

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430129

研究課題名(和文) 上皮間葉転換とシアリルルイス糖鎖を標的とした転移抑制薬開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategy targeting epithelial-mesenchymal transition and sialyl lewis glycans

研究代表者

佐久間 圭一郎 (Sakuma, Keiichiro)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号：90402891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん細胞の上皮間葉転換(EMT)に伴うc-Mycを介するシアリルルイス糖鎖の発現増加を標的とした転移抑制治療開発を目指して研究をおこなっている。EMT下特異的なc-Mycの翻訳後修飾および共因子の同定を進めたが、前者については再現性のある結果が得られず、後者については複数の候補について検証を続けている。抗c-Myc抗体を用いた内因性c-Mycに対するChIP-on-Chip解析の結果、EMTに伴ってc-Mycが結合する遺伝子プロファイルが大きく変化することが明らかとなり、現在精査を続けている。一方、動物実験については移植部位の壊死によってEMTの観察が困難であり、手法の改善が必要である。

研究成果の概要(英文)：The object of this study is to establish a new therapeutic strategy for colon cancer through elucidating the molecular mechanism underlying c-Myc-induced sialyl lewis glycan expression in colon cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT). Identification of the EMT-specific modification of c-Myc have given no reproducible results, whereas the profiles of c-Myc-bound proteins and genes identified by NGS and ChIP-on-Chip were significantly different between EMT and non-EMT colon cancer cells, which is under detailed analysis. Our murine orthotopic colon cancer model has to be improved because it presented a technical problem due to necrosis of primary tumor making it difficult to identify cancer cell undergoing EMT.

研究分野：腫瘍学

キーワード：上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

・2020年には大腸がんは日本で最も罹患率の高い悪性腫瘍になると予想されている。大腸がんの死因の約9割は転移によるものであるとされており、転移の制御が急務となっている。

・がんの血行性転移は、局所浸潤、血管内侵入、血管内輸送、血管外脱出、転移巣形成、転移巣の増大という6段階の複雑なプロセスを経て成立する。

・上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) は、がん細胞が上皮系細胞のマーカーである E-カドヘリンの発現を喪失して間葉系細胞の性質を獲得する現象であり、このプロセスを促進する<sup>1</sup>。

・シアリルルイス糖鎖はがん細胞の膜表面に発現する糖鎖性接着分子で、血管内細胞の E-セレクトリンと結合することでがん細胞の血管外脱出を独占的に媒介するといわれている<sup>2</sup>。

・研究代表者は、大腸がん細胞に上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) と線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) で EMT を誘導すると、転写因子 c-Myc の活性亢進を介してシアリルルイス糖鎖の発現が著明に増加することを報告した<sup>3</sup>。この機序の中に転移抑制の上で有効な治療標的分子が内包される可能性が考えられる。

### 【参考文献】

1. Kannagi R, et al. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*, 95:377-384, 2004.

2. Kalluri R, et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119:1420-1428, 2009.

3. Sakuma K, et al. 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 U S A*, 109(20):7776-7781, 2012.

## 2. 研究の目的

EMT に伴う c-Myc の活性亢進機序の分子レベルでの解明を通して、転移抑制薬の薬剤標的候補分子を同定する。

EMT に伴う c-Myc の活性亢進によって大腸がん細胞にもたらされる、シアリルルイス糖鎖の発現増加以外の転移に関連する性質変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1. EMT 下特異的な c-Myc の翻訳後修飾および共因子の同定

ヒト大腸がん細胞株 HT29 に c-Myc をレンチウイルスで安定発現させたものを樹立し、

EMT 誘導下と非誘導下でラーゼートを調整し、免疫沈降法によって c-Myc を抽出した。抗リン酸化 c-Myc 抗体、抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体、抗アセチル化リシン抗体等を用いてウェスタンブロット法による翻訳後修飾の解析をおこなった。また、N 末端に HA タグを付した c-Myc を HT29 細胞に安定発現させたものも作成し、同様に EMT 誘導下と非誘導下のラーゼートを抗 HA 抗体で免疫沈降し、c-Myc と共沈したタンパクを質量分析法で同定した。

### 2. EMT 下特異的に c-Myc と結合する遺伝子群の同定

シアリルルイス糖鎖の合成に関与する遺伝子群以外に EMT 下で c-Myc による発現調節を受ける遺伝子群を同定する目的で、ヒト大腸がん細胞株 HT29 細胞の EMT 誘導時と非誘導時のクロマチンを抽出し、抗 c-Myc 抗体を用いて内因性 c-Myc と結合したクロマチンを免疫沈降し、ChIP-on-Chip 解析をおこなった (Agilent Human Promoter 1x1M array)。得られた遺伝子リストを DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) などを用いてクラスタリング解析をおこなった。

