

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501322

研究課題名(和文)変異KRASを起点とした大腸癌フィールドエフェクトの解明

研究課題名(英文)Elucidation of Field Effect in Colorectal Cancer with Mutant KRAS

研究代表者

角田 俊之(TSUNODA, Toshiyuki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：70444817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにヒト大腸癌HCT116細胞において活性化KRASのみを破壊したHke3細胞を用いて3次元培養を行い、変異KRASは正常形態に関連する遺伝子群を制御していることを明らかにした。本研究では、変異KRASは3次元培養特異的にPDE4, ALPK2, miR-181, miR-210そして間質成分に関与する遺伝子等の発現異常を誘導すること、PDE4阻害剤は大腸癌スフェロイドの内腔のアポトーシスを誘導することが明らかになり、これらの結果は3次元環境において変異KRASが制御するシグナルが癌に対する治療標的となりうること、及び、間質との相互作用(フィールドエフェクト)にも関連することを示唆した。

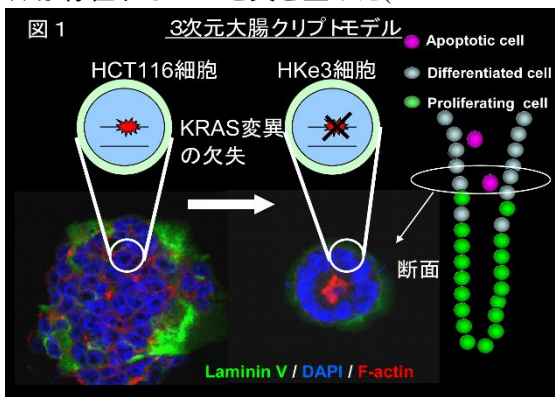
研究成果の概要(英文)：We have previously compared HKe3 cells, derived from colorectal cancer HCT116 cells and disrupted at mutated (mt) KRAS gene, with HCT116 cells in the 3D matrigel culture and found mtKRAS involvement in the inhibition of gene expressions associated with normal morphology. In this study, we found that mtKRAS specifically induced the dysregulated expressions of phosphodiesterase 4B (PDE4B), Alpha Kinase 2, miR-181, miR-210 and genes associated with the stroma ingredient etc. in 3D culture but not in 2D culture. Furthermore, we found that PDE4 inhibitors, including rolipram and resveratrol, induced luminal apoptosis in HCT116 spheroids. These results suggest that mtKRAS-mediated signaling in 3D environment is a target for cancer therapy and is also associated with cancer-stroma interaction (field effect).

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：KRAS 3次元培養 大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでにヒト大腸癌 HCT116 細胞において活性化 KRAS のみを破壊した HKe3 細胞 (Shirasawa et al. *Science*, 1993 ; Tsunoda, Shirasawa et al. *Cancer Research*, 2000)を用いてマトリジェル 3 次元培養を行うと、経時的な解析より in vivo における大腸クリプト様の増殖様式を示し(図 1)、最終的に極性構造が誘導された状況下では、p53, BRCA1 などの DNA 修復関連遺伝子の発現低下、内腔のアポトーシスの阻害などの 3 次元環境特異的な KRAS による造腫瘍シグナルが存在することを突き止めた(Tsunoda et al.



*Neoplasia*, 2010).

3 次元培養した癌細胞は他にも多くの 3 次元特異的膜蛋白を発現しており、間質や他の細胞との相互作用自体が変異 KRAS によって変化し、フィールドエフェクトが起こるのではないかと示唆された。その中には間質細胞との結合に重要で、転移や予後に関連する CXCR4、免疫抑制性リガンド(CD47, CD59) および microRNA の発現上昇や、NK 細胞、単球の標的となるリガンドの発現低下(ICAM3, CCL2)が認められた。この過程を証明するためには、3 次元微小環境を考慮した、In vitro のシステム構築が重要である。本研究は、3 次元大腸クリプトモデルを軸に、変異 KRAS を起点とした 3 次元培養特異的なカスケードを解明し、間質細胞、免疫細胞で見られるフィールドエフェクトを 3 次元共培養系で証明する。さらに臨床検体での発現解析によりの、予後との相関を調べることを目的とする。

