

## 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24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2011～2012

課題番号：23680088

研究課題名（和文）大腸癌転移における Notch シグナル伝達経路の役割の解明

研究課題名（英文）Roles of Notch signaling pathway in colon cancer metastasis

研究代表者

園下 将大（SONOSHITA MASAHIRO）

京都大学大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80511857

研究成果の概要（和文）：

癌患者のほとんどが転移によって死亡するため、転移メカニズムの解明が喫緊の課題となっている。今回我々は、Notch シグナル伝達によって Rho family small GTPase が制御されることを見出した。また、ヒト大腸癌において突然変異が多数報告されている *PIK3CA* を *Apc* 変異マウスにおいて活性化したところ、腸腫瘍細胞の著しい局所浸潤が観察された。これらの結果は大腸癌悪性化阻止の新たな標的を提示するものである。

研究成果の概要（英文）：

Cancer is the leading cause of death in most industrialized nations, and the direct cause of cancer death is often its metastasis to the vital organs. In this study, we demonstrate that Notch signaling regulates activities of Rho family small GTPases to stimulate invasion and metastasis of colon cancer. On the other hand, activation of *PIK3CA* in *Apc* mutant mice caused massive local invasion of intestinal tumors. These results raise novel therapeutic targets in invasion and metastasis of colon cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2012年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
総計	18,500,000	5,550,000	24,050,000

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：転移・遺伝子改変動物

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室にて作出されたヒト家族性大腸腺腫症のモデル動物である *Adenomatous polyposis coli* ノックアウト (*Apc*<sup>Δ716</sup>) マウスには、大腸癌の初期病変である良性腫瘍が発生する (Oshima et al. *PNAS* 1995)。申請者はこれまでに、この *Apc*<sup>Δ716</sup> マウスあるいは *Apc* と他遺伝子の複合変異マウスを解析することで大腸癌発生メカニズムの解明を目指してきた。中でも、腫瘍発生・成長にはプロスタグランジン E2 (PGE2) が必須であることを明らかにした一連の業績は、国内外から

高い評価を得ている (Sonoshita et al. *Nature Med* 2001; Sonoshita et al. *Cancer Res* 2002)。

また、癌患者の多くが死亡するのは遠隔転移が主因であるため、申請者は大腸癌の悪性化進展メカニズムの解明にも意欲的に取り組み、ケモカイン受容体 CXCR3 が大腸癌細胞のリンパ節転移に重要な役割を果たすことを明らかにした (Kawada et al. *Cancer Res* 2004; Kawada et al. *Oncogene* 2007)。

さらに、大腸癌悪性化を抑制する遺伝子の探索を行ない、*Aes* (*Amino-terminal*

*enhancer of split*) 遺伝子による大腸癌転移の抑制機能を発見した (Sonoshita et al. *Cancer Cell* 2011)。この研究の中で、ヒト大腸癌の肝転移巣においては原発巣と比較して Aes の発現が有意に低下していること、Aes は Notch シグナルを阻害する結果、マウスに移植された大腸癌細胞の遠隔転移を抑制することを見出した。組織学的検討の結果、大腸癌細胞の Notch シグナルは、隣接するマクロファージや血管内皮細胞などの、リガンドを発現する間質細胞によって活性化されることも明らかとなった。これは、大腸癌の悪性化における上皮-間質相互作用によるシグナル伝達経路の新しい様式として注目される。さらに、腸上皮細胞に特異的な Aes ノックアウトマウスを作出し、*Apc*<sup>Δ716</sup> マウスと交配して *Apc/Aes* 複合変異マウスを作出し解析したところ、腸腫瘍細胞の著しい局所浸潤と血管内侵入が観察された。重要なことに、これら悪性の表現形は、Notch シグナル阻害薬の投与により抑制された。血管内侵入は転移の過程で必須の段階であるが、これを模倣した自然発症の大腸癌モデルはこれまで存在していなかった。このため、この *Apc/Aes* 複合変異マウスは、転移の治療や予防法を評価できる初めてのモデルとしてその有用性が期待される。以上の結果は、他の疾患のために開発されている Notch シグナル阻害薬を用いて大腸癌の悪性化進展を予防・治療できる可能性を示しており、新しい戦略として意義深い。

