

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460973

研究課題名(和文)大腸癌の浸潤・転移におけるCdh1の役割の解明

研究課題名(英文)The role of Cdh1 in colorectal cancer invasion and metastasis

研究代表者

直江 秀昭(Naoe, Hideaki)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30599246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な大腸癌細胞株であるCaco2、HCT116においてsiRNAによるCdh1の抑制を行った。これらの細胞とコントロール細胞からRNAを抽出し、cDNAアレイ解析を行った結果、1.5倍以上発現に変化が認められた4891遺伝子が抽出された。さらにGSEAを用いた解析により、有意に変動した遺伝子候補を17個同定した。その中でも変化の大きかった遺伝子群として、Wntシグナル経路が抽出された。Cdh1が大腸癌においてWntシグナル経路を介して細胞骨格、細胞運動を調節する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cdh1 was suppressed by siRNA in representative two colon cancer cell line, Caco2 and HCT116. RNA was extracted from these cells and control cells respectively. cDNA array analysis was performed and 4891 genes which expression were changed more than one and a half times were extracted. Furthermore, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) enables to detect 17 candidates genes which expression were significantly changed by Cdh1 siRNA. Among these 17 genes, Wnt signaling was extracted as especially changed gene set. From these results, it was suggested that Cdh1 had a putative roll for control the cell cytoskeleton and motility via Wnt signal pathway in colon cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：Wnt

1. 研究開始当初の背景

(1) ①細胞分裂開始の主たるエンジンが Cyclin B/Cdk1 複合体によるリン酸化シグナルである。一方で、分裂期からの脱出にはユビキチンリガーゼである Anaphase promoting complex/cyclosome (APC) による Cyclin B の分解が重要な調節起点となっている (King et al. Cell 1995, Sudakin et al. Cell 1995)。②本研究で我々が着目した Cdh1 は、分裂期 M 期～G1 期の終わりにかけて APC 活性を維持する活性化因子である (Peters et al. Mol Cell 2002)。③APCCdh1 は染色体の安定性維持に必要なため、Cdh1 の調節不良(dysregulation)は未分化で、遺伝的に不安定な細胞の分裂と増殖を引き起こし、結果として発癌へとつながる (Wasch et al. Oncogene 2010)。

(2) 申請者らはこのような細胞周期の調節に加えて、Cdh1 が代表的な RhoGAP である p190RhoGAP の分解を介して Rho を活性化し、その結果、細胞骨格と細胞運動を制御するという新たな生理的機能を明らかにした (Naoe et al. Mol Cell Biol. 2010)。

(3) 我々は消化器癌における Cdh1 の機能解析を行う中で、①ヒト肝癌組織で、非癌部と比較して癌部において Cdh1 がより強く発現していること、②大腸癌細胞株で siRNA により Cdh1 の発現を抑制すると、アクチンフィラメントが減弱した特徴的な形態の変化が現れることを明らかにした。③さらに Cdh1 の発現を抑制した大腸癌細胞株では、E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現上昇といった上皮間葉転換 (EMT) に特徴的なタンパク質の発現変化が認められた。

2. 研究の目的

大腸癌細胞株を用いて Cdh1 の機能を *in vitro* で解析した後に、動物実験、臨床サンプルから得た結果と統合し、大腸癌の浸潤・転移における Cdh1 の役割を明らかにする。① Cdh1 発現を抑制した細胞より抽出した遺伝子を基に RNA、DNA アレイ解析を行い、Cdh1 の変化とともに変動する分子群を絞り込み、Cdh1 を含む EMT 関連ネットワークを明らかにする。② Cdh1 抑制細胞の抽出物で、2次元電気泳動によるプロテオミクス解析を行うことで、EMT に関連したタンパク質の発現や翻訳後修飾について評価する。③ 実際に Cdh1 が EMT に関与しているのかどうか、Cdh1 抑制細胞を用いた *in vivo* の実験系で確認するとともに、動物モデルでも同様に検討する。④大腸癌原発巣、転移巣の臨床サンプルを部位別に切り分けて抽出物を調整し、癌の部位に応じた Cdh1 の発現のばらつきを評価する。その結果を臨床病期と関連付けることで、大腸癌の浸潤・転移への Cdh1 の関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) ①大腸癌細胞株に siRNA を transfection