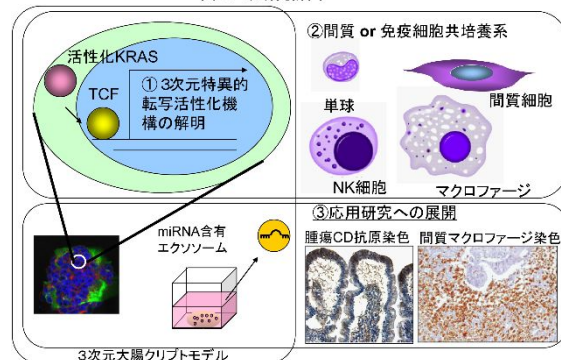
## 2. 研究の目的

癌細胞は周囲の間質や免疫細胞に作用し、

それらの性質を変化させる。このような働きをフィールドエフェクトという。本研究は、申請者らが開発した 3 次元大腸クリプトモデル(図 1)を軸に、この過程を解明する。計画している具体的な研究項目は次のものである(図 2)。

- (1) 3 次元特異的に変異 KRAS が制御する遺伝子群の転写・翻訳メカニズムの解明。
- (2) 間質、免疫細胞と大腸癌 3 次元細胞との共培養系において各細胞が変異 KRAS の有無により受ける遺伝子発現変化、および下流分子に対する機能阻害性小分子を用いた時の発現解析。
- (3) 変異 KRAS を有する症例を用いて、3 次元特異的変異 KRAS 制御分子の腫瘍、間質での発現および免疫担当細胞分布パターンの生体での確認と予後解析。

図 2 本研究計画



## 3. 研究の方法

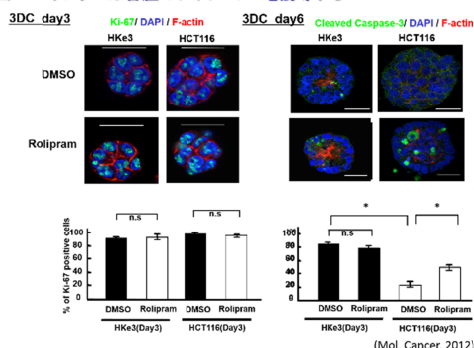
本研究計画では 3 次元特異的な変異 KRAS によるフィールドエフェクトを解明する。計画している具体的な研究項目は、(1) 3 次元特異的に活性化 KRAS が制御する伝子群の発現メカニズムの解明。(2) 間質、免疫担当細胞と大腸癌 3 次元細胞との共培養系において KRAS 変異および下流分子の有無による変化の検討。(3) 変異 KRAS を有する大腸癌症例を用いたフィールドエフェクト関連遺伝子群の発現パターンと免疫担当細胞などの分布パターンおよび予後解析。

## 4. 研究成果

申請者らはこれまでにヒト大腸癌 HCT116 細胞において活性化 KRAS のみを破壊した Hke3 細胞を用いてマトリジェル 3 次元培養を行い、3 次元培養では変異 KRAS は正常形

態に関連する遺伝子群を制御していることを明らかにし、実際に HCT116 細胞塊はいびつな形態を示すのに対しヒト大腸癌細胞株 HCT116 より変異 KRAS のみを相同組み換えにて欠失させた HKe3 細胞は大腸クリプト様の極性を有する形態を示す。この両者を発現アレイにて解析すると 3 次元環境特異的に変異 KRAS により制御されている遺伝子群が存在し、H24 年度は PDE4 や ALPK2 および miR-181 や miR-210 等 (Tsunoda et al. *Mol Cancer*. 2012; Yoshida et al. *Anticancer Res*. 2012; Ota et al. *Anticancer Res*. 2012) が 3 次元特異的に変異 KRAS により発現制御され、HCT116 スフェロイドにおいては、PDE4 阻害剤であるロリプラムで PDE4 を阻害すると、

