

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591987

研究課題名(和文)大腸癌における合成レチノイドの核内レセプター制御による分化誘導作用の解明

研究課題名(英文) Action mechanisms of synthetic retinoids to the colon cancer connected with the regulation of nuclear receptors.

研究代表者

中山 善文 (NAKAYAMA, Yoshifumi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50279337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：合成レチノイドのTAC-101の作用機序解明のために、臨床使用されているATRA、Am80との比較検討を行った。これらの薬剤投与による大腸癌細胞での核内レセプターを含めた分化誘導関連遺伝子等の変化をマイクロアレイ法で解析した。マイクロアレイ解析で抽出された遺伝子においてGO解析とパスウェイ解析を行った。TAC-101により変化した遺伝子で、ラット大腸癌肝転移モデルにおける肝転移巣と正常肝組織の免疫染色を行い、TAC-101による肝転移抑制効果に関与する物質を検討した。また、ラット大腸発癌モデルにおける正常粘膜と腫瘍組織を免疫染色し、TAC-101による大腸発癌抑制効果に関与する物質を検討した。

研究成果の概要(英文)：4-[3,5-bis(trimethylsilyl)benzamide] benzoic acid (TAC-101) is a novel retinobenzoic acid derivative. All trans retinoic acid (ATRA) and Am80 are already clinical using for treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). In this study, for the elucidation of the mechanical action of TAC-101 to inhibit the metastasis of colorectal cancer or carcinogenesis of colorectum, we have researched the changed gene expression of colon cancer cells by TAC-101, ATRA or Am80 using microarray analysis. Gene Ontology analysis and Pathway analysis were performed to these changed genes selected by microarray analysis. Additionally, immunostaining of these changed genes were performed to the hepatic metastatic tumor and normal liver in rat hepatic metastatic model and colorectal tumor and normal colonic mucosa in rat chemical colon carcinogenesis model. These experiments have indicated the several candidate genes, such as RIP140 (NRIP1), EDAR, GADD153 (DDIT3), targeting by TAC-101.

研究分野：消化器外科

キーワード：TAC-101 合成レチノイド Am80 ATRA 大腸癌 肝転移抑制 大腸発癌モデル 核内レセプター

### 1. 研究開始当初の背景

我々はレチノイド(ビタミンAの代謝産物および誘導体の総称)の細胞分化制御作用と細胞増殖抑制作用、制癌作用、抗血管新生作用、アポトーシス誘導作用に注目している。最近では、レチノイドのひとつのall-trans retinoic acid (ATRA)は、その細胞分化制御作用により、急性前骨髄性白血病の治療に効果をあげている。また、数多くの疫学調査によって、レチノイドが肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、乳癌、肝臓癌、皮膚癌などの多くの固形癌の発癌リスクを減少させることが報告されているが、これらの発癌リスクの減少や抗癌作用のメカニズムはいまだに不明な点が多い。

日本において急速に増加してきた大腸癌の発癌に関する多くの遺伝子変異が報告されているが、レチノイドがどのようなメカニズムでその発癌を抑制しているのか、どの遺伝子に影響を及ぼしているのか、詳細は不明である。また、レチノイドは、前癌病変を有する場合、もしくは、癌治療後の二次発癌予防、すなわち、高危険群に対する転移予防にも極めて有望と考えられているが、そのメカニズムもいまだ不明の点が多い。

今までにいくつかの合成レチノイドに関して、制癌作用のスクリーニングが行われ、基礎実験を繰り返して、臨床試験が行われてきたが、固形腫瘍に対しては、未だに実用化されているレチノイドは存在しない。そこで我々は大腸癌細胞株、胃癌細胞株やラット肝転移モデルを用いての検討で、新規合成レチノイドの4-[3,5-Bis(trimethylsilyl)benzamide] benzoic acid (TAC-101)が、発癌予防と転移抑制作用を有し、安全性においても有望な薬剤であることを見いだした。TAC-101は基礎実験において、大腸癌細胞株と胃癌細胞株を移植したヌードマウスの生存期間を延長し、転移を抑制していた。また、肝細胞癌の同所移植実験でも肝内転移を抑制し、生存期間を延長していた。

TAC-101は、Phase I/II studyにおいて、他の治療に抵抗性を示した進行肝細胞癌患者に対し、TAC-101の経口投与が腫瘍に対するlate responseを示し、生存期間の延長が認められ、臨床試験が追加された。2008年春から、米国において肝臓癌に対する臨床試験が行われた薬剤である。

