。

Plekhg1 変異マウスと家族性大腸腺腫症のマウスモデルである Apc^{+/-Δ716} マウスとの交配により Apc^{+/-Δ716};Plekhg1^{-/-} 複合変異マウスを作成し、腸管腫瘍形成を調べたところ、小腸での腫瘍形成には両者で差が認められな

ったが、*Apc*^{+/-Δ716};*Plekhg1*^{-/-}複合変異マウスでは、大腸に発症する直径 3 mm 以上の大きなポリープの数が有意に多かった (図 3)。

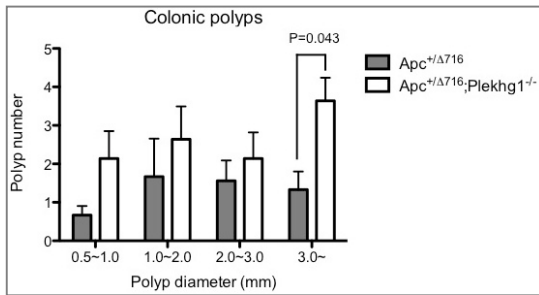


図 3. *Apc*^{+/-Δ716}マウスと *Apc*^{+/-Δ716};*Plekhg1*^{-/-}マウスの大腸に発症したポリープ数の大きさ (直径) による分布。

腸管において *Plekhg1* を発現する細胞を特定するため、*in situ* hybridization 解析を行ったところ、主に腸上皮細胞が発現していることが分かった (図 4)。

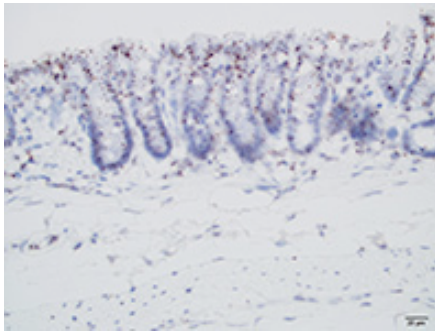


図 4. *In situ* hybridization 法による、野生型マウス大腸での *Plekhg1* mRNA の発現解析。

以上の結果から、PLEKHG1 は大腸の腫瘍形成初期過程において抑制的に作用することが示唆された。

(2) PLEKHG1 と上皮間葉転換 (EMT)

我々は、ヒト大腸がん細胞株 HT29 と DLD-1 に EGF/basic EGF を用いて上皮間葉転換 (EMT) を誘導できること (図 5)、EMT 誘導に伴って CDX2 の発現が顕著に低下することを発見した (図 6)。大腸がん細胞における CDX2 と PLEKHG1 の発現の相関について検討するため、EMT 誘導前後の PLEKH1 の発現を定量的 RT-PCR によって調べたところ、予想に反してその発現は EMT に伴って顕著に増加した (図 7)。そこで、ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 に PLEKHG1 を誘導的に発現させるとマトリックスへの浸潤能が顕著に亢進した (図 8)。