## 2. 研究の目的

消化器癌は癌の中でも最も死亡率が高い。特に遠隔転移が死因となっているため、そのメカニズムの解明及び予防・治療法の確立が急務となっている。

我々は Notch シグナルを阻害することによって大腸癌転移が抑制できることを示したが、現在までに開発されているガンマセクレターゼ阻害薬をはじめとする Notch シグナル阻害薬の投与により、消化管や免疫系に副作用が発生することが近年明らかとなってきた。この副作用により継続投与ができなくなるため、より副作用の少ない標的分子を見出すことの意義が極めて大きい。

本研究では、最近我々が大腸癌の転移促進機能を発見した Notch シグナル及びそれを阻害する Aes の更なる機能解析を行なうことで新たな治療標的を同定することを目標とし、①Aes による古典的 Notch シグナル抑制メカニズム (転写抑制による浸潤・転移抑制効果の検討)、②大腸癌の自然発症性悪性化モデルの作出、の 2 項目を研究する。

## 3. 研究の方法

### ① Aes による古典的 Notch シグナル抑制メカニズム (転写抑制による浸潤・転移抑制効果の検討)

培養ヒト大腸癌細胞及び *Apc*<sup>Δ716</sup> マウスにおける核マトリクス複合体の構成タンパク質を、免疫沈降法、質量分析法により同定する。さらに、Notch シグナルがどのように大腸癌細胞の運動を制御しているかを検討する。

### ②大腸癌の自然発症性悪性化モデルの作出

#### A) *Apc/Aes* と *Kras*、*p53* の複合変異マウスをそれぞれ作出する

アメリカ NCI Frederick より、*Kras* の条件的活性化マウス、*p53* の条件的欠損、および優性不活性 (dominant-negative) 体の条件的発現マウスを導入し、*Apc/Aes* 複合変異マウスと交配することで、腸上皮特異的に *Kras* が活性化される複合変異マウス

(*Apc/Aes/Kras* マウス) や *p53* を欠く複合変異マウス (*Apc/Aes/p53*<sup>Nu11</sup> マウス)、*p53* の優性不活性体を発現する複合変異マウス

(*Apc/Aes/p53*<sup>R172H</sup> マウス) を作出する。

#### B) *Pik3ca* の条件的活性化マウスを作出し、*Apc* との複合変異マウスを作出する。

ヒト癌においては、*PIK3CA*

(*Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*) の一アミノ酸置換 (H1047R) を引き起こす点突然変異が、*KRAS*、*P53* と並んで高頻度に見つかる。この変異により、*PIK3CA* が恒常的に活性化することが知られている。近年、大腸癌患者における転移巣の形成とこの変異が有意に相関することが分かり、転移における *PIK3CA* の役割に注目が集まっている。そこで *Apc/Aes* 複合変異マウスに *Pik3ca* の H1047R 変異を導入すれば、癌細胞の転移が観察できる可能性がある。これまでに活性化型 *Pik3ca* を発現するトランスジェニックマウスの報告は無く、胎生致死の可能性があることから、*Pik3ca* の条件的活性化マウスを用いることが望ましい。しかしながら、現在までにこのマウス作出の報告もないため、本研究ではまずこのマウスの作出を行う。ターゲティングベクターのデザインとしては、H1047 を含む最終エクソンを 2 つの loxP で挟み、その 3' 側に H1047R 変異を導入したエクソンを接続する。これを ES 細胞の *Pik3ca* の最終エクソン付近にノックインすることで、Cre リコンビナーゼ非存在化では野生型の *Pik3ca* が、一方 Cre 存在化では活性化型 *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> が内因性プロモーターから発現するアレルが得られる。

マウス作出に成功した後、このマウスを腸上皮特異的に Cre<sup>ERT2</sup> (タモキシフェン依存的に活性化する Cre) を発現する動物と交配し、タモキシフェン投与時期および腸上皮特異

的に *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> が発現することを確認する。続いて *Apc* 変異マウスとの交配を行ない、条件的に *Pik3ca* の活性化体を発現する複合変異マウス (*Apc/Pik3ca*<sup>H1047R</sup> マウス) を作出する。

これらの各複合変異マウスが3週齢に達した時点で、タモキシフェンの腹腔内投与を行い、条件的遺伝子改変を行なう。投与後15週間待ち、18週齢に達した時点で安楽死させ、大腸・肝臓・肺・リンパ節を採取する。これらの病理標本をHE染色によって作製・観察することにより、転移の有無を解析する。

