

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460979

研究課題名(和文)大腸癌、炎症性腸疾患における新規治療標的分子およびバイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Novel molecular target in colorectal cancer and inflammatory bowel disease

研究代表者

櫻井 俊治 (SAKURAI, Toshiharu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90397539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームの機能を制御するガンキリンは大腸前癌病変において発現が亢進し、大腸発癌に重要な役割を果たしている。これまでガンキリンの機能解析は主に細胞株で行われてきたが、実際の生体では、上皮細胞、間質細胞、幹細胞の細胞間の相互作用が発癌を決定する。本研究ではガンキリンを大腸上皮細胞、炎症細胞、又は幹細胞で欠損させたknock-out mouseを用いて、生体での機能解析を行い、炎症細胞でのガンキリンがSTAT3, ERK, 幹細胞の増幅を制御して大腸癌の発生および治療抵抗性に関わっていることがわかった。ガンキリンは新しい治療およびバイオマーカーの標的分子として有望である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed gene expression of colon tissues obtained from 354 patients with IBD and CAC and found that expression of gankyrin was much higher in colonic mucosa of patients with refractory IBD than in those with IBD in remission. Expression of gankyrin was upregulated in inflammatory cells as well as tumor cells in colonic mucosa of patients with CAC. The interaction between gankyrin and SHP-1 leads to inhibition of STAT3 activation and to enhancement of TNF-alpha and IL-17 in inflammatory cells. We created mice with intestinal epithelial cell-specific gankyrin ablation and deletion of gankyrin in myeloid and epithelial cells. Gankyrin deficiency in myeloid cells reduced the activity of ERK and the expression of stem cell markers, leading to attenuated tumorigenic potential. These findings provide important insights into the pathogenesis of CAC and suggest that gankyrin is a promising target for developing therapeutic and preventive strategies against CAC.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 炎症性腸疾患 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の頻度は我が国において増加の一途をたどり、死亡者数で3番目に多い癌である。大腸癌は腺腫から adenoma-carcinoma sequence を経て発生するとされ、前癌病変である腺腫の内視鏡的切除により大腸癌罹患率・死亡率は低下する(Lieberman, *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008)。腺腫のうち、径1cm以上、villous成分を含む、高度異型性を伴う、のいずれかを満たす病変を advanced colorectal adenoma と呼び、同時性および異時性多発癌の危険性の高い指標とされている(Winawer et al, *N Engl J Med* 1993; Zarchy et al, *Gastroenterology* 1994; Nagorni, *Arch Gastroenterohepatol* 2000)。発癌の分子機序として、プロテアソームによる p53, β -catenin の制御が重要である。一方、従来、単に非腫瘍性病変と考えられていた過形成性ポリープの概念は変遷し、TSA(traditional serrated adenoma) への移行や SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp) を介して癌化する可能性があることがわかってきた。しかしながら、SSA/Pのうちどのような病変が悪性形質転換の可能性が高い前癌病変なのか、またどのような分子機序で発癌するのかは明らかでない。

もう一つの大腸発癌経路として炎症性腸疾患を背景とする炎症性発癌がある。炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎とクローン病の二つの疾患を含み、腸上皮細胞死と炎症細胞浸潤が慢性的にみられる病態である。消化管粘膜の恒常性維持機構の破綻を伴う慢性炎症が発癌を促進することは疫学的に証明されており (Itzkowitz and Yio 2004)、10年間以上罹患した潰瘍性大腸炎では年率2%ときわめて高率に大腸癌を合併する。NF- κ B,

mitogen activated protein kinase (MAPK) による活性酸素種(ROS)蓄積、IL-6などの炎症性サイトカイン産生、そして癌幹細胞増殖の制御が炎症から発癌において中心的な役割を果たしている(研究業績23; Sakurai et al, *Cancer Cell* 2008; Sakurai et al, *PNAS* 2006)。しかしながら、このような既知の発癌制御因子を標的とする新規治療および治療効果予測のバイオマーカーは、いまだ十分な臨床的成果は得られていない。

ガンキリンはプロテアソームのアセンブリーに必要なシャペロンであり (Roelofs et al, *Nature* 2009; Saeki et al, *Cell* 2009)、MDM2/HDM2 と結合して p53 のユビキチン化および分解を介して細胞死を制御し、また I κ B と同様、Rel A と結合し NF- κ B 活性を抑制する(Higasitsuji et al *BBRC* 2007)。ガンキリンは大腸癌で高発現し、stemness factor である Nanog, Oct4, Cdx2 の発現を亢進させ、大腸癌において発癌初期より重要な役割を果たしている(研究業績5,7)。このようにガンキリンの発癌との関連が示唆されているが、in vivo での機能は不明である。そこで本研究では、ガンキリンの conditional knock-out mouse を用いて、ガンキリンおよび幹細胞を介する大腸発癌、炎症性腸疾患の分子メカニズムの解明とその臨床応用を模索する。