我々はTAC-101の大腸癌細胞の肝転移抑制メカニズムとして、大腸癌細胞におけるvascular endothelial growth factor (VEGF)発現抑制効果とそれに基づく抗血管新生作用、Fas発現誘導効果とそれに基づくアポトーシス誘導作用を証明し報告した。しかしながら、どの作用においても未だに不明な点が多く、特に、消化器癌に対するTAC-101の分化誘導作用についてほとんど検討されていない。白血病における分化誘導作用については、形態学的変化が明らかであり、作用効果判定の指標となることから検討しやすく、TAC-101による白血病細胞株の分化誘導作用も確認され報告されている。また、最近ではTAC-101の類似レチノイドであるAM80 (Tamibarotene)はATRA抵抗性の急性前骨髄性白血病の治療薬として実臨床で使用されている。

現在まで、合成レチノイドは白血病に対す

る治療薬として開発され、臨床応用が開始されているが、消化器癌においては、分化誘導剤による癌細胞の形態変化が乏しく、形態変化による作用効果判定が容易ではないため、研究が進んでいない。現時点では Sodium Butyrate などの分化誘導剤を対照として使用し、alkaline phosphatase activity などの癌細胞における生物学的活性の変化を測定する方法、E-cadherin や fibronectin、mutin などの接着分子の変化、p21/Cip1 や p27/Kip1 などの細胞周期関連遺伝子の変化、PPAR $\gamma$  などの増殖関連遺伝子の変化を評価する方法で、分化誘導を評価している。癌細胞が薬剤により分化誘導されると apoptosis が増加し、proliferation が抑制され、浸潤能も抑制されるといった現象学的に評価する方法もある。分化誘導そのものを直接評価できる単一の遺伝子が示されているとは言い難いが、前述の評価方法で、消化器癌における分化誘導の評価は行うことが可能である。また、レチノイドは、核内のレチノイン酸レセプターと結合し、標的遺伝子プロモーターの特定配列を認識して結合し、その遺伝子の転写を制御することが示されている。したがって、レチノイドの作用発現にはレチノイン酸レセプターとの結合が必須である。現在、ヒトでは48種類の核内レセプターが存在すると言われているが、最近では、核内レセプターはそれぞれのリガンドと結合し標的遺伝子の転写を制御するだけでなく、核内で複数の巨大複合体を形成し、互いにクロストークすることが報告されている。

### 2. 研究の目的

我々の今回の研究の目的は、TAC-101などの合成レチノイドによる大腸癌の核内レセプター制御による分化誘導作用のメカニズムを解析することである。新規合成レチノイドの4-[3,5-Bis(trimethylsilyl)benzamide] benzoic acid (TAC-101)が大腸癌に対する抗腫瘍薬として、転移制御と発癌予防において有望な薬剤であることが示されている。TAC-101は肝臓癌に対して臨床試験が進められていた薬剤であるが、その他の癌腫に対しての臨床試験は未だ行われていない。TAC-101は大腸癌細胞に対して形態学的変化をもたらすことから、分化誘導作用を有するものと推測されるが、そのメカニズムは今までに解析されていない。そこで、今回、我々は、大腸癌に対するTAC-101などの合成レチノイドの分化誘導作用、特に核内レセプターの発現制御について、形態学的評価法、細胞生物学的手法、分子生物学的手法を用いて詳細に検討した。

### 3. 研究の方法

合成レチノイドのTAC-101の作用機序解明のために、臨床使用されているATRA、Am80との比較検討を行った。TAC-101、ATRA、Am80投与によって、大腸癌細胞における核内レセプターを含めた分化誘導関連遺伝子などがどのように変化するかをマイクロアレイ法で解析した。

TAC-101、ATRA、Am80に対する大腸癌細胞株DLD-1の薬剤感受性試験をWST-8アッセイで行った結果で、それぞれの薬剤の至適濃度を決定した。それらの濃度で各薬剤の72時

間暴露を行い Total RNA を抽出した。Total RNA 抽出は Total RNA/RNeasy Mini Kit を使用して行った。マイクロアレイ解析はヒト全遺伝子型 DNA チップ (ヒト 25k ver 2.10) を用いた 2 色法で、Dye-Swap を行った。RNA サンプルの品質チェックも問題なし。約 25000 の遺伝子を網羅的に検討し、Log2Ratio 0.5 または Log2Ratio -0.5 の変化を示したものを抽出した。これらの抽出された遺伝子において、GENECODIS2.0 を使用した GO (Gene Ontology) 解析とパスウェイ解析を行った。以上のマイクロアレイ解析の結果、TAC-101 投与により変動することが確認された遺伝子の中で、ラットに使用できる抗体を選択し、*in vivo* での解析を行った。選択した抗体は、核内レセプター関連遺伝子の RIP140 (NRIP1)、アポトーシス関連遺伝子の EDAR、細胞周期関連遺伝子の GADD153 (DDIT3)、分化誘導関連遺伝子の GalNac-T3 であった。