図3 ロリプラムは管腔のアポトーシスを誘導する



内腔のアポトーシスが誘導され(図3)、ALPK2 の強制発現によっても同様な事象が認められた。このように正常構造に関連する遺伝子群を含めた 3 次元特異的な KRAS 制御分子ネットワークの解明が、間質や他の細胞との相互作用を理解する上で重要であることが明らかになった。H25 年度は、より簡便で再現性の高い 3 次元浮遊細胞の系を確立し、浮遊細胞塊はマトリジェルを使用しなくてもそれ自身が細胞塊周囲に間質成分を産生し、周囲の培地組成を調節することで、間質を介した影響(フィールドエフェクト)等の評価が可能であることが示唆された。H26 年度は 3 次元マトリゲル培養において PDE4 阻害剤であるレスベラトロールが HCT116 スフェロイドの内腔にアポトーシスを誘導することを明らかにした (Tsunoda et al. *Anticancer Res*. 2012)。このように、変異 KRAS は 3 次元微小環境を制御する鍵分子であり、HCT116 細胞においてのみ効果を示すような薬剤を選択することで、より毒性の少ない変

異 KRAS の下流分子を標的とした薬剤の同定が可能になると考えられる。

<引用文献>

- Shirasawa S**, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science*. 1993 Apr 2;260(5104):85-8.
- Baba I, **Shirasawa S**, Iwamoto R, Okumura K, **Tsunoda T**, Nishioka M, Fukuyama K, Yamamoto K, Mekada E, Sasazuki T. Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2000 Dec 15;60(24):6886-9.
- Tsunoda T**, Takashima Y, Fujimoto T, Koyanagi M, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Kuroki M, Sasazuki T, **Shirasawa S**. Three-dimensionally specific inhibition of DNA repair-related genes by activated KRAS in colon crypt model. *Neoplasia*. 2010 May;12(5):397-404.

## 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 10 件)

- Ishikura S, Ogawa M, Doi K, Matsuzaki H, Iwaihara Y, Tanaka Y, **Tsunoda T**, Hideshima H, Okamura T, **Shirasawa S**. Zfat-deficient CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double-positive thymocytes are susceptible to apoptosis with deregulated activation of p38 and JNK. *J Cell Biochem*. 16(1):149-57, 2015. (査読有)
- Kotake Y, Naemura M, Kitagawa K, Niida H, **Tsunoda T**, **Shirasawa S**, Kitagawa M. Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology*. DOI 10.1007/s10616-014-9834-9 (査読有)
- Tsunoda T**, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Iwaihara Y, **Shirasawa S**. Resveratrol induces luminal apoptosis of human colorectal cancer HCT116 cells in

three-dimensional culture. *Anticancer Res.* 34(8):4551-5, 2014. (査読有)

**Tsunoda T**, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Iwaihara Y, **Shirasawa S**. Resveratrol induces luminal apoptosis of human colorectal cancer HCT116 cells in three-dimensional culture. *Anticancer Res.* 34(8):4551-5, 2014. (査読有)

**Tsunoda T**, **Shirasawa S**. : Roles of ZFAT in haematopoiesis, angiogenesis and cancer development. *Anticancer Res.* 33(7):2833-2837, 2013. (査読有)

Ogawa M, Okamura T, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Tanaka Y, Ota T, Hayakawa K, Suzuki H, **Tsunoda T**, Sasazuki T and **Shirasawa S**: Zfat-deficiency results in a loss of CD3zeta phosphorylation with dysregulation of ERK and Egr activities leading to impaired positive selection. *PLoS One* 8: e76254, 2013. (査読有)

**Tsunoda T**, Ota T, Fujimoto T, Doi K, Tanaka Y, Yoshida Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Hamabashiri M, Tyson DR, Kuroki M, Miyamoto S, **Shirasawa S**. Inhibition of phosphodiesterase-4 (PDE4) activity triggers luminal apoptosis and AKT dephosphorylation in a 3-D colonic-crypt model. *Mol Cancer.* 25;11:46. doi: 10.1186/1476-4598-11-46. 2012. (査読有)

Doi K, Fujimoto T, Okamura T, Ogawa M, Tanaka Y, Mototani Y, Goto M, Ota T, Matsuzaki H, Kuroki M, **Tsunoda T**, Sasazuki T, **Shirasawa S**. ZFAT plays critical roles in peripheral T cell homeostasis and its T cell receptor-mediated response. *Biochem Biophys Res Commun.* 17;425(1):107-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.065, 2012. (査読有)

ALPK2 is crucial for luminal apoptosis and DNA repair-related gene expression in a three-dimensional colonic-crypt model. Yoshida Y, **Tsunoda T**, Doi K, Fujimoto T, Tanaka Y, Ota T, Ogawa M, Matsuzaki H, Kuroki M, Iwasaki A, **Shirasawa S**. *Anticancer Res.* Jun;32(6):2301-8, 2012.

