

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590282

研究課題名（和文） がんの悪性化におけるWntシグナルのモデュレータの役割について

研究課題名（英文） Role of Wnt signal modulators in malignancy of cancer

研究代表者

内田 和彦（UCHIDA KAZUHIKO）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：90211078

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Wntシグナルモデュレータタンパク質ががんの悪性化にどのように関わっているかについて解析した。新規のWntシグナルモデュレーの膜タンパク質（以下MPX, Membrane Protein Xと略す）が、肝細胞がん組織で高い発現を示し、ノックダウンならびに過剰発現した肝がん細胞を用いた細胞増殖能やインベージョンアッセイにより、膜表面下でMPXが肝細胞がんの悪性化に関わることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the mechanisms of Wnt signaling modulator in carcinogenesis and malignant transformation. We have found overexpression of novel Wnt modulator. Membrane Protein X (MPX) by 'omics' analysis of liver cancer. Functional analysis of MPX by over-expression of cDNA and siRNA knockdown for MPX revealed this new Wnt signaling modulator promote cancer invasion in liver cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子病態学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Wntシグナル、プロテオミクス、分子標的薬、腎明細胞癌、肝細胞がん、質量分析、遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 「正常細胞」と「がん細胞」の違いは細胞内シグナル伝達の「制御」と「脱制御」といえる。我々は転移などがんの悪性化において、シグナル伝達因子のモデュレーター (co-activator と co-repressor) の変化が重要と考えて、これまでゲノム解析によりがんの発生と進展に関わる遺伝子を同定してきた。最近、我々は幹細胞の自己複製を恒常的に制御している Wnt シグナルのモデュレーターである Idax (CXXC4) が、がんの進展に関わることをはじめて明らかにした (Kojima T, Shimazui T, Uchida K, et al. Oncogene 2009)。Wnt シグナルは、 β -catenin を介して下流の遺伝子を活性化、細胞増殖を促進させる canonical 経路と、 β -catenin を介さない Rap1 GTPase を活性化し細胞骨格や細胞接着を誘導する Planner cell polarity (PCP) 経路がある。Idax は Dvl と相互作用することにより Wnt を negative に制御している。転移性腎がんの特異的に認められた Idax の発現低下は、*in vitro* で Dvl-Wnt シグナルの活性化によって悪性化を誘導した。現在、この Idax 低下による Wnt シグナルの活性化は、canonical 経路だけでなく PCP 経路を活性化し腎がんの転移を誘導していると考えている (図 1)。また同時にトランスクリプトーム解析により膜タンパク質 CTHRC1 (collagen triple helix repeat containing 1) の発現が腎細胞がんできわめて高いことを見出した (図 1B、投稿中)。CTHRC1 は細胞膜に存在し Wnt シグナルにおいて細胞極性や細胞運動の制御に関与する PCP 経路を活性化し、細胞の浸潤能を亢進させるという報告 (Yamamoto ら Dev Cell 2008) があり、がんの悪性化の分子病態としてこれらの因子の協調作用に注目している。

一方、我々は iPS 細胞の誘導遺伝子 Klf4 と同じ転写因子 Klf (Krüppel-like factor) ファミリーの Klf5 の幹細胞の自己複製における役割を明らかにした (業績 6: Cell Stem Cell 2008)。Klf5 は分化を抑制し、p21 の発

現抑制と Tcl1-Akt1 シグナリングを活性化して G1-S 移行を促すことで幹細胞の自己複製を担っていることを明らかにした。最近の報告から発生の時間軸に沿って Klf4 と Klf5 はそれぞれ異なる役割を担っていると考えられている。我々が行った Klf5 のノックアウトと過剰発現幹細胞のトランスクリプトーム解析によって Klf5 の下流にある幹細胞の自己増殖の制御に関わる遺伝子群のうち Wnt シグナルの調節因子の CK1 ϵ に注目した (Ema M, Uchida K, et al. Cell Stem Cell 2008, 未発表データ)。CK1 ϵ は Wnt シグナルの調節因子で Dvl をリン酸化することで canonical 経路を活性化する。最近、CK1 ϵ が Wnt の PCP 経路 を活性化して初期発生における原腸陥入 (gastrulation) を制御することが示されている (Tsai ら Dev Cell 2007)。CK1 ϵ は SIPA1L1 をリン酸化して不安定化することによって Rap1 GTPase を活性化し細胞骨格や細胞接着をモデュレートするらしい。そこで我々は、CK1 ϵ は Klf によって遺伝子発現が誘導され、Wnt の canonical 経路を介して幹細胞の自己複製を促進し、PCP 経路を介して初期発生を制御している可能性を考えている。幹細胞の自己複製制御シグナルに関わるこれらのタンパク質ががんではどのように変化しているかを明らかにすることが、がん化とがん悪性化の分子病態を理解する上で重要である。