これらの結果から、PLEKHG1 は、大腸がんの発生初期過程では抑制的に働くが、浸潤・転移は促進する可能性が示唆された。

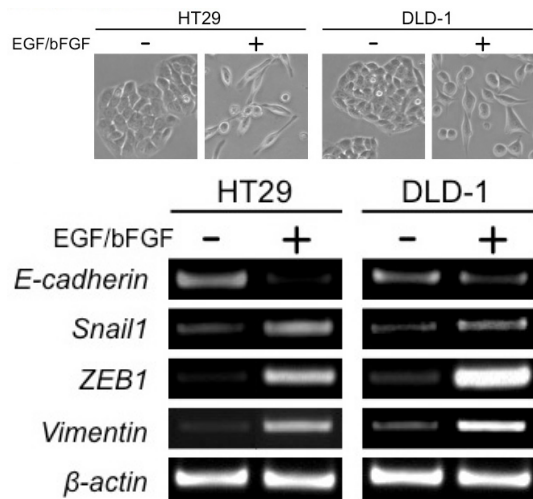


図 5. EGF/bFGF による EMT の誘導。(上) 形態変化 (下) EMT に特徴的な遺伝子発現の変化 (RT-PCR)。

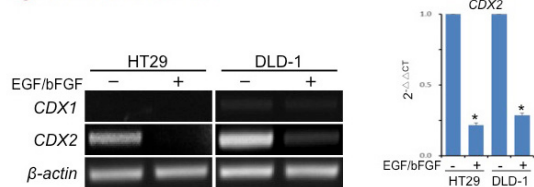


図 6. EMT に伴う CDX2 の発現変化。(左) RT-PCR (右) real-time RT-PCR。

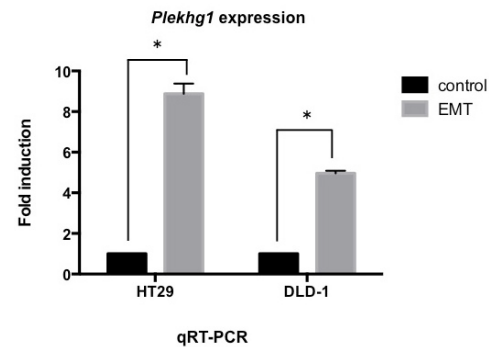


図 7. EMT に伴う PLEKHG1 の発現変化 (real-time RT-PCR 解析)。

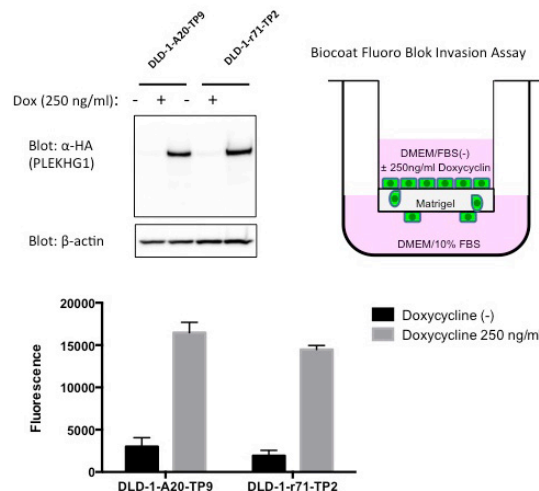


図 8. PLEKHG1 によるマトリックス浸潤能の変化。Doxycycline で PLEKHG1 の発現が誘導されると (上左のウェスタンブロット)、マトリックス浸潤能が亢進する (下)。

(3) PLEKHG1 の Ser611 リン酸化

PLEKHG1 と 14-3-3 との結合に関与する Ser611 のリン酸化状態を調べるため、リン酸化抗体を作製した。HEK293 細胞に野生型と、Ser611 あるいは対照として Ser469 を alanine に置換した変異株を発現させたところ、血清刺激によって Ser611 のリン酸化が亢進することが分かった (図 9)。また、Akt の基質を認識する抗体 (phospho-S/T Akt substrate antibody) を用いた解析から、Ser611 が Akt によってリン酸化される可能性が示唆された (図 10)。Akt による Ser611 のリン酸化が PLEKHG1 に与える影響についてさらに解析を進めている。

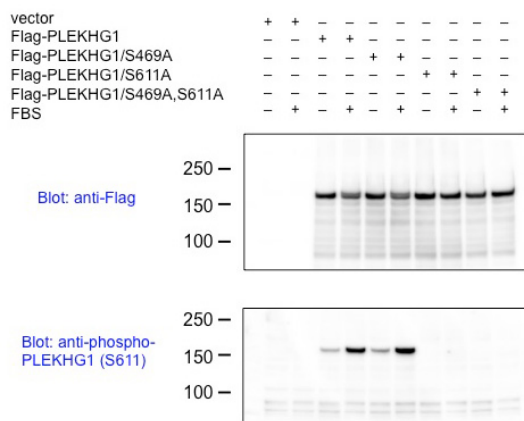


図 9. Phospho-PLEKHG1(Ser611) antibody を用いたウェスタンブロット解析. HEK293 細胞を使用.

