

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460962

研究課題名(和文) 化学療法抵抗性大腸癌の細胞接着タンパクの破綻とCDX2を介した再分化のメカニズム

研究課題名(英文) The Mechanism of disintegration and redifferentiation of cell adhesion proteins through CDX2 in chemotherapy refractory colorectal cancer.

研究代表者

船越 信介 (FUNAKOSHI, SHINSUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20297352

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)：pHT expression vectorを用いたCDX2強制発現大腸癌安定細胞株とpHT2コントロール株およびpHT2のCDX2-ShRNAによる遺伝子特異的発現抑制株を作成。これらの細胞株を用いて、様々な受容体型チロシンキナーゼ蛋白質のリン酸化状態および細胞接着マーカーの発現解析をした。各細胞株のsp細胞分画を抽出し、細胞機能、増殖能、接着能、浸潤能を調べた。コロノスフェアを使用した薬剤感受性アッセイによる腫瘍縮小効果の検討し、化学療法抵抗性大腸癌の細胞接着タンパクの破綻とCDX2を介した再分化のメカニズム特に、CDX2によるRac1発現の制御のメカニズムを追及している。

研究成果の概要(英文)：Generating pHT- control, pHT-Cdx2, and pHT-Cdx2-ShRNA-infected Colon cancer cells, the phosphorylation states of several receptor tyrosine kinases and the expression of cell adhesion marker were analyzed. Side population cells derived from each cancer cells were investigated in terms of cell function, proliferation, adhesion and invasion potential. Using spheroid-based drug screen, we are determined to pursue the mechanism of disintegration and redifferentiation of cell adhesion proteins through CDX2 in chemotherapy refractory colorectal cancer. Especially, we focus on the mechanism the regulation of Rac1 expression by Cdx2.

研究分野：Oncology

キーワード：CDX2 SP細胞 細胞接着関連タンパクの破綻 化学療法抵抗性大腸癌

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌はわが国の癌死の主要な原因のひとつであり、2015 年部位別予測死亡者数は肺癌に次いで第二位である。その死因の大半は転移、浸潤によるものである。大腸癌の臨床的動向は様々なレベルでの相互作用により影響を受ける。大腸癌の発生に関わる初期の因子、進行に関与する因子、化学療法抵抗性因子を同定することが非常に重要である。遺伝子不安定性を示すものとして染色体不安定性 (APC, TP53, SMAD4 レベルの Loss of heterozygosity), DNA ミスマッチ修復遺伝子の欠損 (MLH1, MSH2, MSH6), CpG island のメチル化、癌抑制遺伝子として APC, TGFBR2, SMAD4, TP53 があげられる。癌遺伝子として RAS, BRAF V600E, PI3KA, PTEN などがあげられる。特に RAS 遺伝子の変異は予後予測因子となっており、通常の大腸癌の 50% に認められる。近年、Oxaliplatin, 抗 EGFR 抗体, 抗 VEGF 中和抗体などの新規抗癌剤や分子標的治療薬の開発・応用の進歩により、大腸癌の治療成績は劇的な改善を認めている。しかしながら、RAS 遺伝子変異型では抗 EGFR 抗体薬の治療効果が少なく、抗癌剤の有効性は限界があり、新たな抗癌剤のレジメンの確立が必須である。後天的治療抵抗性の原因として、腫瘍細胞の薬剤感受性、腫瘍増殖速度の問題、drug-delivery の難しさ、転移、浸潤などが問題となっているが、これらに関わる規定分子の同定・制御が治療成績改善に重要であり、分子標的治療における有効な標的分子の決定が急務である。申請者らはこれまで、消化管特異的に発現する転写因子 Cdx2(caudal type homeobox)と Wnt シグナル系に着目し、消化器系癌とくに大腸癌細胞における細胞接着および columnar morphogenesis のシグナル伝達経路に関する研究を行ってきた。Cdx2 は多面性を有し、細胞の増殖、アポトーシス、分化、細胞周期、細胞接着などに関与する。現在まで多くの研究者により Cdx の標的分子が同定されている。Guo および申請者らは E-cadherin を介した細胞間接着と Wnt シグナリングの中心的役割を担う

