

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462022

研究課題名(和文) 新規癌抑制遺伝子候補SVS-1の癌抑制のメカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Biological functions of a novel tumor suppressor gene candidate SVS-1 and its application to therapy for colorectal cancer

研究代表者

隈元 謙介 (Kumamoto, Kensuke)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60457778

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)：SUSD2 遺伝子はわれわれが世界に先駆けて発見した新規癌抑制遺伝子の1つである。SUSD2はヒトの種々の正常組織で発現しているが、大腸癌を含む種々の癌で発現が低下している。本研究では、大腸癌細胞を用いてin vitroにおけるSUSD2の生物学的機能を解析した。大腸癌培養細胞に誘導的にSUSD2を発現させると、増殖能、遊走能、浸潤能すべてが有意に低下した。さらに癌幹細胞の性質の一つである3次元培養におけるspheroid形成能の低下も確認した。SUSD2は、癌細胞の細胞増殖を抑制し、運動能を支配する遺伝子群の発現を抑制し、癌の種々の悪性形質を抑制する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The SUSD2 gene is one of the novel tumor suppressor genes that we first discovered in the world. SUSD2 expression is decreased in various cancers including colon cancer compared to normal tissues. In this study, the biological function of SUSD2 was analyzed by in vitro experiments using colon cancer cells. When SUSD2 was highly expressed in cultured cells of colon cancer, all the ability of proliferation, migration and invasion were significantly reduced. Furthermore, we also confirmed a decrease in spheroid forming ability in three dimensional culture, which is one of the properties of cancer stem cells. SUSD2 inhibited the cell proliferation of cancer cells, inhibited the expression of a group of genes governing motor ability, and revealed that it suppresses various malignant traits of cancer.

研究分野：がん関連遺伝子

キーワード：SUSD2 大腸癌

1) 研究開始当初の背景

近年、本邦における大腸癌の罹患率・死亡率が増加しており、2016年度において死亡者数は男性で肺癌、胃癌に次いで多く、27,026人、女性では癌死のトップであり、23,073人が亡くなっており、年間5万人以上が大腸癌で死亡している事になる。その数は年々増加を続けている(1)。

近年、技術革新が進み、個々の患者の腫瘍の遺伝子DNAの塩基配列を決定し、その中から「Driver Gene」を推定してその個人に最適な分子標的治療薬を選択・投与するという「Precision Medicine (精密癌医療)」が進められている。また免疫チェックポイント阻害剤など新しい治療薬・治療法が登場し、今後の癌の治療成績の向上が期待される。

さて、癌治療を困難にしている大きな要因の一つは転移や再発を繰り返す薬剤耐性癌細胞の出現である。近年の研究によれば、癌の腫瘍はヘテロな細胞集団からなっており、癌の再発・転移を担う細胞は腫瘍中にある「癌幹細胞、Cancer Stem Cell, CSC」であると考えられている(2)。大腸癌においてもCSCが存在する事が示されており(3)、CSCを標的とする新たな治療薬の開発が求められている。

われわれは、先に新規な癌抑制遺伝子 *Susd2/SUSD2* を発見し報告した(4, 5)。*SUSD2* 遺伝子はヒト 22番染色体長腕 22q11-q12 に存在する unique gene であり、ヒトやマウスの臓器・組織に広く発現しており、また殆どの全ての動物、植物、昆虫を含む全ての真核生物が保有する遺伝子であり、重要な機能を担っている遺伝子である。*Susd2* は、Somatomedin B, AMOP, von Willebrand factor type D および Sushi (SCR repeat) など他の種々の接着性タンパクに共通なドメインを有している(図1)。

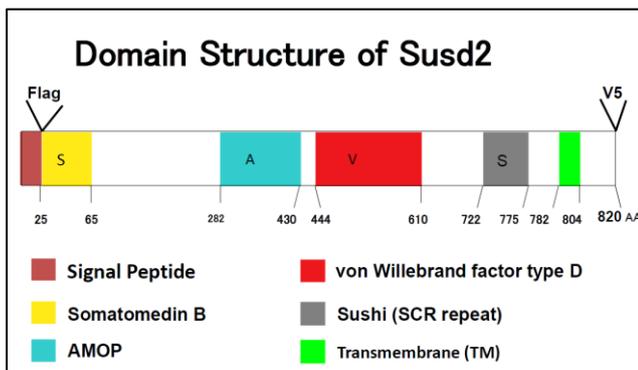


図1: *Susd2* のタンパク質構造 *Susd2* は Somatomedin B, AMOP, von Willebrand factor type D および Sushi (SCR repeat) など他の種々の接着性タンパクに共通なドメインを持っている。