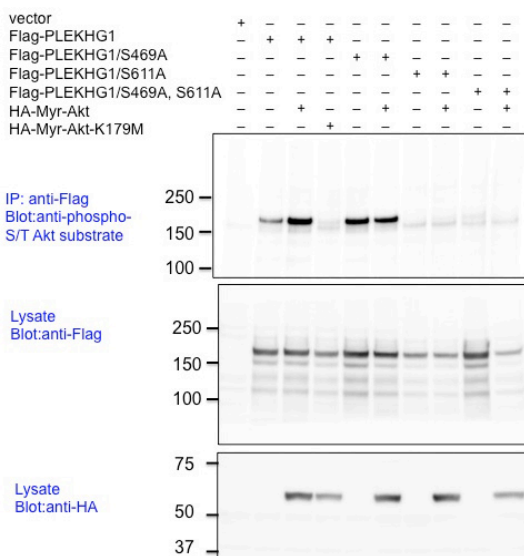


図 10. Phospho-S/T Akt substrate antibody を用いたウェスタンブロット解析. HEK293 細胞を使用.

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 4 件)

① Sakuma K, Chen GY, Aoki M, Kannagi

R: Induction of 6-sulfated glycans with cell adhesion activity via T-bet and GATA-3 in human helper T cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1820:841-848, 2012. (査読有)

② Sakuma K, Aoki M, Kannagi R: Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:7776-7781, 2012. (査読有)

③ Sakuma K, Aoki M, Kannagi R: Sialic acid cyclization of human Th homing receptor glycan associated with recurrent exacerbations of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 68:187-93, 2012. (査読有)

④ Fujishita T, Aoki M, Taketo MM: JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through activation of mTOR complex 1 in Apc Δ 716 mice. *Gastroenterology*, 140:1556-1563, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

① 藤下晃章、武藤誠、青木正博、mTOR キナーゼ阻害薬は大腸がんモデルマウスの腺がん形成を強力に抑制する、第 36 回日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 5 日 (神戸)

② 青木正博、藤下晃章、武藤誠、CDX 転写因子の標的分子 PLEKHG1 の発現低下は大腸腫瘍形成を促進する、第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日 (横浜)

③ 藤下晃章、武藤誠、青木正博、mTOR キナーゼ阻害薬は大腸がんマウスモデルの大腸腺がん形成を抑制する、第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 4 日 (横浜)

④ 小島康、松尾恵太郎、伊藤秀美、細野覚代、田中英夫、青木正博、日本人胃がん患者の体組成変化、第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 5 日 (横浜)

⑤ 佐久間圭一郎、神奈木玲児、青木正博、大腸がん細胞においてシアリルルイス糖鎖の発現と EMT は関連する、第 65 回日本細胞生物学会大会、平成 25 年 6 月 20 日 (名古屋)

⑥ 青木正博、後藤嘉子、武藤誠、CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of PLEKHG1 in Intestinal Epithelium. 第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 14 日 (博多)

⑦ 青木正博、武藤誠、CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of PLEKHG1 in Intestinal Epithelium. 第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19日(札幌)

⑧ 佐久間圭一郎、神奈木玲児、青木正博、c-MycとCDX2はEMTを起こした大腸がん細胞におけるE-セレクトインリガンド糖鎖の発現を媒介する、第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19日(札幌)

⑨ 青木正博、Roles of the JNK/mTORC1 signaling in intestinal tumorigenesis of Apc mutant mice. The 16th Korea-Japan Cancer Research Workshop、平成23年12月10日(札幌)

⑩ Aoki M, Fujishita T, Taketo M: JNK promotes intestinal tumor formation in Apc mutant mice through activation of mTOR complex 1 and c-Jun. AACR's Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy Special Conference、平成23年11月4日(米国フロリダ州オーランド)

⑪ 園下将大、青木正博、武藤誠、Stimulation of colon cancer metastasis by Notch signaling、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月4日(名古屋)

⑫ 青木正博、藤下晃章、武藤誠、JNK promotes intestinal tumor formation in Apc mutant mice through activation of mTOR complex 1 and c-Jun、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月4日(名古屋)

⑬ 藤下晃章、青木正博、武藤誠、The roles of mTORC1 in the intestinal adenocarcinoma、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月3日(名古屋)

⑭ 佐久間圭一郎、青木正博、神奈木玲児、EGF and bFGF induce EMT and E-selectin ligand glycan expression on colorectal cancer cells、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月3日(名古屋)

⑮ 青木正博、藤下晃章、武藤誠、JNKシグナル伝達経路はmTORC1の活性化を介してApc変異マウスの腸管腫瘍形成を促進する、第15回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成23年6月24日(東京)

[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

青木 正博 (AOKI MASAHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態

学部・部長

研究者番号：60362464

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：