し Cdh1 の発現を抑制する。この細胞より抽出したサンプルで SDS-PAGE を行い、EMT に関連して発現が変化することが知られているタンパク質 (E-cadherin, N-cadherin, Cytokeratin, Vimentin 等) の発現の変化を抗体で検出する。②また、同様にして抽出した RNA より RT-PCR を行い、EMT 関連転写因子 (Smad, Snail, Slug, Twist, Zeb1/Zeb2 等) の発現変化について比較検討する。

(2) このように確立した実験系を用いて上記 1) の Cdh1 を抑制した細胞の lysate から、タンパク質発現の網羅的な解析を通して上皮系マーカー、間葉系マーカー、さらに細胞間接着関連分子の変化を総合的に評価することで、EMT に関連した Cdh1 シグナル経路を明らかにする。

(3) 細胞運動を評価する実験系として確立されている Wound healing assay と Transwell migration (Boyden chamber) assay を行い、Cdh1 を抑制した大腸癌細胞株の 2 次元、3 次元運動能の変化を解析する。

(4) 創傷治癒過程では、癌の浸潤で見られる EMT と類似の現象が起きるとされている (Thiery et al. Cell 2009)。そこでマウス創傷治癒の実験系を用いて、生体における EMT 時の Cdh1 の機能を解析する。

(5) 原発癌は不均一なものであり、特にその先進部において EMT が顕著に見られる場合もあることから (Weber et al, Histochem Cell Biol 2008)、①ヒトの大腸癌手術サンプルからパラフィン切片を切り出し、Laser micro dissection 法により癌の先進部とそれ以外の部位を切り分ける。それぞれの部位より抽出したタンパク質で Cdh1 の発現を解析することで、癌内部に存在する可能性の高い Cdh1 発現の heterogeneity を明らかにし、EMT への関与に迫る。②また、手術サンプルの免疫染色を行い、大腸癌の病期 (stage I ~IV) に応じた Cdh1 の発現ステータスを免疫組織学的に解析し、Cdh1 発現と大腸癌の病期や背景因子、原発巣と転移巣との関連を評価する。

(6) 最後に、一連の *in vitro* 実験、アレイ解析、プロテオミクス解析、動物実験、臨床検体実験より得られた結果を統合して、EMT の一端を担う Cdh1 を含んだ分子機構を明らかにする。その結果を応用して大腸癌の浸潤・転移を抑制する包括的な治療法を構築する。

4. 研究成果

(1) 代表的な大腸癌細胞株である Caco2、HCT116 において siRNA による Cdh1 の抑制を行った。これらの細胞とコントロール細胞から RNA を抽出し、cDNA アレイ解析を行った結果、1.5 倍以上発現に変化が認められた 4891 遺伝子が抽出された。さらに GSEA を用いた解析により、有意に変動した遺伝子候補を 17 個同定した。その中でも変化の大

きかった遺伝子群として、Wnt シグナル経路が抽出された (図 1)。Cdh1 が大腸癌において Wnt シグナル経路を介して細胞骨格、細胞運動を調節する可能性が示唆された。

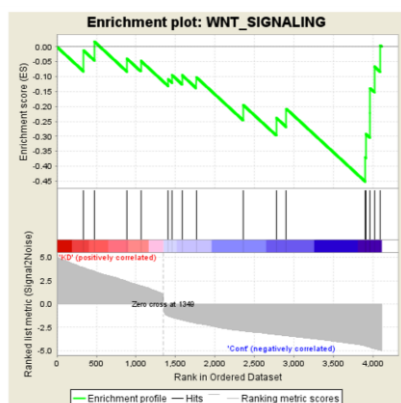


図 1. Cdh1 抑制により Wnt シグナル経路に有意な変化を認めた。

上皮性の癌細胞が浸潤・転移を引き起こす機序として、細胞が集団で移動する現象が知られている(Gaggioli et al. Nat Cell Biol 2007)。一方、Wnt シグナル経路には、 β -カテニンとは独立して、主に細胞骨格や極性、細胞運動を制御する β -カテニン非依存性経路が存在する。この経路では、低分子量 G タンパク質の Rho や Rac を活性化してこの細胞集団の移動を制御している(Kikuchi et al. Cancer Sci. 2008)。