*in vivo* での実験は、ラット大腸癌門脈内注入肝転移モデルとラット化学発癌剤誘発大腸癌モデルを行った。ラット大腸癌門脈内注入肝転移モデルでは、TAC-101 が肝転移を抑制することが示されており、ラット化学発癌剤誘発大腸癌モデルでは、TAC-101 が大腸発癌を抑制することが示されている。

選択した抗体を使用し、ラット大腸癌門脈内注入肝転移モデルにおける TAC-101 の肝転移抑制作用に關与する因子の蛋白レベルでの変化を見るために肝転移巣の免疫染色を行った。また、ラット化学発癌剤誘発大腸癌モデルにおける TAC-101 の大腸発癌予防効果に關与する因子の蛋白レベルでの変化を見るために、ラット大腸の腫瘍部と正常部を免疫染色した。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析の結果、TAC-101 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 177 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 77 個であった。ATRA 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 222 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 272 個であった。Am80 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 143 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 48 個であった。

(2) GENECODIS2.0 を使用した GO (Gene Ontology) 解析の結果

TAC-101 投与により発現増加した遺伝子は、レチノイン酸関連遺伝 (RARRES1, BHLHB2, STRA6, CYP26A1, RARRES3, CYP26B1)、核内レセプター関連遺伝子 (NR6A1)、細胞分化関連遺伝子 (ANGPT1, DHCR7, CSF1, IFRD1)、細胞増殖関連遺伝子 (RARRES1, GNG2, IGFBP6, IL8, TNFSF15, APPL, PRSS2, DHCR7, CSF1, LAMP4, HMOX1, TGFB1, TMEM97)、細胞周期関連遺伝子 (CDKN2B, APPL, SESN3, ASNS, DDIT3)、血管新生関連遺伝子 (IL8, ANGPT1, HMOX1)、アポトーシス関連遺伝子 (TSC22D3, ASNS, FAM176A, CASP10, DDIT3, EDAR, DDIT4)、細胞外マトリックス関連遺伝子 (PRSS2, CHI3L1, FBN3, FBN2, TGFB1, ADAMTS19)、転移浸潤関連遺伝子 (S100P, IL8, CCL26, ORSS3, CSF1, CALCA, SEMA3F, NOX1, HMOX1, MMP1, RNASE4, INSR) で、TAC-101 投与により発現減少した遺伝子は、核内レセプター関連

遺伝子 (KIT)、細胞増殖関連遺伝子 (CYR61, ATP8A2, ANXA1, IGFBP7, SCIN, CAV1)、細胞周期関連遺伝子 (ANXA1)、アポトーシス関連遺伝子 (C1orf178, HSPA1A, CIDEA, TNFRSF11B, FASLG, SCIN, ANXA1, PAK7)、細胞外マトリックス関連遺伝子 (TNC, WNT7B, NTNG1, TNFRSF11B)、転移浸潤関連遺伝子 (DPP4, KIT, CD24L4, MAP3K1, SEMA3C, SST, CDH20, INS, EDN1) であった。

(3) パスウェイ解析の結果

GenMAPP Ver.2.1 (MAPP Finder) を使用し解析した結果

マイクロアレイ解析の結果から、TAC-101 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 177 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 77 個であった。パスウェイ解析では、発現増加遺伝子群で有意なパスウェイが 13 個、発現減少遺伝子群で有意なパスウェイが 4 個存在した。発現増加遺伝子群の有意なパスウェイのいくつかにおいて、共通して発現増加した遺伝子が 6 個 (ID11, CYP51A1, SQLE, CYP26A1, CYP24A1, CYP26B1) 存在した。

現在、GenMAPP Ver.2.1 (MAPP Finder) のバージョンアップに伴い使用出来ないため、その後の解析は、GENECODIS2.0 を使用して KEGG Pathway でのランキング解析を行った。

マイクロアレイ解析の結果から、TAC-101 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 177 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 77 個であった。発現が有意に増加した遺伝子でのパスウェイは、発現増加遺伝子群で有意なパスウェイが 2 個、発現減少遺伝子群で有意なパスウェイが 13 個存在した。発現増加遺伝子群の有意なパスウェイにおいて、共通して発現増加した遺伝子が 3 個 (CCL20, CSF1, IL8) 存在した。発現減少遺伝子群の有意なパスウェイのいくつかにおいて、共通して発現減少した遺伝子が 4 個 (HLA-DRB1, HLA-DOB, C1QC, CXCL6) 存在した。

ATRA 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 222 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 272 個であった。パスウェイ解析では、発現増加遺伝子群で有意なパスウェイが 1 個、発現減少遺伝子群で有意なパスウェイが 9 個存在した。発現減少遺伝子群の有意なパスウェイのいくつかにおいて、共通して発現減少した遺伝子が 8 個 (TGFB2, FGF18, FASLG, MAPK10, MAP2K7, KIT, IL4, SERPINE1) 存在した。

