

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462071

研究課題名(和文)EMASTを誘発するがん微小環境に着目した大腸癌悪性化機構の解明

研究課題名(英文)Investigation of an EMAS T-generating tumor microenvironment and its relating malignant progression for colorectal cancer

研究代表者

有田 通恒 (ARITA, Michitsune)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80307719

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)：大腸癌の悪性化に関わる因子を明らかにすることは、進行性大腸癌克服のための最重要課題である。本研究では、悪性化過程で一過的に変化する因子も見逃さないよう、予後不良な大腸癌の特徴を人為的に生じさせる細胞培養条件の検討から着手した。生体内で悪性となる環境と同等の条件で発現量が大きく変化する遺伝子を調べたところ、大腸癌での関与が知られていない遺伝子を複数見いだした。中でも、カベオリン1は大腸癌組織標本でも発現が認められ、高発現による癌への影響が示唆された。研究期間内には詳細な役割を解明できなかったものの、本研究で確立した検索手法は未知の悪性化関連因子の同定手段として有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of progression and metastasis must be elucidated to cure metastatic colorectal cancers (CRCs). In this study, we established a new culture condition of colorectal cancer cell lines to generate elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide (EMAST). EMAST is a type of genomic instability and frequently detected in poor prognosis CRCs. Therefore, the in vitro EMAST generating condition is thought to reflect in vivo tumor microenvironment for malignant progression. Under this condition, we identified several genes with no apparent relevance to CRC by a comprehensive analysis of genes expression. Caveolin-1 (CAV1) was a candidate for novel malignant CRC-relating protein, because it was also detected in clinical CRC samples. Although precise roles of identified genes, including CAV1, were not revealed, our established EMAST-generating culture condition was shown to be useful for a screening of malignant CRC-relating factors.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：癌微小環境 進行性大腸癌 低酸素 転移 ゲノム不安定性 EMAST

## 1. 研究開始当初の背景

進行性大腸癌、特にステージIIIbとIVに分類される大腸癌の予後改善には、高精度な効果予測因子や治療効果の高い標的分子の開発が求められている。これは研究開始当初も現在も変わらず、悪性化の分子機序解明は今以て緊急性の高い課題である。

浸潤や転移、再発など腫瘍の悪性化に寄与する因子を同定するため、悪性度の異なる臨床検体間や同一患者の原発巣と転移巣の比較が国内外で精力的に行われてきた。いわば悪性化が完了した腫瘍を材料とするこれらの比較は、腫瘍が獲得した変化を捕えるには有効なアプローチである。しかし、悪性化する過程で一過的に必要な変化の捕捉はできない。このことが、膨大な数の取り組みが行われながら、それに見合う結果が得られていない要因と考えられた。

癌悪性化において一過的な変化が重要な因子を捕捉するためには、ヒトの体内で癌が悪性化する環境を実験的に再現することが重要である。そこで、我々は、予後不良の散発性大腸癌症例で高頻度に認められるゲノム不安定性を指標とすることで、臨床をより反映したin vitro細胞培養条件を確立する本研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

生体内の悪性化条件を再現できたか否かの判定基準として、我々は、マイクロサテライト領域の不安定性 (MSI) の1つEMASTに着目した。EMASTはelevated micro-satellite alterations at selected tetranucleotide repeatsの略称で、4塩基リピートのマイクロサテライトに異常が集中する。1~4塩基のリピート全般で異常を示す高レベルなMSI (MSI-H) とは異なるタイプとして位置づけられている。本邦でも米国でも散発性大腸癌でのEMAST頻度が6割にものぼり、腫瘍悪性化に伴うEMAST頻度の上昇も認められることは、EMASTが散発性大腸癌の進展や悪性度の指標となることを強く窺わせる。

MSIはDNAミスマッチ修復 (MMR) 機構の破綻が原因となる。MSI-Hは遺伝性非ポリポーシス性大腸癌の原因遺伝子MSH2やMLH1の異常により生じる。EMASTの原因遺伝子もまたMMR遺伝子の1つMSH3であるが、MSH2やMLH1のどちらか一方でも以上であ

れば、EMASTではなくMSI-Hとなる。すなわち、MSH2とMLH1が機能していて、MSH3のみが異常であることがEMASTの発生条件として求められる。我々は、臨床検体や大腸癌細胞株を用いたこれまでの検討から、EMAST腫瘍の発生は、MSH3の遺伝子異常ではなく、腫瘍内で生じる低酸素環境に起因する可能性を見いだした。

そこで本研究では大きく次の2つを目的とした。1) これまでに見いだした低酸素誘導性のMSH3機能異常を進展させて、in vitro培養系でのEMAST発生系を確立する。2) 確立したEMAST誘導条件下で発現や機能に変化する因子に着目して、大腸癌悪性化に関与する因子を同定する。