(2) Cdh1 自身は分解とリン酸化による制御を受けている。そこで、今後の展望として、我々が有する Cdh1 のリン酸化部位変異遺伝子改変マウス (承認番号 A27-036) を用いて、Wnt シグナル経路の変化に焦点をあて、創傷治癒実験 (浸潤) や発生段階でダイナミックな細胞の移動を示す胎児の解析を行う。

(3) また転移性ヒト大腸癌切除標本を用いて、大腸癌の原発巣中心部、原発巣辺縁 (浸潤部)、転移巣において Wnt、Cdh1 の発現変化を確認する。変化のパターンから、Wnt-Cdh1 axis が大腸癌転移浸潤に果たす役割を明らかにする。

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 9 件)

1. Fukubayashi, K, Tanaka M, Izumi K, Watanabe T, Fujie S, Kawasaki T, Yoshimaru Y, Tateyama M, Setoyama H, Naoe H, Kikuchi K, Sasaki Y. Evaluation of sorafenib treatment and hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma: a comparative study using the propensity score matching method. Cancer Medicine 4: 1214-1223, 2015.

(査読有)

2. Tokunaga R, Naoe H (14 番目), Sasaki Y (18 番目), Baba H. 他 16 名 Carbohydrate antigen 19-9 is a useful prognosis marker in esophagogastric junction adenocarcinoma. Cancer Medicine 4:1659-1966, 2015. (査読有)
3. Tsutsumi H, Hara K, Mizuno N, Hijioka S, Imaoka H, Tajika M, Tanaka T, Ishihara M, Yoshimura K, Shimizu Y, Niwa Y, Sasaki Y and Yamao K. Clinical impact of preoperative endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic ductal adenocarcinoma. Endoscopic Ultrasound 3:94-100,2015. (査読有)
4. Nagaoka K, Hino S, Sakamoto A, Anan K, Takase R, Umehara T, Yokoyama S, Sasaki Y and Nakao M. Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. Molecular & Cellular Biology 35:1068-1080, 2015. (査読有)
5. Setoyama H, Tanaka M, Naoe H, Watanabe T, Sasaki Y. Oral branched-chain amino acid granules improve structure and function of human serum albumin in cirrhotic patients. J Gastroenterol. 52(6):754-765, 2016. (査読有)
6. Gushima R, Yao T, Kurisaki-Arakawa A, Hara K, Hayashi T, Fukumura Y, Saito T, Arakawa A, Yao K, Sasaki Y. Expression of adipophilin in gastric epithelial neoplasia is associated with intestinal differentiation and discriminates between adenoma and adenocarcinoma. Virchows Arch. 468:169-177, 2016. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 直江秀昭、田中基彦、佐々木裕 肝細胞癌の治療抵抗性を担う分子の抽出と解析. 第 51 回日本肝臓学会総会 平成 27 年 5 月 21 日 熊本
2. Naoe H, Hoshida Y, Yokote S, Fujie S, Watanabe T, Nagaoka K, Yamazoe T, Setoyama H, Tanaka M, Fujimoto J, Araki N and Sasaki Y. Integrated proteomics analyses identified a phosphoprotein relevant to apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma. AASLD, The Liver Meeting 2015 平成 27 年 11 月 14 日 San Francisco (USA)
3. Naoe H, Hoshida Y, Yokote S, Fujie S, Yamazoe T, Setoyama H, Nagaoka K,

Watanabe T, Tanaka M, Fujimoto J,
Araki N and Sasaki Y. Proteomics
analyses identified a phosphoprotein
relevant to apoptosis resistance in
human hepatoma. Asian Pacific
Association for the Study of the Liver
(APASL) 平成 28 年 2 月 22 日 東京

4. 直江秀昭、田中基彦、佐々木裕
肝癌の治療抵抗性を担う責任分子の同定
と機能解析. 第 52 回日本肝臓学会総会
平成 28 年 5 月 19 日 千葉

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 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〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/gastro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

直江 秀昭 (NAOE HIDEAKI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30599246

(2)研究分担者

佐々木 裕 (SASAKI YUTAKA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70235282

(3)研究分担者

渡邊 丈久 (WATANABE TAKEHISA)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20634843

(4)研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIROU)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

(5)連携研究者

荒木 令江 (ARAKI NORIE)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授