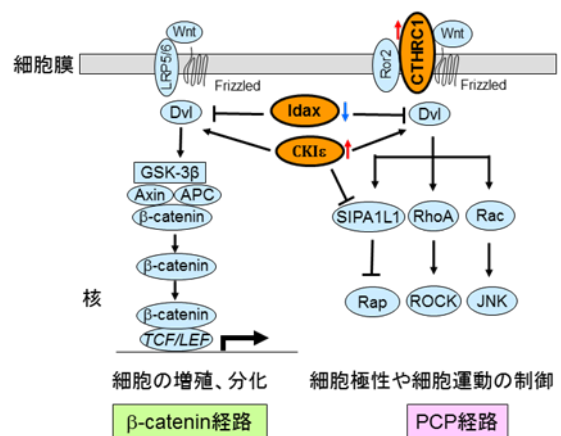


図 1

2. 研究の目的

(1) 本研究課題の申請時の当初の研究目的を記述—本研究では、申請者が新しい Wnt モデュレータのタンパク質の増加や活性化によって Wnt シグナルを介してどのように細胞のがん化とがんの悪性化に関与するのかを解析する。これらの因子と相互作用するタンパク質や発現の変化する遺伝子やタンパク質を同定することによってがん化とがん悪性化のメカニズムを明らかにする。

①これまでの研究で明らかにした前述の Wnt モデュレータ (Idax, CTHRC1, CKIε) に注目し、これらのタンパク質の増加や活性化による Wnt シグナル下流遺伝子発現の変化、*in vitro*, *in vivo* における増殖、アポトーシス、浸潤・転移能への効果について検討する。さらにプロテオミクス解析によるタンパク質発現量とタンパク質間相互作用の解析により、Wnt シグナルの変化の全貌を明らかにする。

②幹細胞の自己複製に必要な Klf4 と Klf5 遺伝子の下流にある前述の細胞複製と発生に関わる遺伝子群に注目し、これまで蓄積したがんのゲノム解析データから、これらの遺伝子のがんにおける DNA コピー数と遺伝子発現変化の有無について調べ、がんでは変化している遺伝子については上記 1) の新規モジュレータタンパク質の解析と同様にノックアウト・ノックダウン細胞を用いて細胞アッセイとタンパク質相互作用変化の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 1) 肝がんにおける遺伝子変化の解析
これまでのマイクロアレイの解析から、75% の腎がんで Klf4 が 2～6 倍過剰発現していること、CKIεは腎がんにおいて共通して約 3～6 倍遺伝子発現が増加していることがわかっている。また Idax 遺伝子の欠失と遺伝子発現低下は転移能を有する腎がんで高頻度に認められ、その下流の canonical 経路で β-catenin の発現上昇が認められているタンパク質から膜タンパク質を選び、幹細胞 (マウス ES 細胞) を用いた siRNA (shRNA)

によるノックダウンと過剰発現を行い、自己複製能と分化への影響を調べる基礎データとする。

4. 研究成果

我々のこれまでの研究で明らかになった Wnt シグナルの 3 つのモデュレータタンパク質が、どのようなメカニズムで細胞のがん化とがんの悪性化を引き起こすのかを明らかにできた。

(1) Wnt シグナルのモデュレータの機能を阻害する FJ9 という低分子化合物を用いて腎がんの治療薬としての可能性が明らかになった。腎明細胞がんの細胞増殖と細胞死への影響について腎がん細胞株 caki-1 と OS-RC-2 を用いて解析し結果、FJ9 はこれら 2 つの細胞株で Wnt シグナルのターゲット遺伝子である CCND1 と MMP7 の発現を著しく低下せしめ、細胞増殖の低下と細胞死の誘導を促進した。

(2) MPX に対するポリクローナル抗体を作成し、肝細胞がん組織における発現をウェスタンブロット法と免疫組織化学染色を行った。その結果、肝細胞がん組織に高い発現が認められた。さらに MPX に対する siRNA を作成し、肝細胞がん複数種類に導入し、MPX ノックダウンを行った。また過剰発現ベクターを構築して同様に肝細胞がんへ導入した。これらのノックダウンならびに過剰発現の細胞増殖能の変化、インベーションアッセイなどによる悪性化への関与などの機能解析を行った結果、MPX ノックダウンにより細胞増殖ならびに細胞浸潤が抑制された。培養細胞への抗 MPX 抗体の添加は効果がなかった。以上の結果から、膜表面下 MPX が肝細胞がんにおける抗がん剤の分子標的候補になる可能性が示唆された。

(3) Wnt モジュレータと相互作用するタンパク質解析のためのプロテオミクスの解析手法を確立した。LC-MS を用いて MRM 法ならびに非標識 MALDI 法で解析するプラットフォームができた。

今後、これら新知見をもとに腎がんの発生と

悪性化の新しい分子メカニズムを標的とした治療法の開発に進めたい。

総括

これまで腎がんならびに肝細胞がんの分子メカニズムの研究において、Wnt シグナルのモジュレータータンパク質である Idax と MPX についての働きはまったくわかってなかった。本研究において、とくに抗がん剤の分子標的になりうる MPX の肝がんにおける機能解析ができた意義は大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

(1) Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Ito M, Nobori T, Suzuki H, Dissanayaka SK, Meno K, Asashima M, Uchida K., Serum protein isoform profiles indicate the progression of hepatitis C virus-induced liver diseases. *Int J Mol Med.* Vol. 31, 2013, 943-950, 査読有 DOI: 10.1111/cas.12149.