-catenin の転写活性を調べ、大腸癌において悪性度が高まると、E-cadherin- catenin が Cdx により阻害されることを報告している。さらに -catenin の翻訳後の修飾を介して Cdx が大腸癌細胞の分化を誘導する。大腸癌において悪性度が高まると、E-cadherin- catenin あるいは p120-catenin の結合能が減弱し、細胞の運動能、転移能が増加することがいわれている。申請者らは CDX がデスモゾーム形成タンパク質デスコリン 2 のプロモーターに直接結合し、大腸癌の抑制因子として働くことを報告している。さらに申請者らは大腸癌細胞において活性化されている受容体チロシンキナーゼのシグナル伝達経路を Cdx2 がエンドサイトーシスによる受容体チロシンキナーゼの不活化、E-カドヘ

リンの膜へ移行させることで E-カドヘリンの機能を回復させて大腸癌の浸潤、転移を抑制することを報告している。今回申請者らは Cdx が受容体型チロシンキナーゼあるいは非受容体型チロシンキナーゼに影響し、

-catenin, p120-catenin および E-cadherin の機能を抑制し、癌の浸潤・転移を抑えると仮説をたてた。まず ABC トランスポーターを高いレベルで発現し、様々な細胞障害性を有する薬剤に耐性を示す side population cell(SP 細胞)や ALDH 発現化学療法抵抗性大腸癌を FACS、ALDEFLUOR アッセイ、生化学的手法を駆使しながら効率的に抽出する。続いて大腸癌細胞のシグナル伝達過程にかかわる遺伝子群の中で、後天的治療抵抗性克服のために有効な標的分子を同定し、RNA Interference (RNAi) による抑制効果を検討し、新たな創薬への応用を目指す。特に化学療法抵抗性大腸癌における細胞接着関連タンパクの破綻のメカニズム、ホメオボックス転写因子 CDX2 を介した細胞の再分化および浸潤・転移の抑制を EGF, IGF, c-MET のリン酸化に着目し、研究を継続する。

### 2. 研究の目的

SP 細胞、ALDH 発現細胞大腸癌において Cdx2 がどのように細胞の分化、転移に影響を与えるか、細胞接着関連タンパク質の活性の変化とそのメカニズムを解明することで化学療法抵抗性大腸癌において重要なシグナル伝達経路を探求する。

### 3. 研究の方法

まずヒト大腸癌細胞株 10 種の内因性 CDX の発現を調べ、pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株と pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株を作成する。Halotag system にて抗体を使用しなくても生きてきたまま細胞の運動、CDX2 の局在を同定できる。続いて SP 細胞、ALDH 発現細胞の形態的变化、細胞接着の変化および癌転移抑制効果とシグナル修飾機構の解析を行いその細胞の生物学的特性を調べる。さらに 3D 培養システム、マウスモデルを使用し、従来の大腸癌治療薬 (5-Fluorouracil, oxaliplatin, CPT11) および新規分子標的薬 EGF inhibitor, Met inhibitor, IGF1R inhibitor を添加し、チロシンキナーゼ、ホスホチロシンフォスファターゼ活性、上皮間葉転換、増殖能、浸潤能、転移能の変化を比較検討し新規治療薬の開発を目標とする。

# 1 pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株と pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株における細胞接着関連タンパク質の発現および遺伝子変異の解析とチロシンキナーゼ、ホスホチロシンフォスファターゼ活性、上皮間葉転換、転移能との相関

ヒト大腸癌細胞株 10 種(Colo201, Colo205, LoVo, DLD-1, HCT15, HCT116, HT29, HT29N2, CaCO2, T84) の pHT expression vector (Promega Inc.) を用いた CDX2 強制発現大腸癌安定細胞株と pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株に対して、細胞接着関連タンパク質の発現および遺伝子変異の解析とチロシンキナーゼ、ホスホチロシンフォスファターゼ活性、上皮間葉転換マーカーの発現を調べる。

# 1 - 1 . EGF, IGF, c-Met 受容体遺伝子および細胞接着マーカーの mRNA レベルの解析  
各大腸癌細胞株より RNeasy(Qiagen) を使って Total RNA を抽出し、First-Strand cDNA Synthesis Kit(Invitrogen) により cDNA 合成を行う。EGF, IGF, c-Met 受容体遺伝子および細胞接着マーカーの E-cadherin、

-catenin、p120catenin、DSC2、その他 N-Cadherin、vimentin などのプライマー配列、PCR 条件を設定する。SYBR Green RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、RT-PCR を行い、ABI Prism 7000 sequence detection system にて同定する。

