

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成23年5月5日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650594

研究課題名（和文）Wnt シグナルネットワークによる炎症応答制御と癌

研究課題名（英文）Inflammatory responses and cancer initiated by Wnt signal network

研究代表者

菊池 章 (Kikuchi Akira)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10204827

研究成果の概要（和文）：

癌の病態に炎症の慢性化等の微小環境が関与することを示す知見が蓄積している。本研究では、癌の発症に重要な役割を果たす Wnt シグナルと炎症との関連について解析を行った。Wnt5a をマウス腹腔マクロファージ(Mφ)に作用させると、LPS による IL-6 等の発現が促進された。一方、Wnt5a をノックアウト(KO)したマウスから調整された Mφ の LPS による免疫応答は抑制された。デキストラン硫酸ナトリウムを投与することにより、マウスの腸管炎症が誘導できるが、Wnt5a KO マウスでは腸管炎症の病態が抑制された。Wnt5a の過剰発現が癌の悪性化に関わることと併せて、Wnt5a シグナルが炎症と癌の増悪を仲介することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Chronic inflammation in microenvironment has been shown to be involved in cancer. This study examined regulation of inflammatory responses by Wnt signaling, which play important roles in cancer pathogenesis. Wnt5 enhanced LPS-dependent IL-6 expression in mouse peritoneal macrophages and the inflammatory responses were reduced in macrophages prepared from Wnt5a knockout mice. The addition of dextran sodium sulfate (DSS) generated a mouse model for bowel inflammatory diseases. Wnt5a knockout mice were resistant to DSS-induced inflammation. Taken together with the observations that expression of Wnt5a is involved in aggressiveness of cancer, these results suggest that Wnt5a signaling links between inflammation and cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：Wnt、炎症、がん、転移、抗体療法

## 1. 研究開始当初の背景

癌の病態に炎症の慢性化等の微小環境が関与することを示す知見が蓄積している。慢性炎症の背景には免疫担当細胞の活性制御の異常が存在し、自然免疫や獲得免疫が脱制御されていると考えられる。しかし、それらの制御に関与する Toll 様受容体シグナル経

路やサイトカインシグナル経路の異常だけでは、慢性炎症の全貌の理解は困難であり、免疫系のシステムと相互作用することにより、炎症を引き起こし遷延化させる他の因子の存在が想定されている。これらの因子を同定することは、癌の病態の理解とともに新たな治療法の開発に貢献すると期待されている。

器官形成など動物の発生に必須である Wnt シグナル経路の異常が種々の癌で見出されている。私共は Wnt シグナルに関する研究を 14 年間行なってきたが、この間に、Wnt シグナルにおいて中心的役割を果たす  $\beta$ -カテニンの分解と安定化の制御機構を解明した。また、Wnt シグナル経路における新規の細胞接着や運動の分子機構を明らかにし、本経路の異常が浸潤、転移等の癌の悪性を促進することを明らかにした。一方、Wnt シグナル経路と炎症反応に関連があり、その異常が発癌や癌の悪性化に関与することが報告されている。例えば、Wnt シグナル経路の異常により発症する家族性大腸腺腫症 (FAP) では、非アスピリン系消炎剤 NSAID (COX 阻害剤; sulindac sulphide) により、FAP 患者のポリープでの Wnt シグナルの活性化が減弱する。また、種々の固形腫瘍には、血管新生や転移を促進すると考えられている Tumor associated マクロファージ (TAM) が浸潤するが、TAM において Wnt5a (19 種類存在する Wnt ファミリーの一つ) が高発現することから、Wnt シグナル経路と炎症反応が関連する可能性が示唆されている。しかし、Wnt シグナルによる炎症応答の分子機構やそれらの相互作用異常と癌との関係は十分に理解されていない。したがって、これらの未解決の問題を総合的に解析する必要がある。