2. 研究の目的

大腸癌は adenoma-carcinoma sequence 以外に、鋸歯状病変を前癌病変とする serrated pathway や炎症性腸疾患を背景とする colitic cancer などいくつかの発癌経路を経て発生する。 β -catenin, p53 など大腸発癌に重要な分子はプロテアソームにより制御され、大腸癌で高発現するガンキリンはプロテアソームのアセンブリーに必要なシャペロ

ンである。近年、ガンキリンが大腸発癌早期の段階から幹細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを報告した。そこで本研究は、ヒトサンプル及び conditional knock-out mouse を用いて、ガンキリンの大腸発癌における in vivo での役割を幹細胞との関わりに注目しながら解明し、大腸癌・炎症性腸疾患での新規治療標的分子及びバイオマーカーの同定を目指す。

3. 研究の方法

3 種類のガンキリン conditional knock-out mice (*Gankyrin*^{F/F}; *villin-Cre*, *Gankyrin*^{F/F}; *Mx1-Cre*, *Gankyrin*^{F/F}; *Lgr5-promoter-Cre* mouse) を使用する。*Gankyrin*^{F/F}; *villin-Cre* mouse は flox mice と villin-Cre transgenic mice を掛け合わせた、腸上皮細胞特異的にガンキリンを欠損させたマウスである。*Gankyrin*^{F/F}; *Mx1-Cre* mouse は flox mice と Mx1-Cre transgenic mice と掛け合わせたマウスに poly(I:C) (30 mg/kg) を投与し、骨髓由来細胞でガンキリンを欠損させたマウスである。*Gankyrin*^{F/F}; *Lgr5-promoter-Cre* mouse は、タモキシフェンにより Lgr5 プロモーター下に Cre recombinase を発現させる B6.129P2-*Lgr5*^{tm1(Cre/ESR1)Cie}/J (Jackson lab) とガンキリン floxed mouse を掛け合わせることで、Lgr5 陽性幹細胞でガンキリンを欠損させたマウスである。大腸発癌モデルとして AOM および DSS を、大腸炎モデルとして DSS を使用する。

大腸発癌モデル; 4-8 週齢のマウスに AOM (12.5 mg/kg) を腹腔内投与し、DSS (cycle 1-4: 2.5%, and cycle 5: 2%, four days) を経口投与し、AOM 投与後 111 日で sacrifice する。*Gankyrin*^{F/F}; *villin-Cre*, *Gankyrin*^{F/F}; *Mx1-Cre*, *Gankyrin*^{F/F}; *Lgr5-promoter-Cre* mouse と control mouse において、腫瘍の個数、大きさを測定し、腫瘍および背景粘膜の

遺伝子変化を比較検討し、上皮細胞、炎症細胞、Lgr5 陽性幹細胞におけるガンキリンの機能をそれぞれ解析する。以下のアッセイを行い、ガンキリンと線維化、線維芽細胞活性化、血管新生の関連を検討する。Real time q-PCR にて TGF- β , collagen1 α 1, 1 α 2, 3 α 1, smooth muscle actin (SMA), TIMP1, PDGF-b, MMP2, MMP-3, MMP-13, CTGF, TNF α , Leptin, Adiponectin の発現レベルを定量する。

4-8 週齢の雄マウスに DSS (2.5% in drinking water) を 7 日間経口投与し、その 0, 2, 4, 6 日後の組織障害、炎症、再生過程、細胞増殖、遺伝子変化を測定する。

3 種類のガンキリン欠損マウス及び control mouse を用いて、ガンキリンの炎症性腸疾患およびその治癒過程への影響を in vivo で検討する。PAS 染色、TUNEL 染色、OxyBlot を用いて細胞死や ROS 産生への影響を検討する。*Gankyrin*^{F/F}; *Mx1-Cre* と control mouse を用いて腸間膜リンパ節、粘膜固有層のリンパ球、マクロファージ、樹状細胞を FACS, MACS を用いて単離し、それぞれの細胞でのサイトカイン産生能を ELISA、RT-qPCR にて調べる。

炎症性疾患 (IBD) と大腸癌の関連はよく知られている。慢性炎症に対するストレス応答が IBD における難治化および発癌を制御する可能性について報告した。IBD の難治化はストレス応答蛋白による炎症細胞のアポトーシスの抑制が、炎症性発癌は慢性炎症に伴う幹細胞の増殖が関与している (DDW2015 distinguished abstract plenary)。低温ストレスで誘導される RBM3 は、CD44 の発現を介して幹細胞の増殖を制御し、卵のふ化などの幹細胞の増殖に関与していることが報告された。本研究は RNA 結合蛋白である RBM3 の IBD および大腸癌の病態における役割を明らかにする。