# 1 - 2 . EGF, IGF, c-Met 受容体タンパク質リン酸化状態の解析  
EGF, IGF, c-Met 受容体タンパク質リン酸化の検出は、細胞抽出液と抗チロシンキナーゼ抗体と反応させ各 EGF, IGF, c-Met 受容体に対する抗体を用いた免疫沈降法により行う。抗リン酸化 EGF, IGF, c-Met 受容体特異的抗体を用いた Western Blot 法も同時に行う。特に pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株、pHT-2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株における主要なシグナリング経路を同定するため pHT 強制発現コントロール株とともに EGF, IGF, c-Met 受容体タンパク質リン酸化状態、PTP1B 活性を調べ、比較検討する。

# 1 - 3 . 細胞接着マーカーのタンパク質発現レベルおよびリン酸化状態への影響  
各大腸癌細胞株の抽出液を用いて、E-cadherin、-catenin、p120catenin、DSC2、N-Cadherin、vimentin および内因性 Cdx の全タンパク質とリン酸化の活性を調べる。

# 1 - 4 . EGF, IGF, c-Met 受容体タンパク質と細胞接着の相関  
各受容体タンパク質と E-cadherin、

-catenin、p120catenin、DSC2、N-Cadherin、vimentin および Cdx の細胞免疫染色(二重、多重染色)を行った後、Confocal microscopy を用いて観察する。また各々の分子のリン酸化抗体を用いて同様に細胞免疫染色を行う。特に pHT-CDX2 の細胞内の局在および、タンパク質合成および分解を調べる。

# 1 - 5 . 細胞運動能、浸潤能の検討  
Oris cell migration assay kit(Funakoshi 社), BD matrigel invasion assay(BD 社)を用いて細胞運動能、浸潤能を評価する。さらに small GTPase の RhoA, Rac1, CDC42 の活性化を RhoA, Rac1, Cdc42 Activation assay

kits(cytoskeleton 社) の Rhotekin-RBD, PAK-PBD 含有 beads, GST pulldown 法、ウェスタンブロット法を用いて評価する。

# 1 - 6 . pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株において活性化状態にある受容体型チロシンキナーゼの下流標的分子の探索

受容体型チロシンキナーゼのシグナルの下流でその標的分子の活性化状態を解析する。血清除去下で 48 時間培養を行った後、細胞より総タンパク質試料を抽出し、MEK (p42/44)、JNK、p38 および Akt/Protein Kinase B (PKB) ほか、PI3K、Akt、GSK3 に対して、リン酸化特異的抗体を使用してウェスタンブロットを行う。リコンビナント EGF, IGF あるいは HGF の存在下および非存在下で細胞接着マーカー、Cdx の変化、細胞接着、運動、浸潤能の変化を比較検討する。

# 2 pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株と pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株における SP 細胞、ALDH 発現細胞の形態的变化、細胞接着の変化および癌転移抑制効果とシグナル修飾機構の解析

Step #1 において作成した pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株、pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株を使用し、各々 FACS、ALDEFLUOR アッセイにて SP 細胞、ALDH 発現化学療法抵抗性大腸癌細胞を抽出し、形態的变化、細胞接着の変化および癌転移抑制効果を検討する。

# 3 コロノスフェアを使用した薬剤感受性アッセイによる腫瘍縮小効果の検討  
各種細胞株を 3D ゲルで培養し抗癌剤および新規分子標的薬を添加し、アポトーシス感受性、増殖能、浸潤能を比較検討する (Spheroid-based drug screen)。-catenin の転写活性をみるため TOPFLASH assay を行う。細胞接着関連タンパク質、チロシンキナーゼ、ホスホチロシンフォスファターゼ活性、EMT 関連タンパク質等をウェスタンブロットにて検討する。細胞免疫染色により細胞形態変化、細胞極性を比較検討する。

# 3 - 1 TOPFLASH assays -catenin の転写活性をみるため TOPFLASH assay を使用し、dual luciferase assay で解析する。

# 3 - 2 Apoptosis assays アポトーシスは定量的共焦点蛍光顕微鏡にて評価する。抗癌剤および Wnt inhibitor, -secretase inhibitor 投与後、細胞をパラアルデヒドで固定、DAPI 染色し核の断片化を評価する。

# 3 - 3 3D 培養による細胞浸潤能の検討  
pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株と pHT2 コントロール株および pHT-2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株における SP 細胞、ALDH 発現細胞からコロノスフェアを形成し 3 週間培養後、コロニー形成能、tyrosine kinase, oncogene, EMT, 細胞増殖、細胞接着、細胞極性、細胞浸潤に関連するマーカーの細胞免疫染色を検討する。