(査読有)

KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. Ota T, Doi K, Fujimoto T, Tanaka Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Kuroki M, Miyamoto S, **Shirasawa S**, **Tsunoda T**. *Anticancer Res.* 32(6):2271-5, 2012. (査読有)

[学会発表](計10件)

**角田俊之**, 佐々木隆光, 土井佳子, 石倉周平, **白澤専二**. 膵臓癌のジェムシタピン耐性化には3次元特異的変異 KRAS 制御分子群が関与する 第18回バイオ治療研究会学術集会, 高松, 香川県県民ホール アルファあなぶきホール, 12月13日, 2014

**角田俊之**, **白澤専二**. 大腸癌スフェロイドにおける変異 KRAS カスケードの解明とその応用 第2回細胞凝集研究会, 福岡, アクロス福岡, 12月6日, 2014

**角田俊之**, 土井佳子, 石倉周平, **白澤専二**. KRAS 制御分子 ALPK2 の造腫瘍メカニズムの解析 日本人類遺伝学会第59回大会, 船堀, タワーホール船堀, 11月19-22日, 2014

**角田俊之**, **白澤専二**. 変異 KRAS 陽性癌を標的とする薬剤開発のためのスクリーニングシステム 第73回日本癌学会学術総会 横浜, パシフィコ横浜, 9月25-27日, 2014

**角田俊之**, 土井佳子, 石倉周平, **白澤専二**. 変異 KRAS が制御する3次元特異的癌増殖経路阻害のためのドラッグスクリーニング法の開発:化学療法基盤支援活動第3回シンポジウム, 名護, 万国津梁館オーシャンホールA, 5月12日, 2014

**角田俊之**, 太田岳晴, 土井佳子, 石倉周平, **白澤専二**. 大腸癌 spheroid に対する PDE4 阻害剤の効果検討. 第17回バイオ治療研究会学術集会, 福岡, 福岡大学メディカルホール, 12月7日, 2013

**角田俊之**, 土井佳子, 石倉周平, **白澤専二**. 大腸癌における3次元特異的変異

KRAS 制御 microRNA の解析. 日本人類  
遺伝学会第 58 回大会, 仙台, 江陽グ  
ランドホテル, 11 月 20-23 日, 2013

**角田俊之, 白澤専二**. PDE4 の抑制は 3  
次元大腸クリプトモデルにおいてアポ  
トーシスと AKT の脱リン酸化を誘導す  
る. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜,  
パシフィコ横浜, 10 月 3-5 日, 2013

**角田俊之, 白澤専二**. ZFAT は末梢 T 細  
胞の恒常性と T 細胞レセプター刺激に  
対する増殖応答性に関与する; 第 16 回  
バイオ治療法研究会, 東京, 東京理科大  
学森戸記念館, 12 月 8 日, 2012

**角田俊之, 白澤専二**. 変異 KRAS 制御  
ALPK2 は 3 次元大腸クリプトモデルに  
おいてアポトーシスと DNA 修復関連遺  
伝子の発現を誘導する; 第 71 回日本癌  
学会学術総会, 札幌, ロイトン札幌, 9 月  
19 日, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/cellbio/top.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

角田俊之 ( TSUNODA, Toshiyuki )  
福岡大学医学部・細胞生物学・准教授  
研究者番号 : 70444817

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

鍋島一樹 ( NABESHIMA, Kazuki )  
福岡大学医学部・病理学・教授  
研究者番号 : 40189189

河田健二 ( KAWADA, Kenji )  
京都大学医学部・消化管外科・講師  
研究者番号 : 90322651

白澤専二 ( SHIRASAWA, Senji )  
福岡大学医学部・細胞生物学・教授  
研究者番号 : 10253535

### (4)研究協力者

太田康晴 ( OTA, Yasuharu )