#### 4. 研究成果

##### ① *Aes* による古典的 Notch シグナル抑制メカニズム (転写抑制による浸潤・転移抑制効果の検討)

大腸癌細胞に *Aes* タンパクを過剰発現させて免疫沈降し、結合しているタンパク質を質量分析法で解析した。その結果、PABP1 が *Aes* とともに核マトリクスに結合していることが分かり、これまで核酸の代謝や輸送に重要と考えられてきたタンパクが *Aes* による転写抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、Notch シグナルによる大腸癌細胞の運動の制御メカニズムの解析を行った。浸潤性大腸癌のモデルマウスである *Apc/Aes* 複合変異マウスにおいては、癌細胞は Notch シグナル伝達依存的に浸潤する。細胞の運動には Rho family small GTPases が重要な役割を果たすことが示唆されていることから、*Apc/Aes* 複合変異マウスと対象の *Apc* 単独変異マウスにおいて、Rho family small GTPases の活性化状態を調べた。その結果、*Apc* マウスと比較して *Apc/Aes* マウスの癌細胞において、Rho の活性化が著しく亢進していることが分かった。一方、Rac や Cdc42 に関しては、活性化が見られないか活性化状態が検出限界以下であった。続いて、大腸癌細胞の浸潤に Rho がどのような役割を果たすか調べるため、Rho 活性化の阻害薬である C3T や Rho の下流因子として働く Rock の阻害薬である Y-27632 を大腸がん細胞に処理し、マトリゲル浸潤アッセイを行った。その結果、これらの阻害薬により、大腸癌細胞の浸潤能が著しく抑制されることが分かった。さらに、これらの阻害薬により、Transendothelial migration (経血管内皮遊走) も抑制された。これらのことから、大腸癌細胞が浸潤する際の運動に Rho が重要な役割を果たすことが分かった。

##### ② 大腸癌の自然発症性悪性化モデルの作出

A) *Apc/Aes* と *Kras*、*p53* の複合変異マウスをそれぞれ作出する。

*Kras* の条件的活性化マウス、*p53* の条件的

欠損、および優性不活性

(dominant-negative) 体の条件的発現マウスを *Apc/Aes* 複合変異マウスと交配することで、腸上皮特異的に上記遺伝子を改変できる複合変異マウスを作出した。これらのマウスの腸腫瘍の組織型を対照である *Apc/Aes* 変異マウスと比較したが、明らかな差は認められなかった。

B) *Pik3ca* の条件的活性化マウスを作出し、*Apc* との複合変異マウスを作出する。

*PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 変異アレルを持つES細胞を作成したのち、ジャームライン伝達マウスを得た。このアレルを *Apc* 変異マウスに導入し、条件的に *Pik3ca* の活性化体を発現する複合変異マウス (*Apc/Pik3ca*<sup>H1047R</sup> マウス) を作出したところ、腸腫瘍の著しい局所浸潤が観察された。

#### 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1件)

Kawada K, Hasegawa S, Murakami T, Itatani Y, Hosogi H, Sonoshita M, Kitamura T, Fujishita T, Iwamoto M, Matsumoto T, Matsusue R, Hida K, Akiyama G, Okoshi K, Yamada M, Kawamura J, Taketo MM, Sakai Y. Molecular mechanisms of liver metastasis. (2011). Int. J. Clin. Oncol. 16, 464-472. doi: 10.1007/s10147-011-0307-2.

[学会発表] (計3件)

M. Sonoshita. Stimulation of colon cancer metastasis by Notch signaling. 第70回日本癌学会学術総会シンポジウム Use of animal models for advances in cancer prevention and treatment (英語). 2011/10/5, 名古屋コンgresセンター

M. Sonoshita. Critical roles of Notch signaling pathway in colon cancer metastasis. 国際がん転移学会 2012年09月01日~2012年09月03日、オーストラリア、ブリスベン

M. Sonoshita. Suppression of Colon Cancer Metastasis by *Aes* through Inhibition of Notch Signaling. 日本癌学会(招待講演) 2012年09月19日~2012年09月21日、札幌市

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院医学研究科遺伝薬理学教室ホームページ

[http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/frameTOP\(J\).htm](http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/frameTOP(J).htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園下 将大 (SONOSHITA MASAHIRO)

京都大学大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80511857