

氏名	たなか のりたか 田中 伯享
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第4617号
学位授与の日付	平成29年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	大腸がん細胞株のタンキラーゼ阻害剤に対する感受性規定因子
論文審査委員	(主査) 教授 杉本 芳一 (薬学博士) (副査) 教授 齋藤 英胤 (医学博士) 准教授 松下 麻衣子 (博士(医学))

論文内容の要旨

【背景・目的】

大腸がんは、罹患者及び死亡者数の多いがん種の一つである。大腸がんは、がん抑制遺伝子 *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* の変異をきっかけとして、その後 *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* などのがん原遺伝子や *TP53* などのがん抑制遺伝子に多段階的に変異を生じながら進行していくケースが多いことが知られている。APC は、細胞増殖シグナルの一つである Wnt シグナルの抑制因子として機能する。Wnt シグナル経路において、APC は、Axin1/2、 β -catenin、Glycogen synthase kinase3 β (GSK3 β)、Casein kinase1 α (CK1 α) を構成因子とする複合体を形成しており、この複合体において APC と Axin1/2 は足場タンパク質として機能している。 β -catenin は、Wnt シグナル経路内においては、転写因子である T-cell factor (Tcf) と共役して同シグナルの標的遺伝子 (Axin2、c-Myc など) を転写活性化する機能を有する。上述の複合体上で、 β -catenin は GSK3 β や CK1 α によるリン酸化を受け、リン酸化された β -catenin はユビキチン-プロテアソーム経路を介する分解を受ける。

APC の失活変異により、APC と β -catenin との結合能が低下することで β -catenin の安定化につながり、ひいては Wnt シグナルを異常に亢進させ、大腸がんの発がんの引き金となることから、Wnt シグナルを標的とした薬剤は大腸がんの治療に有効であると考えられてきた。しかしながら、そのような薬剤は未だに開発されていないのが現状である。

ポリ (ADP-リボシル) 化酵素 [poly (ADP-ribose) polymerase; PARP] の一員であるタンキラーゼ (PARP-5) は、Wnt シグナルの実行因子である β -catenin の分解を促進する Axin1/2 をポリ (ADP-リボシル) 化 (PAR 化) する。タンキラーゼによって PAR 化された Axin1/2 はユビキチン-プロテアソーム経路を介して分解される。その結果、 β -catenin は CK1 α や GSK3 β によるリン酸化を受けなくなり、細胞内に蓄積する。細胞内に蓄積した β -catenin は核内へ移行することで標的遺伝子の発現を亢進させ

る。このように、タンキラーゼは Wnt シグナルを亢進させる機能を有することから、タンキラーゼ阻害剤が大腸がんの治療薬になると期待されている。しかしながら、タンキラーゼ阻害剤が実際にどのようなタイプの大腸がんにも有効であるかは不明である。新薬の臨床開発においては、治療効果が期待できる患者群の層別化が重要であるが、タンキラーゼ阻害剤の効果予測バイオマーカーは不明である。そこで本研究は、タンキラーゼ阻害剤がもたらす細胞増殖阻害効果を左右し得る因子を同定することを目的とした。

【方法】

細胞増殖阻害試験

タンキラーゼ阻害剤（G007-LK、IWR-1、XAV939）で 5 日間処理した後、3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試験にて細胞増殖阻害効果を評価した。

Tcf レポーターアッセイ

Tcf 結合部位を有する pTcf7-wt luc ベクター、陰性対象として Tcf 結合部位に変異が生じている pTcf7-mt luc ベクター、内部標準として phRLuc ベクターを各種細胞株にリポフェクションまたはエレクトロポレーション法にてトランスフェクションした後、ルシフェラーゼアッセイを行った。

ウェスタンブロッティング

細胞を whole cell extract (WCE) lysis バッファーにて溶解後、回収した細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。ゲル中のタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写後、抗 Axin1、抗 Axin2、抗 phospho β -catenin、抗 non-phospho β -catenin、抗 GAPDH 抗体を用いて各タンパク質の特異的バンドを検出した。

発現ベクタープラスミドの構築及び細胞への導入

pLPC ベクター、pLPC-APC (1-811 aa) 発現ベクター、または pLPC-APC (1-1450 aa) を構築し、エレクトロポレーション法にて細胞に導入した。

蛍光免疫染色

細胞を 2% paraformaldehyde で固定後、0.5% Nonidet P-40 にて透過処理を行った。1% bovine serum albumin (BSA) でブロッキングを行った後、抗 non-phospho β -catenin 抗体を一次抗体として、Alexa Fluor 488 標識抗体を二次抗体として用いて染色を行った。さらに、核を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色したサンプルを蛍光顕微鏡（オリンパス IX-71）にて観察した。

siRNA の導入

APC、Axin1、Axin2 の各 siRNA は、各種細胞を播種時に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いてリバーストランスフェクション法にて導入した。ノックダウンの効率はウェスタンブロッティングにて確認した。

【結果】

①大腸がん細胞株のタンキラーゼ阻害剤に対する感受性評価

9種類の人ヒト大腸がん細胞株(COLO-320 DM、SW403、HCC2998、HCT-15、DLD-1、HT-29、KM12、HCT-116、RKO 細胞)を用いて3種類のタンキラーゼ阻害剤(G007-LK、IWR-1、XAV939)に対する感受性を調べた。その結果、COLO-320 DM と SW403 の2株をタンキラーゼ阻害剤に感受性の細胞株とした。いずれの阻害剤についてもSW403の方がCOLO-320 DM細胞より高い感受性を示した。その他の細胞は同阻害剤に対して耐性であると見なした。タンキラーゼ阻害剤感受性と耐性株の間で関連する因子を探索すべく、次なる検討を行った。