## 3. 研究の方法

EMASTを誘導するin vitro培養系の確立と、これを用いた大腸癌悪性化因子の同定のために、以下のような段階的な実施計画を立案した。

(1) EMAST発生環境の構築：大腸癌細胞株を用いて、MSH3とMSH2やMLH1の発現抑制の程度の違いを指標とした種々の低酸素環境の比較を行う。MSH3優位な発現抑制条件が見いだせれば、その環境下でのEMAST発生を確認して悪性化誘導条件として確立する。

(2) MSH3発現抑制条件下で働く増殖関連因子の検索：EMAST発生のタイミングはMMRが働くDNA複製時であり、細胞の増殖が不可欠である。1で見いだした条件で、増加もしくは活性化する増殖因子やDNAポリメラーゼならびに減少もしくは不活化する増殖抑制因子を検索する。

(3) 悪性度に寄与する因子の同定：2で見いだした候補について、臨床検体での発現様式をタンパクレベルで解析し、悪性度を反映する因子を同定する。また、大腸癌由来細胞株を用いて各候補因子の発現の有無による悪性化への影響を調べる。遊走能や浸潤性、低酸素や低糖下での増殖能など、悪性度を反映する性状を指標に評価し、見いだした因子と悪性化との関連を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸癌細胞株でEMASTを誘導する培養条件の確立

培養腫瘍の浸潤性獲得や原発巣からの離脱への関与が知られる重要ながん微小環境である低酸素に着目し、ヒト大腸癌細胞株SW620を0.1%の酸素濃度と通常酸素濃度とで培養し、EMASTを発生しうるかを検討した。低酸素下でのDNAミスマッチ修復(MMR) 遺伝子のタンパクレベルの発現量の変化を一定期間ごとに7日まで調べたところ、MSH3は経時的に減少したのに対し、MLH1やMSH2は3日目以降ほぼ同程度のタンパク量を維持した。これらMMRタンパクの低酸素3日目に対する7日目のタンパク量はそれぞれ42, 73, 94%であった。長時間の低酸素培養はMSH3に偏ったタンパク量の低下を引き起こしたことから、本条件下ではMMR機能の均衡が崩れEMAST発生が誘発される可能性が高いと考えられた。そこで、SW620を低酸素もしくは通常酸素濃度で7日間培養した後、限界希釈法により得られたクローン(低酸素, 37クローン; 通常酸素, 27クローン)について4塩基リピートのマイクロサテライトマーカー(MYCL1, L17686, UT5320, D9S242, D20S82)を中心に変異の有無を調べた。その結果、低酸素クローンのうち5クローンがいずれかの4塩基リピートに変異を示したのに対し、1塩基リピート(BAT26)の変異は示さなかったことから、EMASTと判定された。残りのクローンにも1塩基リピートの変異は認められなかったことから、今回検討した低酸素条件ではEMAST以外のMSIは誘導されないと考えられた。また、通常酸素クローンではすべてのマーカーに変異は認められなかった。これらの結果を踏まえて、7日間の低酸素培養をSW620を用いたin vitro EMAST発生条件とした。

また、今回の検討により、細胞株という均一な細胞集団でさえも、EMASTとなる細胞の割合は極めて低いことも明らかとなった(SW480, 10%; SW620, 7.5%; 表1)。これは、腫瘍で転移性となる癌細胞はごく一部であるという臨床での観察事象に合致すると考えられた。同時に、EMASTに関連した悪性化因子を特定するためには、解析対象をEMAST細胞もしくはEMAST発生環境下で悪

性化した細胞に絞る必要性も浮き彫りとした。

表1. 低酸素培養によるEMASTの誘導

「異常を示した数=0」はその配列が「安定」であることを意味する。一方、網掛の部分は「不安定」を意味する。

細胞株	O <sub>2</sub> %	調べたクローン数	異常を示した数		p値
			1塩基リピート	4塩基リピート	
SW480	21	40	0	0	0.06
	0.1	40	0	4	
SW620	21	61	0	0	0.03
	0.1	80	0	6	