癌以外の疾患でも Wnt と炎症反応の関連を示唆する事例がある。肥満マウスの脂肪細胞では炎症反応が亢進しているが、肥満脂肪細胞では Wnt シグナル抑制分子の発現が減弱し、耐糖能の低下につながる。このように、炎症反応と Wnt シグナルの関連に関心が高まってきており、免疫担当細胞におけるこれまでの詳細な解析の上に、Wnt による新たな制御機構の知見が加われば、炎症の慢性化機構に関する新規の概念が構築されることが期待される。しかし、現状では、Wnt 研究者が本領域に参入している段階ではなく、炎症領域に関わる個別の研究者が Wnt に絡めて研究を進めている段階であり、その解析はまだ始まったばかりである。

## 2. 研究の目的

Wnt は細胞外分泌タンパク質で、ヒトには

19 種類のファミリーが存在する。分泌された Wnt が細胞膜上の受容体に結合した後に活性化される細胞内のシグナル伝達機構には、 $\beta$ -カテニン経路と  $\beta$ -カテニン非依存性経路が存在する。 $\beta$ -カテニン経路では、Wnt が受容体に作用すると細胞質の  $\beta$ -カテニンが安定化し、核内に移行した  $\beta$ -カテニンは転写因子 Tcf を活性化する。Wnt1 と Wnt3a は  $\beta$ -カテニン経路を活性化する代表的 Wnt リガンドである。一方、Wnt は  $\beta$ -カテニンに依存しない経路も活性化するが、このシグナル経路は多岐にわたり、低分子量 G 蛋白質 (Rho, Rac) や蛋白質リン酸化酵素 (RhoK, JNK, PKC, CamK) を活性化する。 $\beta$ -カテニン非依存性経路は主として、細胞の運動や極性を制御すると考えられていて、Wnt5a と Wnt11 は、 $\beta$ -カテニン非依存性経路を活性化する代表的 Wnt リガンドである。しかし、Wnt シグナルがどのように炎症反応を制御するか、逆に炎症反応が Wnt シグナルの活性化にどのように関わっているかについて明らかでない。

一方、私共はこれまでに、悪性度の高い胃癌細胞や前立腺癌細胞では Wnt5a が高発現していることを見出している。さらに、Wnt5a を高発現する胃癌細胞 (KKLS, MKN-1, TMK-1) を用いた *in vitro* の実験系において、Wnt5a 抗体が運動・浸潤能を抑制することを見出した。また、Wnt5a 抗体は Wnt5a の発現が低い胃癌細胞 (MKN-45) の運動・浸潤能を抑制しなかった。したがって、Wnt5a が炎症と癌との病態に関与することが明らかになると共に、Wnt5a 抗体は新規抗がん剤開発のシーズとなる可能性があることが示唆された。

そこで、本研究では、炎症と癌の制御に関わる新たな視点として、Wnt シグナルネットワークの中でも特に、Wnt5a シグナルに焦点を絞り、その炎症応答制御の分子機構と異状による病態について明らかにしたい。本研究の最大の特徴は、これまでの私共の Wnt に関する研究の実績を基盤にして、癌と炎症との関連を Wnt シグナルを基軸として、総合的に解析できるところにある。

## 3. 研究の方法

① Wnt5a シグナルによる免疫細胞の活性化機構

Wnt5a がヒト末梢血単球の活性を増強することが報告されている。そこで、Wnt5a による免疫応答活性化機構を明らかにするために、LPS や CpGDNA によるマクロファージの NF- $\kappa$ B の活性化や遺伝子発現に対する Wnt5a の作用を解析した。この実験では、精製 Wnt5a タンパク質を腹腔マクロファージに作用させると共に、マウスマクロファージ株 Raw264.1 細胞に Wnt5a を発現させた細胞株を作製した。また、Wnt5a ノックアウト (KO) マウスからマクロファージを調製して、LPS や サイトカインによるマクロファージの活性化に Wnt5a が必要か否かを解析した。