Am80 投与において発現が有意に増加した遺伝子は 143 個で、発現が有意に減少した遺伝子は 48 個であった。パスウェイ解析では、発現増加遺伝子群で有意なパスウェイが 13 個、発現減少遺伝子群で有意なパスウェイが 0 個存在した。発現増加遺伝子群の有意なパスウェイのいくつかにおいて、共通して発現増加した遺伝子が 9 個 (UGT1A1, UGT2B10, CYP1A2, CYP2E1, CCL20, CCL26, CCR6, CCR7, IL3RA) 存在した。

(4) *in vivo* での免疫染色の結果

ラット大腸癌門脈内注入肝転移モデルにおける免疫染色

核内レセプター関連遺伝子の RIP140 (NRIP1) は、正常肝組織では TAC-101 投与群の発現がコントロール群と比べ減少しており、肝転移巣における TAC-101 投与群の発現

も、コントロール群と比べ発現が減少していた。アポトーシス関連遺伝子の EDAR は、正常肝組織では TAC-101 投与群の発現はコントロール群と比べ変わりなかったが、肝転移巣における TAC-101 投与群の発現が、コントロール群と比べ発現が減少していた。細胞周期関連遺伝子の GADD153 (DDIT3) は、正常肝組織では TAC-101 投与群の発現がコントロール群と比べ減少しており、肝転移巣における TAC-101 投与群の発現も、コントロール群と比べ発現が減少していた。分化誘導関連遺伝子の GalNac-T3 は、正常肝組織では TAC-101 投与群の発現はコントロール群と変わらず、肝転移巣における TAC-101 投与群の発現は、コントロール群と比べ発現が増加していた。以上の結果から、TAC-101 のラット大腸癌肝転移抑制効果は、核内レセプター関連遺伝子の RIP140 (NRIP1)、アポトーシス関連遺伝子の EDAR と細胞周期関連遺伝子の GADD153 (DDIT3) の発現減少と分化誘導関連遺伝子の GalNac-T3 の発現増加に關与するものと考えられた。

今後、マイクロアレイ解析で、TAC-101 投与により変動することが確認されたそのほかの遺伝子についても、蛋白レベルの発現変化を検討予定。

ラット大腸発癌モデルにおける免疫染色

核内レセプター関連遺伝子の RIP140 (NRIP1) は、正常粘膜では TAC-101 投与群の発現がコントロール群と比べ増加しており、腫瘍部における TAC-101 投与群の発現も、コントロール群と比べ発現が増加していた。アポトーシス関連遺伝子の EDAR は、正常粘膜では TAC-101 投与群の発現はコントロール群と比べ変わりなかったが、腫瘍部における TAC-101 投与群の発現が、コントロール群と比べ発現が増加していた。細胞周期関連遺伝子の GADD153 (DDIT3) は、正常粘膜では TAC-101 投与群の発現がコントロール群と比べ増加しており、腫瘍部における TAC-101 投与群の発現も、コントロール群と比べ発現が増加していた。分化誘導関連遺伝子の GalNac-T3 は、正常粘膜では TAC-101 投与群の発現はコントロール群と変わらず、腫瘍部における TAC-101 投与群の発現も、コントロール群と比べ発現は変わらなかった。

以上の結果から、TAC-101 のラット大腸癌抑制効果は、正常粘膜部における RIP140 と GADD153 の発現増加、および、腫瘍部における RIP140、EDAR と GADD153 の発現増加に關与するものと考えられた。

今後、マイクロアレイ解析で、TAC-101 投与により変動することが確認されたそのほかの遺伝子についても、蛋白レベルの発現変化を検討予定。

## 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3件)

第 68 回日本大腸肛門病学会学術集会 2013 年 11 月 15 日 京王プラザホテル(東京) 中山善文、鳥越貴行、皆川紀剛、上原智仁、山口幸二 新規合成レチノイド TAC-101 による大腸癌細胞の遺伝子変化の網羅的解析

第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年 4 月 5 日 国立京都国際会館(京都) 中山善文、鳥越貴行、皆川紀剛、井上謙、上原智仁、森泰寿、山口幸二、和泉弘人 合成レチノイド TAC-101 と ATRA による大腸癌細胞の遺伝子変化の網羅的解析

第 69 回日本消化器外科学会総会 2014 年 7 月 16 日 郡山総合体育館(郡山) 中山善文、鳥越貴行、皆川紀剛、田村利尚、上原智仁、森泰寿、山口幸二、和泉弘人 合成レチノイド TAC-101、ATRA、Am80 による大腸癌細胞の遺伝子変化の網羅的解析の比較

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山善文 (NAKAYAMA, Yoshifumi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50279337