### 3. EMT 下で c-Myc の活性亢進を誘導する因子の同定

EMT および c-Myc の活性亢進に対する間質因子の関与についても検討するため、マウスへの大腸がん細胞株同所移植による大腸がんモデルマウス構築を試みた。細胞はヒト大腸がん細胞株 SW480、HT29、HCT116、CaRI を使用し、マウスはヌードマウスとした。細胞移植個数は  $4 \times 10^6$  個で、50%マトリゲル/PBS で懸濁したものを直腸粘膜下に 27G 針で注射した。動物実験は施設の規則を遵守し、マウスに必要な以上の苦痛を与えないように留意した。

## 4. 研究成果

全体的に研究は未だ半ばであり、今後も継続する必要がある。

### 1. EMT 下特異的な c-Myc の翻訳後修飾と共因子の同定

従来より c-Myc の活性調節への関与が知られている翻訳後修飾として、セリン/スレオニンのリン酸化 (Ser62/Thr58) とリシンのアセチル化を中心にウェスタンブロットで精査したが、再現性のある結果が得られなかった。使用する抗体、ブロッキング条件によって結果にばらつきが見られた。既にウェスタンブロットに依存しない方法で検討を開始しており、セリン/スレオニンリン酸化、アセチル化以外の修飾がより重要である可能性が示唆されている。

EMT 下で c-Myc と共沈するタンパクについ

では、現時点では詳細を明らかにできないが、複数の興味あるタンパクが検出された。現在、再現性の確認をおこなっている。

### 2. EMT 下特異的に c-Myc と結合する遺伝子群の同定

EMT 誘導時と非誘導時で c-Myc と結合する遺伝子プロファイルが著明に変化することを見出した。クラスターリング解析によっていくつかの興味深いパスウェイが上位に検出され、現在詳細な検証を進めている。

### 3. EMT 下で c-Myc の活性亢進を誘導する因子の同定

ヒト大腸がん細胞株 SW480、HT29、HCT116、CaR1 をヌードマウスの直腸粘膜下に移植し、前3者については生着を得たが、移植部位の腫瘍に著明な壊死を生じたため、EMT をおこなったがん細胞を同定することが極めて困難であった。一方、他の研究プロジェクトにおいて、マウス大腸がん細胞株 CMT93 を同系統マウス(C57BL/6)に移植する系を確立したが、CMT93にEMTを誘導できるかは未確認であり、今後の検討で確認したい。

### 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0件)

〔学会発表〕(計5件)

1. Masahiro Aoki, Keiichiro Sakuma: An in vivo shRNA screen identifies HNRNPLL as a novel colorectal cancer metastasis suppressor. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, February 19, 2016, Lahaina, USA.

2. 佐久間圭一朗、青木正博: Epithelial mesenchymal transition negatively regulates HNRNPLL, a candidate metastasis suppressor of colon cancer. 第74回日本癌学会学術総会, 10月10日, 2015, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

3. 佐久間圭一朗、青木正博: A genome-wide shRNA library screen for colon cancer metastasis suppressor genes. 第73回日本癌学会学術総会, 9月26日, 2014, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

4. Keiichiro Sakuma, Masahiro Aoki: A genome-wide shRNA library screen for colon cancer metastasis suppressor genes. 第7回 NAGOYA グローバルリトリート, 2月13日, 2014, 愛知健康プラザ(愛知県・大府市).

5. 佐久間圭一朗、神奈木玲児、青木正博: Sialyl Lewis glycan expression is linked

with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. 第65回日本細胞生物学会大会, 6月20日, 2013, ウィンクあいち(愛知県・名古屋市).

〔図書〕(計1件)

1. Kannagi R, Sakuma K, Cai BH, Yu SY., Tumor-associated glycans and their functional roles in the multistep process of human cancer progression. Sugar chain, 139-58, Springer, New York, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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〕

愛知県がんセンター研究所・分子病態学部ホームページ

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi\\_byotai/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi_byotai/index.html)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

佐久間 圭一朗 (SAKUMA Keiichiro)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号: 90402891

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

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

神奈木 玲児 (KANNAGI Reiji)

愛知医科大学・先端医学研究センター・客

員教授

研究者番号：80161389