一方、われわれは大腸癌において *SUSD2* の発現が低下しており、発現低下と癌組織の異型性、リンパ管浸潤性とは負の相関がある事、*SUSD2* の発現低下と患者の予後の間にも負の相関がある事を示した(6, 7)。また後に他の研究者からも卵巣癌(8)、肝細胞癌(9)、肺非小細胞癌(10)、腎細胞癌(11)などいくつかの癌組織において *SUSD2* 遺伝子の発現低下が観察され、その発現低下と予後不良との相関関係がある事が報告された。

2. 研究の目的

上記の癌抑制遺伝子 *Susd2/SUSD* がどのようなメカニズムで大腸癌を抑制するかを主として大腸癌の培養細胞を用いた解析により明らかにする事、その知見を大腸癌の治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

われわれは主として大腸癌細胞株 HCT116 を用いて、*Susd2/SUSD2* 遺伝子がどのようなメカニズムで以下のような癌細胞の種々の癌形質を抑制するかを検討した。

1) *Susd2* の誘導発現と増殖抑制

Susd2 の誘導発現系ベクターを作成し、大腸癌培養細胞株に遺伝子導入する。発現誘導時に細胞増殖の変化を観察する。

2) *Susd2* による細胞運動の抑制

細胞の運動能を「Wound Healing 法」により測定する。また、細胞の増殖因子、シグナル伝達因子、直接運動機能に関わる因子等直接あるいは間接的に運動能に関わる 84 遺伝子の発現を PCR Array により調べる。

3) *SUSD2* による大腸癌癌幹細胞の抑制

SUSD2 を発現した時に Sphere を形成するかどうかを検討する。

4) *SUSD2* 発現による大腸癌細胞の抗癌剤感受性化

Susd2 発現細胞 (HCT116/*Susd*, B5-4) を用いて CPT (Camptothecin, カンプトテシン)、CDDP (Cisplatin, シスプラチン) と 5-FU (5-fluorouracil, 5-フルオロウラシル) を種々の濃度で処理した細胞の生存率を調べる。

5) *Susd2* 発現細胞の造腫瘍性の検討

Susd2 発現細胞をヌードマウス皮下に移植し、

30 日目に腫瘍の形成の有無を調べる。

4. 研究成果

1) Susd2 の誘導発現と増殖抑制

SUSD2 を発現していない HCT116 細胞に構成的に Susd2 を発現する plasmid を導入し、発現細胞を取得する試みを行ったが、この試みは全て失敗に終わった。これは Susd2 が発現すると癌細胞は増殖できなくなるために、構成的に Susd2 を発現するクローンを取得する事ができない事を示唆する。そこで図 2 に示す Susd2 の誘導発現系 (Two Step Transcription Amplification, TSTA 法) (12) を構築した (HCT116/Susd2、B5-4)。この系によって予め Susd2 遺伝子について cryptic な細胞を増やしておき、後に、任意な時に任意な量を発現誘導し、細胞の挙動を調べる事が可能となる。B5-4 細胞に AdVP2 を感染し Susd2 を細胞内で誘導発現させた時、図 3 に示すように AdVP2 の感染価 moi を増加すると Susd2 の発現量は増加した (図左段の 3 コマ、右上段; Susd2 誘導発現細胞の共焦点顕微鏡像。Susd2 は plasma membrane に発現している。右下段; Western blot 像)。図 4 に HCT116/Susd2、B5-4 細胞に AdVP2 を感染した時にその moi に依存して増殖は停止した。この増殖抑制はヒト線維肉腫細胞 HT1080/Susd2 でも同様であった。対照細胞である HT1080/Luc および、HCT116/Luc は AdVP2 感染の影響は受けなかった。これは大腸癌培養細胞株 HCT116 細胞では、Susd2 が細胞内に発現されると増殖を停止してしまう事を示している。「Susd2 が発現されると細胞は増殖できない」という上記の推論は正しかった事になる。