# 4 In Vivoにおける腫瘍縮小効果の検討、signaling pathway 解析

ヌードマウスを用いた腫瘍皮下移植モデルを作成し、腫瘍縮小効果を検討する。

# 4 - 1 NOD/SCID マウスへの皮下腫瘍移植モデルおよび大腸漿膜側局注癌細胞移植モデルにおける癌細胞の増殖能、浸潤、転移の検討

NOD/SCID マウスへの皮下腫瘍移植モデルおよび大腸漿膜側局注癌細胞移植モデルを用い、pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株と pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株における SP 細胞、ALDH 発現細胞を移植後、抗癌剤投与により腫瘍を縮小させる。75%以上の腫瘍縮小が得られた時点で腫瘍を摘出し、免疫染色により癌幹細胞マーカー分子の発現状況を検討する。In vivo bioluminescence imaging system を利用し、時間的空間的な腫瘍の増殖、浸潤、転移および薬剤の効果について解析する。腫瘍部、非腫瘍部より cDNA を得た後、microarray 解析を行い、新たなシグナル伝達経路を探求する。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株 10 種(Colo201, Colo205, LoVo, DLD-1, HCT15, HCT116, HT29, HT29N2, CaCO2, T84)の pHT expression vector を用いた CDX2 強制発現大腸癌安定細胞株と pHT2 コントロール株および pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株を作成した。

各細胞株における EGF, IGF, c-Met 受容体遺伝子および細胞接着マーカーの E-cadherin、 $\beta$ -catenin、p120catenin、DSC2、その他 N-Cadherin、vimentin の mRNA レベル、総タンパクレベルの発現は変化しなかった。次に EGF, IGF, c-Met 受容体タンパクリン酸化状態を調べ、各細胞株で EGF のリン酸化は変化を認めなかったが、IGF, c-Met のリン酸化は pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株で他の CDX2 強制発現大腸癌安定細胞株と pHT2 コントロール株より高いレベルを認めた。続いて E-cadherin、 $\beta$ -catenin、p120catenin、DSC2、N-Cadherin、vimentin の発現を調べ、pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株で増強した。細胞免疫染色後の Confocal microscopy の観察では、CDX2 強制発現大腸癌安定細胞株において、核内の  $\beta$ -catenin の減弱、細胞質の p120catenin、DSC2 の増強を認めた。一方、pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株で E-cadherin の膜での発現が減弱した。以前の検討で、大腸癌細胞において CDX2 と RAC1 の逆相関を認めた。細胞運動能、浸潤能の検討を行い、pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株において細胞運動能、浸潤能の増強および Active Rac1 の活性の上昇を確認した。一方、Active RhoA, Active Cdc42 の活性化とも一定しなかった。

(2) pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株に比し、pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株における SP 細胞分画が増加した。SP 細胞は non-sp 細胞より、運動能、浸潤能が高かった。

(3) 各種細胞株を 3D ゲル培養後に Spheroid-based drug screen を施行した。抗癌剤および新規分子標的薬には Staurosporine, SU11274, IGF1R inhibitor, EGFR inhibitor, EGFR/ErbB-2 inhibitor, Src kinase inhibitor, SU6656, PP2, Imatinib(STI571), PDGFR inhibitor, BCR-Abl inhibitor, Rac inhibitor, Rho inhibitor, AKT inhibitor を使用した。以前より我々は大腸癌の転移メカニズムにおいて、Rac1 促進的に、CDX2 が抑制的に関与していることに注目していた。転移能が高く、化学療法抵抗性のポテンシャルを有するとされている side population 細胞(sp 細胞)における Rac1 の関与を調べた。pHT2 の CDX2-ShRNA による遺伝子特異的発現抑制株の sp 細胞において、pHT-CDX2 強制発現大腸癌細胞株の sp 細胞より Rac1 の活性が高く、 $\beta$ -catenin の転写活性が高い傾向にあった。Rac inhibitor によりコロニー形成は抑制された。

(4) In Vivo における腫瘍縮小効果の検討におけるヌードマウスを用いた腫瘍皮下移植モデル実験は実施していない。今後の検討課題である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

船越 信介 (FUNAKOSHI SHINSUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20297352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

JOHN P LYNCH (JOHN P LYNCH)

University of Pennsylvania,

Department of Medicine, Division of

Gastroenterology, Associate

Professor of Medicine

東 俊文 (AZUMA TOSHIFUMI)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00222612