2011 年 4 月より 2013 年 8 月の間に当院を受診した IBD 患者の大腸粘膜組織 (n=236)

における遺伝子発現を検討した。また 2010 年 4 月より 2016 年 3 月の間に当院で抗 VEGF 抗体、抗 EGFR 抗体の投与を受けた切除不能進行再発大腸癌患者は 149 名であり、このうち、治療前に大腸癌の切除術をうけ、PD, PR, CR の判定が可能であった症例について、原発巣における遺伝子発現を免疫染色にて測定し臨床データと比較検討した。

4. 研究成果

ガンキリンの発現は難治性 IBD および IBD 関連大腸癌症例の炎症細胞および腫瘍細胞において亢進し、幹細胞マーカー *Bmi1* の発現と有意な正の相関を認めた。*Bmi1* は難治性 IBD 患者の大腸粘膜においてその発現が亢進し、抗 TNF- α 製剤の治療抵抗性と相関した。ガンキリンは主に炎症細胞で発現する Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) と結合し STAT3 を活性化する。また腫瘍部において ERK の活性化を引き起こす。このように、ガンキリンは IBD 関連大腸癌の病態に関与している。

次に散発性大腸癌 (sporadic colorectal cancer) におけるガンキリンの役割を検討した。分子標的薬を含む化学療法を受けた切除不能進行再発大腸癌において、PD 症例では、PR 症例に比べてガンキリンの発現が高値であった。大腸癌原発病変でのガンキリンの高発現群において response rate (RR), disease control rate (DCR) が低かった。SHP-1 については分子標的薬の治療効果と明らかな相関を認めなかった。切除不能進行大腸癌において、ガンキリンは化学療法の治療効果を予測する有用なバイオマーカーである可能性がある。IBD 関連大腸癌だけでなく散発性大腸癌においてガンキリンが病態に関与していることが示唆された。

ヒト IBD 患者の大腸粘膜において、RBM3 の発現はその他のストレス応答蛋白 *Cirp*, *HSPA4*, *HSP27* の発現と正の相関を示した。ま

た RBM3 の発現はアポトーシス抑制蛋白 *Bcl-xL* や幹細胞マーカーの発現と正の相関を示し、とりわけ大腸癌のリスク因子である難治性 IBD において RBM3 の発現は有意に上昇し、またその発現量は幹細胞の増殖と腸粘膜の再生に関わる R-spondin の発現と正の相関を示した。IBD 関連大腸癌組織において RBM3 の発現は亢進していた。RBM3 はアポトーシスや幹細胞性に関与していることが示唆された。ヒトでの所見を基に、マウスにおいてその因果関係を証明することとした。*Rbm3* 欠損マウス及びコントロールマウスに、DSS、azoxymethane を投与して大腸癌を誘発し炎症と発癌の程度を比較検討した。*Rbm3* 欠損マウスではコントロールマウスに比べて、形成された大腸癌の数が有意に低下していた。*Rbm3* 欠損マウスの大腸粘膜において、*Bcl-xL* の発現の低下とアポトーシスの増加、および R-spondin の発現の低下を認めた。また骨髄移植後に、上記実験を行い、上皮細胞における RBM3 の重要性が明らかとなった。ヒトで認めた所見と合わせて RBM3 が細胞死と幹細胞性を制御して IBD 関連大腸癌を促進する分子機序が解明された。RBM3 は消化管の恒常性維持、炎症および発癌に関わっていることが予想され、新しいバイオマーカーおよび治療標的分子として有望である。慢性炎症というストレスの定量化により IBD 関連大腸癌の発癌リスクの予測が可能になり、高リスク群の絞り込みを通してサーベイランスプログラムの改善に貢献すると考える。

本研究ではガンキリンを大腸上皮細胞、炎症細胞、又は幹細胞で欠損させた knock-out mouse を用いて、生体での機能解析を行い、炎症細胞でのガンキリンが STAT3, ERK, 幹細胞の増幅を制御して大腸癌の発生および治療抵抗性に関わっていることがわかった。ガンキリンは新しい治療およびバイオマーカーの標的分子として有望である。

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7件)