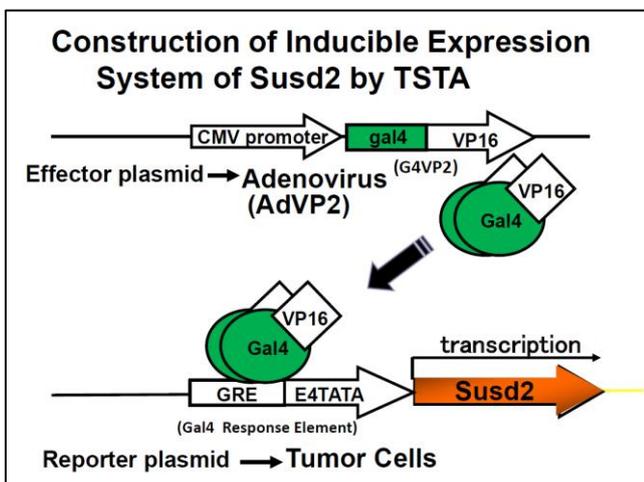


図 2 : Susd2 の TSTA 法による誘導発現系の構築 酵母の転写因子 Gal4 の promoter を有する vector の下流に Susd2 の cDNA を挿入し

た reporter plasmid を誘導発現しようとする癌細胞 (ex 大腸癌細胞 HCT116) に導入し、予め誘導発現細胞 HCT116/Susd2 を樹立する。この HCT116/Susd2 細胞に Gal4 を発現する組換え Adenovirus (AdVP2) を感性させると細胞内に転写因子 Gal4VP2 が発現され、続いて予め導入されていた Susd2 の発現が開始される。これが TSTA 法 (Two Step Transcription Amplification) である。TSTA 法によって、任意の時間に任意の量の Susd2 を目的の細胞に発現させる事ができる。

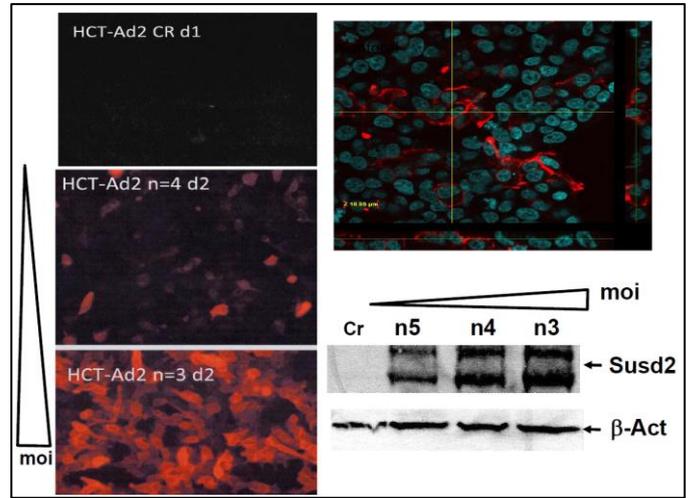


図 3 : AdVP2 感染 HCT116/Susd2 細胞における Susd2 タンパク誘導発現の免疫蛍光法 (左 3 コマ)、共焦点レーザー顕微鏡 (右上)、Western blot 法 (右下) による検出

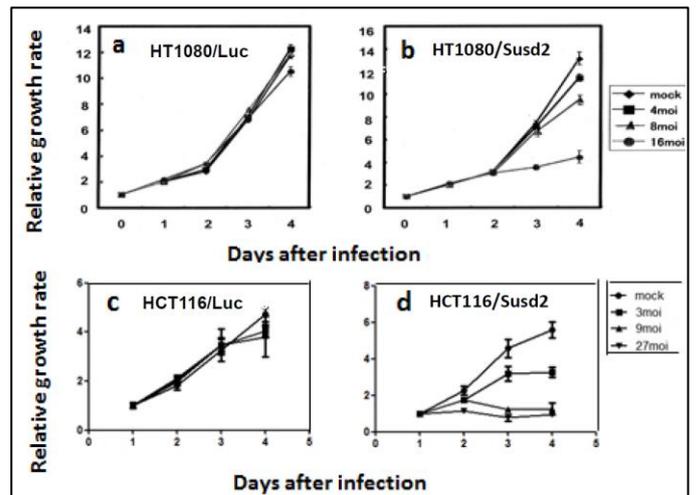


図 4 : HT1080/Susd2 (b), HCT116/Susd2 (d) 及びそれぞれの対照細胞 HT1080/Luc (a), HCT116/Luc (c) の AdVP2 感染時の Susd2 による細胞増殖の阻害

