

大規模プロテオーム解析による 大腸発がん制御機構の解明と分子標的治療薬の開発

国立がん研究センター研究所 化学療法部

下重 美紀

1. 目的

近年、我が国では生活習慣の欧米化に伴い大腸がんは増加の一途を辿り、年間約10万人近くが大腸がん（結腸および直腸の悪性新生物）に罹患し、約4万人が絶命を余儀なくされている。手術による治癒が難しい進行・再発性の大腸がんの治療にはoxaliplatinやirinotecanを含む多剤併用療法やvascular endothelial growth factor やepidermal growth factor receptorなどを標的とした分子標的治療薬の投与が実施されているが十分な効果は得られていない。

そこで我々は、大腸発がん過程において最も研究が進み、より多くの知見が蓄積されているWntシグナル経路に着目し、なかでもシグナル伝達因子である β -cateninと腸上皮細胞の分化を制御する転写因子であるT-cell factor-4 (TCF4)の転写複合体に相互作用をする分子群からWntシグナルのスイッチングを可能とする分子を選別することにより、大腸がんの治療標的分子“シーズ”の探索を実施した。

本研究の目的は、がんの投薬治療に際し、治療薬に対する耐性や感受特異性、また疾患の多様性による副作用などQuality of Lifeを脅かす現在回避できない問題を解決するための一つの手段として、患者個人に合った、治療段階に応じた治療薬の提供のための、多様な治療標的分子を探索することである。

2. 背景

大腸がんの80-90%の症例で家族性大腸腺腫症の原因遺伝子として同定されたがん抑制遺伝子であるadenomatous polyposis coli (APC)に変異が生じ、Wntシグナル伝達が活性化している。APC遺伝子を修復し、その機能を回復させることは、現状の医療技術では困難であり、APC遺伝子産物の下流でWntシグナルを薬理的に遮断するほうが、現実性が高い。大腸がんの悪性形質をあらわす指標の1つとして細胞内に β -cateninの蓄積が認められるが、 β -cateninは核内でWntシグナル伝達の最終到達点であるTCF4と結合し、その標的遺伝子の発現の異常亢進を惹起することによって大腸がんが発生すると考えられている。

そこで、我々はWntシグナル経路における β -catenin/TCF4転写複合体に着目し、大腸がん治療薬の開発を目的とした治療標的分子の探索（発表論文1-6）にあたり、独自に蛋白質の高感度検出法を開発（発表論文3）し、大腸がん細胞株であるDLD1およびHCT-116から抽出した内因性蛋白質を抗 β -catenin抗体および抗TCF4抗体を用いて免疫沈降を行い、網羅的に β -catenin結合蛋白質（未発表データ）およびTCF4結合蛋白質（発表論文3）を同定している。

本研究において、これら抗 β -catenin抗体および抗TCF4抗体で免疫沈降された分子の中から、特異性が高く、副作用の少ない大腸がん治療薬開発を目指して機能解析を実施し、治療標的分子の選別を行うことを計画した。

3. 方法

β -catenin/TCF4結合蛋白の網羅的同定

ヒト大腸がん細胞株であるDLD1およびHCT-116細胞から蛋白抽出液を、1解析あたり 5×10^9 cellsの割合で調製した。各細胞抽出液を用いて、それぞれ抗 β -cateninマウスモノクローナル抗体（BD Biosciences）あるいは、抗TCF4マウスモノクローナル抗体（Upstate Biotechnology）による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降複合体をゲル電気泳動にて分離することなく、直接トリプシン（Promega）にてペプチド断片化を行った。質量分析にあたっては、検出感度および同定タンパク質の網羅性を向上させる目的で、断片化したペプチド混合物を、200 nL/minの低流速で多次元液体クロマトグラフィーに接続し、1回の解析あたり3時間をかけて分離し、直接四重極Time of flight (TOF)型質量分析システムを用いて網羅的に質量電荷比の解析を行った。得られたスペクトルは我々が独自に開発したソフトウェア（発表論文3）にて統合を行い、 β -cateninあるいはTCF4結合タンパク質リストを得た。

治療標的分子の選別 (臨床検体)

β -catenin/TCF4結合タンパク質リストから治療標的候補分子の機能解析の優先順位は、副作用の危険性をあらかじめ排除する目的で、大腸がん臨床検体の組織切片を用いて免疫染色を実施する。免疫組織学的発現解析の結果、腫瘍特性の高い発現、また予後不良症例における発現の亢進、精巣などの生命維持に必須でない臓器を除いた全身正常組織の発現が見られないこと等を基準に選択する。

標的分子の機能解析 (*in vitro*)