#### ②Wnt5a シグナルと腸管炎症

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) をマウスに投与することにより、腸管炎症モデルを誘発することができる。そこで、Wnt5a ノックアウトマウスに DSS を投与して、野生型 (WT) マウスにおける炎症病態と比較検討した。また、DSS 依存性に腸管炎症が発症した組織において、Wnt5a が発現するか否かを免疫組織学的に解析した。

### 4. 研究成果

#### ①Wnt5a シグナルによる免疫細胞の活性化機構

LPS と CpGDNA はマウス腹腔から調整したマクロファージの IL-6 と IL-12(p40) の mRNA の発現を増加させた。Wnt5a を同時に作用させると、LPS と CpGDNA による IL-6 と IL-12(p40) の mRNA の増加を増強した。Wnt5a ホモ KO マウスは胎生致死であるため、Wnt5a ヘテロ KO (Wnt5a<sup>+/-</sup>) マウスから調整した腹腔マクロファージでは、LPS と CpGDNA による IL-6 と IL-12(p40) の mRNA の増加を減少した。したがって、Wnt5a が炎症応答に関与することが確認された。

Wnt5a による炎症応答増強の分子機構を明らかにするために、Raw264.1 細胞にレンチウイルスを用いて恒常的に Wnt5a を発現させた。Wnt5a 発現 Raw264.1 細胞は野生型 (WT) Raw264.1 細胞に比して、LPS による IL-6 の発現が増強した。LPS は I $\kappa$ B の分解を誘導するが、Wnt5a の発現は LPS 依存性の I $\kappa$ B の分解に影響しなかった。したがって、Wnt5a は

NF- $\kappa$ B の下流で作用するか、または、NF- $\kappa$ B とは別の経路に作用することにより、IL-6 の発現を誘導すると考えられた。

#### ②Wnt5a シグナルと腸管炎症

DSS を野生型マウスに投与すると、7 日目前後から便出血、下痢、体重減少が認められ、10 日目になると体重は 15~20% 減少した。一方、Wnt5a ヘテロ KO (Wnt5a<sup>+/-</sup>) マウスに DSS を投与すると、便出血、下痢、体重減少は認められるものの、その発症時期は遅れ、下痢や消化管出血等の病態活性指標 (DAI) が軽度であることが判明した。このことは、Wnt5a シグナルが DSS 依存性の腸管炎症に関与することを示唆した。

また、DSS により誘導した腸管炎症部位において、潰瘍部直下の間質細胞で Wnt5a が高発現していた。さらに、関節リウマチ (RA) 患者の滑膜細胞では、変形性関節症 (OA) の患者に比して、Wnt5a が高発現していた。したがって、Wnt5a は炎症病態において、間質細胞で誘導されることがヒトの検体とマウスモデルで明らかになった。今後の課題は、この Wnt5a の上昇が炎症病態の増悪に関与するか否かを明らかにすることである。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (8 件)

原著論文

1. Hanaki, H., Yamamoto, H., Sakane, H., Matsumoto, S., Ohdan, H., Sato, A., and Kikuchi, A. An Wnt5a-antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cancer Ther.*, 査読有, 11, (2012), 298-307
2. Sakane, H., Yamamoto, H., Matsumoto, S., Sato, A., and Kikuchi, A. Localization of glypican-4 in different membrane microdomains is involved in the regulation of Wnt signaling. *J. Cell Sci.*, 査読有, 125, (2012), 449-460
3. Miyamoto, T., Porazinski, S., Wang, H., Borovina, A., Ciruna, B., Shimizu, A., Kajii, T., Kikuchi, A., Furutani-Seiki, M., and Matsuura, S. Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes impaired ciliogenesis in vertebrates. *Hum. Mol. Genet.*, 査読有, 20, (2011), 2058-2070
4. Kagermeier-Schenk, B., Wehner, D.,