2) Susd2 による細胞運動の抑制

細胞の運動能を「Wound Healing 法」により測定した。即ち、単層培養 (monolayer) された B5-4 細胞に AdVP2 を感染し 1 日後に単層細胞に直線的な傷をつける。更に 1 日後に傷がどれだけ遊走細胞によって埋められるかを撮影し、Susd2 発現細胞が 24 時間の間に移動した距離を計測し、Susd2 による運動能の抑制を調べた (図 5)。図 6 に示すように対照細胞 HCT116/Luc (A5) は AdVP2 の感染価 moi を増加しても全く遊走能は低下せず、Susd2 発現細胞は moi が高

くなると運動能は約 1/2 に低下した。またこの時に、細胞の増殖因子、シグナル伝達因子、直接運動機能に関わる因子等直接あるいは間接的に運動能に関わる 84 遺伝子の発現を PCR Array により調べた。その結果、図 7 に示すように、多くの遺伝子が発現上昇（赤の対角線より上側の点）あるいは変化がなかった（2本の赤の対角線の中の点）のに対して、Integrin beta1 (ITGB1)(形質膜上で integrin alpha, ITGA, と複合体を形成し細胞外 Matrix (ECM)タンパクと結合し増殖シグナルを細胞内に伝える)、Caveolin 1 (CAV1) (RAS/ERK 経路を負に制御し、増殖を制御する)、Myosin 9 (MYO9) (Actin と結合し弾性繊維 Actomyosin を形成する)や RAC2(細胞内 Actomyosin 収縮系にシグナルを伝える伝達因子)などの発現が数分の 1 ないし数十分の 1 に低下していた。このような遺伝子発現の変化は細胞の運動性が低下した事を良く説明している。

図 6 : AdVP2 感染 HCT116/Susd2 細胞の誘導 Susd2 による細胞運動の阻害。図 5 における細胞の移動距離を数値化した図

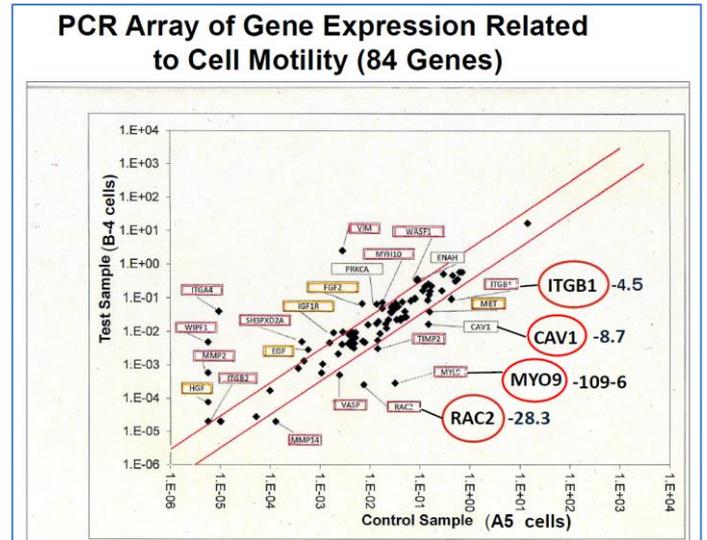


図 7 : 図 5, 6 に示した細胞運動に関わる 84 遺伝子発現の PCR Array による定量化。HCT116/Susd2 細胞の AdVP2 感染 0 time (Control Sample)と 24 時間後 (Test Sample)の運動関連 84 遺伝子の発現の 0 time における発現との相対比。