##### (2) EMAST発生条件下で発現の変化する遺伝子の検索

DNAマイクロアレイ解析を用いて、EMAST発生環境下で発現が変化する遺伝子群の検索を行った。ヒト大腸癌細胞株SW620を0.1% (低酸素) と21%の酸素濃度(通常酸素) とで7日間培養しtotal RNAを抽出した。これら検体の遺伝子発現をAgilent社のGene Expression Microarray (SuprePrint G3 Human 8x60K v2) を用いて解析した。変動倍率の閾値を2としたとき、通常酸素下に比べて低酸素下では1912遺伝子の発現が上昇し、2253遺伝子が低下した。Gene Sets Enrichment Analysisを用いて、これら遺伝子を包含する機能パスウェイを調べるとほとんどが低酸素による変動が報告されているもので、EMAST大腸癌細胞に特異的と見られるパスウェイは見いだせなかった。一方、上昇あるいは低下した倍率により順位付けた個々の遺伝子に着目すると、低酸素や悪性腫瘍でこれまで報告のない遺伝子が複数見いだされた。ケラチンならびにその関連タンパク質やWntシグナリングに抑制的に働くタンパク質、また、インテグリンなど細胞接着に働くタンパク質をコードする遺伝子は既知の役割から悪性化への関与が容易に類推できないことや腫瘍での関与が知られていないことから興味深い候補とした。

##### (3) 悪性化関連因子の絞り込み

(2) の遺伝子発現解析により見いだされた候補遺伝子の産物のうち、特異性や検出感度の高い抗体が入手できるタンパク質(integrin  $\alpha$ 5、 $\beta$ 4、caveolin-1、2、3、keratin associated protein 3-1) を優先して大腸癌検体での発現を検討したところ、調べた症例の2例でcaveolin-1 (CAV1) の発現が認められた。発現陽性細胞自体は腫瘍細胞で

はなかったものの、局在は腫瘍部であった。また、視野中の陽性細胞の頻度が極めて低かった。これらの結果は、CAVIが間質細胞による腫瘍細胞の増殖の支持に働いている可能性を示唆したが、一方で、悪性化に対する役割を明らかとするためには検討対象とする症例を選別するなどの工夫が必要なことも浮上した。EMAST大腸癌の悪性化に対するCAVIの役割を知るため、腫瘍の悪性度を反映するin vitro測定系の利用を含めた評価も検討課題として残された。

(4) EMAST発生に必要な癌細胞の遺伝的要素についての検討

(3)と並行して、EMASTを示す腫瘍が高頻度で悪性化する理由を明らかとするために、EMAST発生に必要な癌細胞の遺伝的背景についても検討した。特に、半数以上の大腸癌で異常が認められるp53タンパク質の機能の有無とEMAST発生との関係を調べた。その結果、たとえ低酸素下でも野生型p53の発現があればEMASTではなくMSI-Hとなることを示し、低酸素性EMAST誘導にはp53の機能欠損が不可欠要素であることも明らかにした(表2)。p53異常がEMAST発生要因の1つであることについては、臨床検体を用いたこれまでの検討からも関連性が示唆されていた。本研究課題で、大腸癌細胞株でEMASTを誘導する培養条件を確立できたことにより、p53の変異がEMAST発生の必要条件であることを実験的に示すことができた。

**表2. p53の有無と1塩基リピートの安定性**

SW620は低酸素下でも安定だったが、野生型p53を発現するSW620-p53では不安定な細胞(MSI-Hの細胞)が出現した。

細胞株	野生型p53 の発現	1塩基リピートが異常を示した数/調べた数	
		21% O <sub>2</sub>	0.1% O <sub>2</sub>
SW620	無	0/86	0/136
SW620-p53	有	0/27	2/36

(調べた1塩基リピート配列: BAT26)

## 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6件)

① 有田通恒、Licochalcone A inhibits hypoxic and normoxic growth via different proliferative pathways in a human neuroblastoma cell line SK-N-SH、

第57回日本小児血液・がん学会学術集会、2015年11月27日(甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市))

② 有田通恒、甘草由来成分リコカルコンAの抗がん活性: TrkB-JNK シグナリング阻害を介した神経芽腫細胞増殖抑制、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月08日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

③ 有田通恒、Variable hypoxic characteristics of un-amplified neuroblastoma derived SK-N-SH cell lines obtained from different sources、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、2014年11月28日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

④ 有田通恒、Screening of key genes for EMAST-related malignancy in colorectal cancer、第73回日本癌学会学術総会、2014年09月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑤ 有田通恒、N-myc非増幅神経芽腫細胞が示すMAPK経路活性化を介した低酸素性N-myc発現増加と増殖亢進、第55回日本小児血液・がん学会学術集会、2013年11月29日、ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)

⑥ Michitsune Arita、Generation of EMAST in a colorectal cancer cell line under hypoxic condition、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月03日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 制がん剤

発明者: 逸見仁道、有田 通恒

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2014-146085

出願年月日: 2014年08月01日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

有田 通恒 (ARITA, Michitsune)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号: 80307719

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

船橋 公彦 (FUNAHASHI, Kiminiko)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90297698