- Özhan-Kizil, G., Yamamoto, H., Jian Li, Kirchner, K., Hoffmann, C., Stern, P., Kikuchi, A., Schambony, A., and Weidinger, G. The transmembrane protein Waif1/5T4 inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization. *Dev. Cell*, 査読有, 21, (2011), 1129-1143
5. Deraz, E.M., Kudo, Y., Yoshida, M., Obayashi, M., Tsunematsu, T., Tani, H., Siriwardena, S., Keikhaee, M.R., Qi, G., Iizuka, S., Ogawa, I., Campisi, G., Lo Muzio, L., Abiko, Y., Kikuchi, A., Takata, T. MMP-10/Stromelysin-2 Promotes Invasion of Head and Neck Cancer. *PLoS ONE*, 査読有, 6, (2011), e25438, 2011

#### 英文総説

1. Matsumoto, S., and Kikuchi, A. Regulation of focal adhesion dynamics by Wnt5a signaling. *Methods in Mol. Biol.*, 査読有, 839, (2012), 215-227
2. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Maysimoto, S. Wnt5a: its signaling, functions, and implication in diseases. *Acta physiol.*, 査読有, 204, (2012), 17-33
3. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., Mastumoto, S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 査読有, 291, (2011), 21-71

#### 〔学会発表〕 (計 15 件)

1. Kikuchi, A., Growth factor-dependent regulation of cell polarity during tubulogenesis, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 15 日、横浜
2. Miyamoto, T., Porazinski, S., Huijia, W., Shimizu, A., Kajii, T. Kikuchi, A., Furutani-Seiki, M., Shinya Matsuura, S., BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, plays a role of ciliogenesis in G0 phrase, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 15 日、横浜
3. Fumoto, k., Kikuchi, K., Kikuchi, A., Novel fuction of Dvl, a Wnt signaling molecule, in cytokinesis, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 15 日、横浜
4. Lim, Boon Cheng., Matsumoto, S., Kikuchi, A., Dissecting the novel functions of Axin and Prickle in cell polarization and directional migration, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 15 日、横浜
5. Matsumoto, S., Kikuchi, A., Wnt3a and Wnt5a regulate epithelial polarity and tubulogenesis cooperatively, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 15 日、横浜
6. Sato, A., Shojima, K., Koyama, H., Kikuchi, A., Wnt5a deficiency ameliorates the dextran sulfate sodium

- (DSS)-induced acute colitis, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 14 日、横浜
7. Hida, T., Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Kikuchi, A., Goshima, Y., GSK3 $\beta$ /Axin-1/ $\beta$ -catenin Complex is involved In Semaphorin3A Signaling, 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 13 日、横浜
8. Kikuchi, A., Wnt5a; its signaling and implication in tumorigenesis, 13th Japanese-German Cancer Workshop, November 17-20, 2011, Hiroshima
9. Hanaki, H., Yamamoto, H., Kikuchi, A., Development of new therapeutic methods for cancer expressing Wnt5a by the use of anti-Wnt5a antibody, 第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 4 日、名古屋
10. Nambu, J., Kobayashi, T., Tashiro, H., Sugino, K., Shimamoto, F., Kikuchi, A., Ohdan, H., The role of h-prune in anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion, 第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 3 日、名古屋
11. Miyamoto, T., Kikuchi, A., Furutani-Seiki, M., Matsuura, S., BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, regulates ciliogenesis in G0 phase, 第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 3 日、名古屋
12. Ishida, M., Enomoto, A., Kikuchi, A., Takahashi, M., The Dvl-associating protein Daple controls Rac activation and cell migration, 第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 3 日、名古屋
13. 坂根洋、山本英樹、松本真司、佐藤朗、菊池章、Glypican-4 の脂質ラフトへの局在に依存した Wnt シグナル伝達の制御機構、第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 23 日、京都
14. 山本英樹、栗田ちひろ、高尾敏文、岸田昭世、岸田想子、菊池章、翻訳後修飾による Wnt 蛋白質の機能発現の制御、第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 22 日、京都
15. 菊池章、Wnt シグナルによる上皮形態形成制御とその異常による病態、第 84 回内分泌学会学術総会、平成 23 年 4 月 22 日、神戸

#### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbio/bc/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菊池 章 (KIKUCHI AKIRA)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10204827