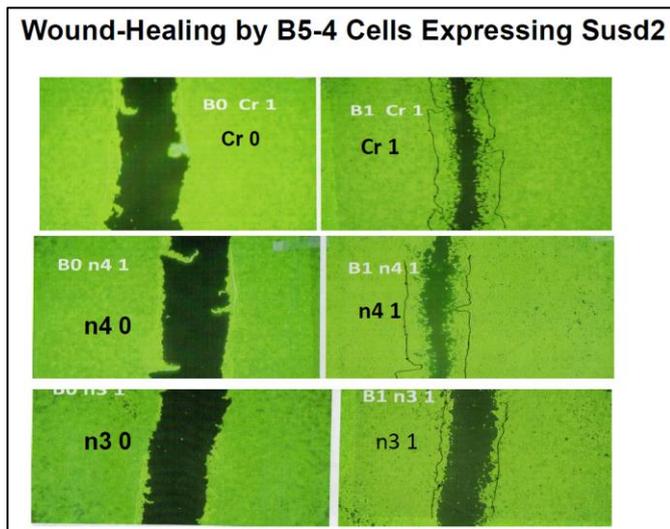
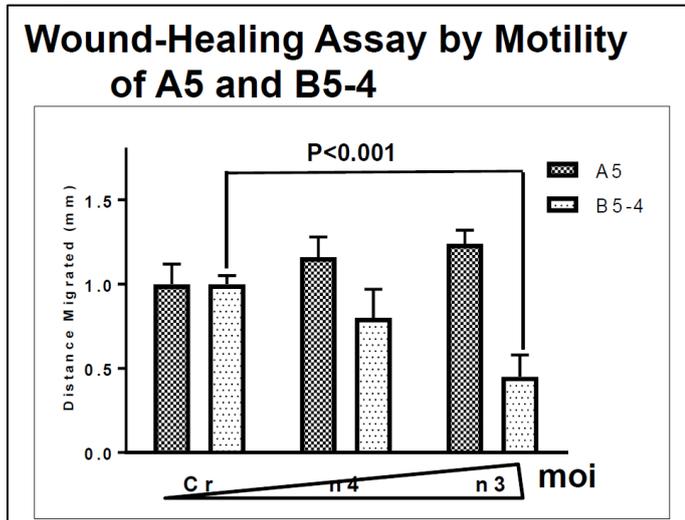


図 5 : AdVP2 感染 HCT116/Susd2 細胞の誘導 Susd2 による細胞運動の阻害。HCT116/Susd2 細胞の AdVP2 感染 (低 moi n4、高 moi n3) 0 time (左 3 段)および 24 時間後 (右 3 段) の細胞の移動を Wound-healing 法により測定



3) SUSD2 による大腸癌癌幹細胞の抑制

癌患者の死亡の大半の原因は抗癌剤に抵抗性な「癌幹細胞」が転移や再発を起こすため、とされている。それでは癌幹細胞に対して SUSD2 はどのように作用するのだろうか？ SUSD2 がこの癌幹細胞にも抑制作用を示すとすれば、SUSD2 タンパクあるいは *SUSD2* 遺伝子の癌治療への応用に道が開かれる事になる。癌幹細胞は ALDH (Aldehyde Dehydrogenase), CD44v, CD133 等のタンパク抗原が特に高く発現している事が知られている。また生物学的な性質として 3次元 (3D) 浮遊培養において Sphere といわれる球状のコロニーを形成する。そこで SUSD2 を発現した時に Sphere を形成するか否かを検討した。図 8 に示すように、通常どおり 2D 培養した HCT116 細胞に SUSD2 を発現する組換え Adenovirus (AdSUSD2) を感染させた 1 日目 D1 と 2 日目 D2 に細胞 (図左側 3 段上から D0, D1, D2) を浮遊培養に移した。非感染細胞 (D0) は中段上部図のように直径 100 μ m 以上の Sphere を形成したが、感染 1 日目には細胞の増殖は対照細胞と同様に続いている (図左最上部) が、Sphere の形成能はすでに D2 と同様に著しく抑制されていた。

このように SUSD2 は大腸癌細胞 HCT116 の幹細胞の増殖を抑制する事が明らかとなった。従って SUSD2 は大腸癌の転移や再発を抑制する事が期待される。