β -catenin/TCF4結合タンパク質リストから、腫瘍形成および腫瘍増大に関与する治療標的を抽出する。治療標的候補分子について、複数のヒト大腸がん培養細胞を用いてsmall interfering (si) RNAによりその発現をノックダウンし、 β -catenin/TCF4転写活性および細胞増殖への影響を検証する。尚、創薬に有利であるリン酸化酵素などの酵素分子および受容体分子などは特に優先する。また、文献のみならず、公開されている分子の高次構造情報なども活用する。

標的分子の機能解析 (*in vivo*)

この段階で選別された分子について、*in vivo*での大腸がん制御における役割を検討するために、大腸がん細胞移植マウス*Xenograft*モデルを用い、移植腫瘍の形成・増殖過程における役割を検討する。

ヒト大腸がん細胞 (HCT-116, DLD1およびWiDr) をそれぞれ用い、ヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成を確認後、治療標的候補分子のsiRNAを腫瘍に直接注入する。腫瘍形成における影響を観察するために、移植腫瘍径を経日的に計測した。尚、siRNAはヌクレアーゼによる分解を抑制させ、細胞内への効率的な伝達と作用の持続性を可能にさせるためにアテロコラーゲンと複合体化させた後に投与した。

4. 結果

大腸がん臨床検体の組織切片を用い、候補分子の免疫組織学的発現解析について、市販品で入手可能な抗体を用いて実施したところ、非がん部に比べ、がん部において発現の亢進している分子を複数検出した。さらに、大腸がん培養細胞を用いて、候補分子の β -catenin/TCF4転写活性への影響について検討を行ったところ、転写活性が強制発現で亢進し、ノックダウンにより抑制する候補分子を選別した。さらに、これらの分子のsmall hairpin (sh)RNAを用いて、その発現をノックダウンしたところ、大腸がん細胞の細胞増殖を有意に抑制する候補分子を見出すことができた。

5. 考察

本研究対象である β -cateninおよびTCF4結合蛋白質の中には、残念ながら薬剤開発には適さない分子が含まれていることも予想されていた。本助成研究期間にすべての解析を終えることはできなかったが、現在までに解析を終えた分子の中にはWntシグナル特異的に発がん制御に関わる分子を選別することができた。非常に興味深いことにこれら分子はいずれもSmall Ubiquitin-related Modifier (SUMO)化制御に関わる分子であった。SUMO化の制御については世界中で精力的に研究が進められているものの、未だ不明な部分が多く、創薬標的としては難しい課題が山積している。しかし、これらの分子については解析を実施することにより、大腸がんの“診断バイオマーカー”として、あるいは大腸がんの発症・進展メカニズムの解明に繋がる可能性が期待されるため、今後も多角的に検証を行い情報を取得する予定である。

今後は、現在までに解析を終えていない β -cateninおよびTCF4結合蛋白質についても同様に解析を進め、有望な創薬標的候補分子を選別する予定である。次の段階では、副作用の危険性を減少させる目的で、より特異的な奏功性を目指すために、アフリカツメガエル初期胚を用いた2次軸アッセイによりWntシグナル特異性の検証を実施する。

これらの解析により最終的に選別された有望な分子については、個別の分子特異的な解析と並行して遺伝子改変マウスや大腸がんモデルマウスである*Apc^{min/+}*マウスとの交配マウスを作製し、慎重な機能解析により創薬標的を決定していく予定である。

本課題は国民の健康福祉に貢献するばかりではなく、国産薬創製の達成は国力増強につながるため、社会的に意義ある取り組みであると考えています。

ヒト検体の使用および動物実験にあたっては、人権の保護、生命倫理及び法令等を遵守し、(独)国立がん研究センターの指針に準拠し実施した。

6. 発表論文

- 1) Satow R, **Shitashige Miki**, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T.
 β -Catenin antagonizes PML tumor suppressor function by inhibiting SUMOylation and nuclear body formation.
Gastroenterology (in press).
- 2) **Shitashige Miki**, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.
Traf2- and Nck-interacting kinase TNIK is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth.
Cancer Research 70:5024-5033. 2010
- 3) **Shitashige Miki**, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.
Regulation of Wnt Signaling by the Nuclear Pore Complex.
Gastroenterology 134:1961-1971. 2008
- 4) **Shitashige Miki**, Hirohashi S, Yamada T.
Wnt signaling inside the nucleus. (*Review*)
Cancer Science 99:631-637. 2008
- 5) **Shitashige Miki**, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.
Involvement of splicing factor-1 in β -catenin/T-cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing.
Gastroenterology 132:1039-1054. 2007
- 6) Huang L, **Shitashige Miki**, Satow R, Honda K, Ono M, Yun J, Tomida A, Tsuruo T, Hirohashi S, Yamada T.
Functional interaction of DNA topoisomerase II α with the β -catenin and T-cell factor-4 complex.
Gastroenterology 133: 1569-1578. 2007