(2) Shimazui T., Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K., Nishiyama H., Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int. J. Oncol.*, Vol.42: 543-548, 2013, 査読有 DOI: 10.3892/ijo

(3) Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, Uchida K., Kato M, Miyata T, Takahashi S. Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. *J. Biochem.* 152, 549, 2012, 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvs100.

(4) Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, Takano S, Uchida K., Takahashi S, Ema M. Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. *Blood*, 120, 914, 2012, 査読有

DOI: 10.1182/blood

(5) 白木克哉, 杉本和史, 内田和彦, 網羅的プロテオミクスによる膵癌のバイオマーカーの探索. *胆と膵* Vol. 32, 811-815. 2011, 査読有

(6) Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, Tran MT, Kudo T, Uchida K., Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S. c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver. *Blood*, Vol 118, 1374-85, 2011 査読有 DOI: 10.1182/blood-2010-08-300400.

(7) Kojima T, Shimazui T., Horie R, Hinotsu S, Oikawa T, Kawai K, Suzuki H, Meno K, Akaza H, Uchida K. FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chrom. Cancer*, Vol 49, 379-389, 2010 査読有 DOI: 10.1002/gcc.20750.

(8) Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito M, Yoneda M, Uchida K., Takase K, Shiraki K. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma. *Vol 30*, 5055-61, 2010 査読有

(9) Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Uchida K., Kojima T, Takei Y. Functional cell surface expression of Toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol.*, 37, 805-14, 2010 査読有

(10) Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K., Usui J, Yamagata K, Sumida T. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp*

Immunol. Vol 159, 1-10, 2010 査読有

〔学会発表〕(計10件)

- (1) 内田和彦 Peptidome によるバイオマーカー探索. 生命医薬情報学連合大会 2012 (招待講演), 東京, 2012.10.14
- (2) Uchida, K. Discovery of 'cell-derived' circulating peptide biomarker in blood and LC-MS/MS assay development for liver disease. AACCC2012, Los Angeles, USA, 2012.7.15.
- (3) Uchida K., Suzuki H, Meno K, Korenaga T, Nagashima R, Sugimoto K, Toyota H, Kumada S, Okanoue T, Shiraki K. Identification of serum biomarkers for transaminase-negative chronic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease by proteomics. The 21th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2011) (Plenary lecture), Bangkok, Thailand, 2012.2.18.
- (4) Korenaga T, Meno K, Suzuki H, Sugimoto K, Shiraki K, Uchida K Peptidomic and immunological analyses reveal novel circulating biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease 第34回日本分子生物学会, 横浜, 2011.12.13.
- (5) 杉本和史, 山本憲彦, 白木克哉, 竹井謙之, 熊田卓, 内田和彦. Pooled Sample を用いた血清中の NASH バイオマーカーペプチドの iTRAQ による同定 第47回日本肝臓学会総会. 東京 2011.6.2.
- (6) 為田雅彦, 杉本和史, 白木克哉, 山本憲彦, 竹井謙之, 内田和彦. 二次元電気泳動と多段階質量分析を利用した新規 HCV 関連肝疾患進展マーカーの検出. 第47回日本肝臓学会総会. 東京 2011.6.2.
- (7) 白木克哉, 杉本和史, 熊田卓, 内田和彦. 網羅的プロテオミクスによる膵癌のバイオマーカーの探索. 第97回日本消化器病学会総会 東京. 2011.5.15.
- (8) Uchida K, Suzuki, H., Meno, K., Ishii, T., Sugimoto, K., Nagashima, N., Shiraki, K.

New Strategy for Identification and Assay Development of Circulating Peptide Biomarkers for Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. 国際ヒトプロテオーム機構 HUPO 9th World Congress. Sydney, Australia, 2010.9.9.

- (9) Suzuki, H., Meno, K., Korenaga, T., Ishii, T., Sugimoto, K., Nagashima, R., Shiraki, K., Uchida, K. Quantitative Peptidomic Analysis Reveals Novel Circulating Biomarkers for Chronic Inflammation in Transaminase-Negative Chronic Hepatitis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 国際ヒトプロテオーム機構 HUPO 9th World Congress. Sydney, Australia, 2010.9.9.
- (10) 小島崇宏, 島居徹, 及川剛宏, 河合弘二, 内田和彦, 赤座英之. Dishevelled 阻害薬 (FJ9)における腎癌細胞株の Wnt シグナルの抑制と抗腫瘍効果に関する検討. 第98回日本泌尿器科学会総会 盛岡 2010.4.27.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 和彦 (UCHIDA KAZUHIKO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 90211078

(2) 研究分担者

島居 徹 (SHIMAZUI TORU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 80235613