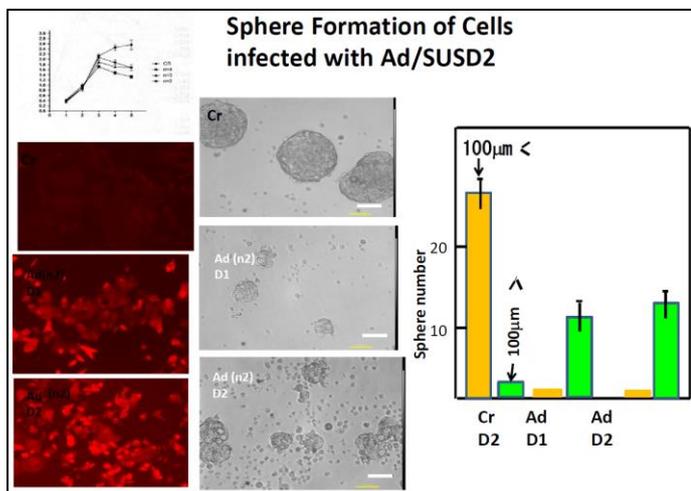


図 8: HCT116/Susd2 細胞の AdVP2 非感染細胞(Cr)および感染 1 日および 2 日後の細胞の 3 次元培養による sphere 形成. 左段上部: 細胞増殖、左段下部: 免疫蛍光像、中段 3 コマ: 3 次元培養 0, 1, 2 日目の細胞の sphere 形成、右段: AVP2 感染 0, 1, 2 日目に形成された 100 μm 以上と 100 μm 以下の sphere 数

4) SUSD2 発現による大腸癌細胞の抗癌剤感受性化

癌幹細胞は抗癌剤に対して耐性である、と言われていいる。そこで Susd2 非発現細胞 (HCT116/Luc, A5) と発現細胞 (HCT116/Susd, B5-4) を通常使用されている 3 種の抗癌剤、CPT (Camptothecin, カンプトテシン)、CDDP (Cisplatin, シスプラチン) と 5-FU (5-fluorouracil, 5-フルオロウラシル) を種々の濃度で処理した細胞の生存率を調べた。図 9 に示すように、非発現細胞である A5 細胞ではいずれの薬剤に対しても、感受性はほとんど変わらなかった。しかし発現細胞である B5-4 細胞では CPT と 5-FU に対しては、あまり変化はなかったが、CDDP に対しては 2 倍の感受性を示した。これは Susd2 によって幹細胞が選択的に排除され残った細胞集団は CDDP に対してより感受性になっている事を示すものと思われる。

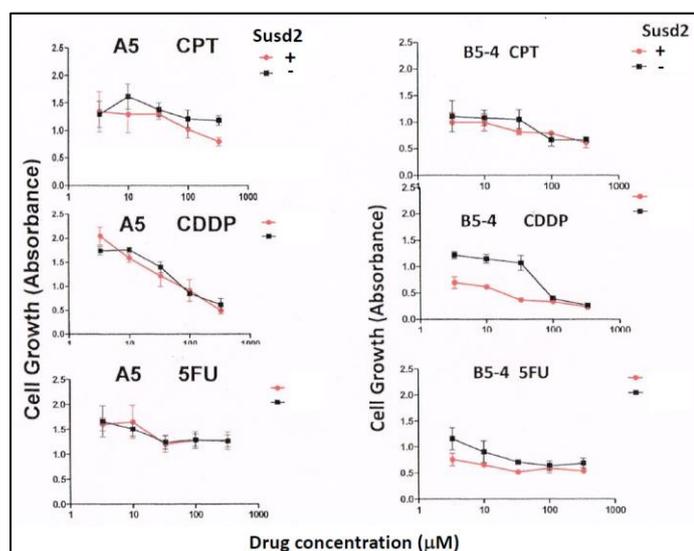


図 9: Susd2 非発現細胞 A5 (黒線) と発現細胞 B5-4 (赤線) の抗癌剤 CPT, CDDP および 5-FU に対する感受性の比較

5) Susd2 発現細胞は nude mouse において造腫瘍性を失う

ヒト子宮頸癌細胞 HeLa は免疫抑制された nude mouse (*nu/nu*) の皮下に腫瘍を形成する (表 1)。しかし HeLa/Susd2 および HeLa/Susd2vWD (SUSD2 遺伝子の vWD domain の変異体) 細胞は AdVP2 の感染によって Susd2 あるいは vWD 変異体の発現細胞は腫瘍をつくれなかった (腫瘍を作ったとしても米粒大のものしかできず)。

Tumor cell	Mock	AdVP2
HeLa	6/6	6/6
HeLa/Susd2	6/6	3/6*
HeLa/Susd2vWD	6/6	1/6*

*grain-sized tumor

表 1: Susd2 および Susd2vWD を発現する子宮頸癌細胞 HeLa のヌードマウス皮下における腫瘍形成能の消失
それぞれの細胞に AdVP2 を感染させ、2 日後に Susd2 および Susd2vWD の発現細胞をヌードマウス皮下に移植し、30 日目に腫瘍の形成の有無を調べる。非感染細胞は全て腫瘍を形成、しかし感染細胞のうち親細胞 HeLa は非感染細胞と同様に腫瘍形成、2 種の Susd2、SUSD2vWD 発現細胞では殆ど腫瘍の形成は認められなかった。