*corresponding author

1. Sakurai T*, Higashitsuji H, Kashida H, Watanabe T, Komeda Y, Nagai T, Hagiwara S, Kitano M, Nishida N, Abe T, Kiyonari H, Itoh K, Fujita J, Kudo M. The oncoprotein gankyrin promotes the development of colitis-associated cancer through activation of STAT3. *Oncotarget*. 2017 Feb 1. doi: 10.18632/oncotarget.14983. 査読有
2. Sakurai T*, Kashida H, Komeda Y, Nagai T, Hagiwara S, Watanabe T, Kitano M, Nishida N, Fujita J, Kudo M. Stress Response Protein RBM3 Promotes the Development of Colitis-associated Cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2017 Jan;23(1):66-74. 査読有
3. Sakurai T*, Kudo M. (他8人、1番目) Stress response protein RBM3 promotes the development of colitis-associated cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2016. 査読有
4. Sakurai T*, Kudo M. (他6人、1番目) Heat Shock Protein A4 Controls Cell Migration and Gastric Ulcer Healing. *Dig Dis Sci*. 2015;60(4):850-7. 査読有
5. Sakurai T*, Kudo M. (他7人、1番目) Cold-inducible RNA-binding protein promotes the development of liver cancer. *Cancer Sci*. 2015;106(4):352-8. doi: 10.1111/cas.12611. 査読有
6. Adachi T, Sakurai T*, Kudo M. (他9人、2番目) Involvement of Heat shock protein A4 / Apg-2 in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:31-9 査読有
7. Sakurai T*, Kudo M. (他8人、1番目) Stress response protein Cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *Cancer Res* 2014;74:6119-28 査読有

[学会発表](計12件)

1. Sakurai T, Kudo M. The oncoprotein gankyrin links inflammation and tumorigenesis. Asian Pacific Digestive Week 2016. Kobe convention center, Kobe. November 3rd, 2016.
2. 櫻井俊治、工藤正俊、他 癌遺伝子ガンキリンは炎症をコントロールすることで大腸癌発生を促進する 日本癌学会総会パシフィコ横浜(横浜) 2016年10月6日
3. Sakurai T, Kashida H, Nagai T, Komeda Y, Kitano M, Kudo M. The oncoprotein gankyrin links inflammation and tumorigenesis in inflammatory bowel disease. DDW2016 Research Forum Inflammation-associated gastric and colon carcinogenesis, San Diego Convention Center, May 21-24th, 2016.
4. Sakurai T. Endoscopic diagnosis and treatment of early colorectal cancer in Japan. The 5th JGES-ASGE Joint Symposium. East versus West: Differences and similarities in GI Endoscopy, Grand Prince Hotel, Shinagawa, May 13th, 2016.
5. 櫻井俊治、榎田博史、工藤正俊 既存治療の効果予測の可能性 第102回日本消化器病学会総会プレナリーセッション IBD 臨床 PL24 京王プラザホテル 新宿 2016年4月21-23日
6. Sakurai T. Early Gastric Cancers. How to improve detection and characterization then treatment.

ENDOCON 2016, the 17th Annual Conference of Society of Gastrointestinal Endoscopy of India (招待講演) Mumbai, India. April 16th 2016.

7. Sakurai T. Magnifying Endoscopy and Treatment of GI Cancers. ENDOCON 2016, the 17th Annual Conference of Society of Gastrointestinal Endoscopy of India (招待講演) Mumbai, India. April 15th 2016.
8. Sakurai T., Okazaki Y, Komeda Y, Adahi T, Hagiwara S, Masui S, Nishida N, Kashida H, Kudo M. Stress response links inflammation and tumorigenesis in inflammatory bowel disease. DDW2015 Immunology, Microbiology & Inflammatory Bowel Diseases (*Distinguished Abstract Plenary*). Washington DC, USA. May 18th, 2015
9. 櫻井俊治、榎田博史、工藤正俊 Heat shock protein A4 controls gastric ulcer healing and metastasis of gastric cancer. JDDW2014 神戸国際会議場 (神戸) 2014 年 10 月 24 日
10. 櫻井俊治、足立哲平、工藤正俊 The role of stress response protein in intestinal mucosal defense. JDDW2014 神戸国際会議場 (神戸) 2014 年 10 月 24 日
11. 櫻井俊治、榎田博史、工藤正俊 Stress response links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. JDDW2014 神戸国際会議場 (神戸) 2014 年 10 月 23 日
12. 櫻井俊治、工藤正俊、他 Stress response links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. 第 73 回日本癌学会総会 パシフィコ横浜 (横浜) 2014 年 9 月 27 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 櫻井俊治、他、Medical Practice、大腸

癌の診断と治療 2015;32:1746-1752

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 俊治 (SAKURAI, Toshiharu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号 : 90397539

(2) 研究分担者

工藤 正俊 (KUDO, Masatoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号 : 10298953

(3) 連携研究者

藤田 潤 (FUJITA, Jun)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 50173430