上記の研究成果に示したように Susd2/SUSD2 タンパクを大腸癌細胞に発現させる事によって、癌細胞の増殖や運動が抑制され、癌幹細胞が優先的に除去され、それによって抗癌剤に感受性になる事を示した。これ等の事実から *SUSD2/SUSD2* 遺伝子は癌抑制遺伝子と考えられる。特に (2) に示した Integrin、Caveolin、Myosin、RAC2 など細胞運動を司る中心的な遺伝子の働きが抑制される事は癌 (幹) 細胞の浸潤能、転移能を抑制する事に繋がり、癌の治癒が期待される。今後 *SUSD2/SUSD2* 遺伝子は他大腸癌の遺伝子治療の素材として利用される可能性がある。

<引用文献>

- 「がんの統計 '17」(公) がん研究振興財団
- Dick JE: Stem cell concepts renew cancer research. Blood 112: 4793-4809, 2008.

3. Du L et al: CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. Clin. Cancer Res. 14: 6751-6760, 2008.
4. Sugahara T et al : Isolation of a novel mouse gene, mSVS-1/SUSD2, reversing tumorigenic phenotypes of cancer cells in vitro. Cancer Science 98(6): 900-908, 2007,
5. Sugahara T et al: vonWillebrand factor D domain mutant of SVS-1/SUSD2, vWD(m), induces apoptosis in HeLa cells. Cancer Science 98(6): 909-915, 2007,
6. 安藤俊夫、竹之下誠一、隈元謙介: Candidate tumor suppressor gene *Susd2* inhibits growth of cancer cells by preferentially targeting cancer stem cells. 新規癌抑制遺伝子候補 *Susd2* は癌幹細胞を標的として細胞の増殖を阻害する, 第 75 回日本癌学会学術総会 (平成 28 年, 横浜)
7. 安藤俊夫、隈元謙介、大原正志: *Susd2/SUSD2*, a tumor suppressor gene and a seed for antitumor drug development. 癌抑制遺伝子 *Susd2/SUSD2* の創薬 seed としての可能性, 第 76 回日本癌学会学術総会 (平成 29 年、横浜)
8. Sheets JN et al: SUSD2 expression in high-grade serous ovarian cancer correlates with increased patient survival and defective mesothelial clearance. Oncogenesis 2016 Oct 24; 5(10):e264.
9. Liu XR et al: Decreased expression of Sushi Domain Containing 2 correlates to progressive features in patients with hepatocellular carcinoma. 2016 Cancer Cell Int. 2016; 16: 15.
10. Cai C et al: Reduced expression of sushi domain containing 2 is associated with progression of non-small cell lung cancer. Oncol Lett. 2015 Dec; 10(6): 3619-3624.
11. Cheng Y et al: SUSD2 is frequently downregulated and functions as a tumor suppressor in RCC and lung cancer. Tumor Biol. 2016 Jul; 37(7): 9919-30.
- 12) Sato, M et al: Optimization of adenoviral vectors to direct highly amplified prostate-specific expression for imaging and gene therapy. Mol

Ther 8: 723-37, 2003.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 安藤俊夫、竹之下誠一、隈元謙介: Candidate tumor suppressor gene *Susd2* inhibits growth of cancer cells by preferentially targeting cancer stem cells. 新規癌抑制遺伝子候補 *Susd2* は癌幹細胞を標的として細胞の増殖を阻害する, 第 75 回日本癌学会学術総会 (平成 28 年, 横浜)
- ② 安藤俊夫、隈元謙介、大原正志: *Susd2/SUSD2*, a tumor suppressor gene and a seed for antitumor drug development. 癌抑制遺伝子 *Susd2/SUSD2* の創薬 seed としての可能性, 第 76 回日本癌学会学術総会 (平成 29 年、横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

隈元 謙介 (KUMAMOTO, Kensuke)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60457778

(2)研究分担者

安藤 俊夫 (ANDOH Toshio)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号 : 20012693