②タンキラーゼ阻害剤に対する感受性と関連する因子

タンキラーゼ阻害剤に対する感受性がどのような因子によって規定されるかを探索するため、まずは各大腸がん細胞株における tankyrase、Axin1、Axin2、non-phospho (活性型) β -catenin の発現量を調べたところ、いずれの因子もタンキラーゼ阻害剤に対する感受性との相関傾向を示さなかった。

次に、これらの因子のタンキラーゼ阻害剤に対する応答性について検討した。その結果、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示した COLO-320 DM 及び SW403 細胞では、同阻害剤の処理に伴い、Axin2 の蓄積と non-phospho β -catenin の減少が認められた。一方、タンキラーゼ阻害剤に耐性を示したその他の細胞株では、同阻害剤の処理により Axin2 の蓄積が認められた細胞と認められない細胞が共に存在したが、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示す細胞株と比べると non-phospho β -catenin の減少の程度は軽微であった。 β -catenin が転写因子として機能するためには non-phospho β -catenin の核への局在が重要であることから、各大腸がん細胞株における non-phospho β -catenin の局在を調べたところ、この結果についてもタンキラーゼ阻害剤に対する感受性と関連する傾向は認められなかった。また、non-phospho β -catenin の局在はタンキラーゼ阻害剤で処理しても変化しなかった。

これら9種類の細胞株における Tcf レポーター活性を調べたところ、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示す細胞株では高い Tcf レポーター活性が認められたが、タンキラーゼ阻害剤に耐性となる細胞では相対的に低い Tcf レポーター活性を示していた。

タンキラーゼ阻害剤が Tcf レポーター活性に与える影響を調べたところ、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示す細胞及び一部の耐性細胞株において Tcf レポーター活性の低下が認められた。

さらに使用した9種類の細胞株における APC 遺伝子の変異について調べたところ、7つの細胞株において APC 遺伝子の欠失変異が認められ、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示す細胞株は、野生型の APC 内には7箇所存在する20アミノ酸リピートドメイン(20-amino acid repeat domain; 20-AARs)を全て欠失していた。一方で、タンキラーゼ阻害剤に耐性を示す細胞株はいずれも20-AARsを2つ以上保持していた。また、タンキラーゼ阻害剤で処理した時に Axin2 の蓄積が non-phospho β -catenin の減少に

結びつかなかった細胞株 (DLD-1、HCT-15、HCC2998 細胞) では、20-AARs を 2 つ保持していた。20-AARs 完全欠失型 APC、KRAS、PIK3CA、TP53 とタンキラーゼ阻害剤に対する感受性との相関を調べたところ、20-AARs 完全欠失型 APC を発現している細胞がタンキラーゼ阻害剤に感受性を示すような相関関係が認められた。

これらの結果より、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示す細胞株は、APC 内の 20-AARs、を完全に欠損しており、高い Tcf レポーター活性を示し、かつタンキラーゼ阻害剤処理による non-phospho β -catenin の減少が認められる傾向にあることが示唆された。

③APC のノックダウンが Wnt シグナル活性に与える影響

タンキラーゼ阻害剤耐性株のうち、20-AARs 完全欠失型 APC を発現する細胞と 20-AARs を 2 つ保持する APC を発現する細胞株について、APC のノックダウンがタンキラーゼ阻害剤の効果に与える影響を調べた。

内在性の APC 発現下で、COLO-320DM 細胞を G007-LK で処理すると Axin2 の蓄積と non-phospho β -catenin の低下が認められ、この効果は APC をノックダウンした時も変化しなかった。20-AARs を 2 つ保持する APC を発現する細胞株では、同欠失変異型 APC の発現を抑制することによって non-phospho β -catenin の細胞内蓄積量が増大し、さらにタンキラーゼ阻害剤処理による細胞内タンパク質量の減少が認められるようになった。

この non-phospho β -catenin のタンパク質量の変動が、Wnt シグナルの標的遺伝子の一つである Axin2 mRNA の発現に反映されているかという点について調べた。COLO-320 DM 細胞では、内在性 APC の存在下、G007-LK で処理することによって Axin2 mRNA の発現量の低下が認められ、その効果は内在性 APC の発現を抑制しても変化しなかった。20-AAR を 2 つ保持する APC を発現する細胞株では、同 APC の発現を抑制することによって Axin2 mRNA の発現が増大し、G007-LK 処理に伴って APC 発現時よりも大きく減少した。

以上の結果より、20-AARs を 2 つ保持する APC はタンキラーゼ阻害剤処理による β -catenin の分解を抑制する機能を有することが示唆された。

その分子機序を調べることを目的として次なる検討を行った。Axin1 または Axin2 が β -catenin の分解に関わるか、また、そこに 20-AARs を 2 つ保持する APC がどのように関わっているかを調べるために、これらのタンパク質の発現を抑制した時のタンキラーゼ阻害剤処理による non-phospho β -catenin の細胞内タンパク質量の変動を調べた。COLO-320 DM 細胞では、Axin1 の発現を抑制した時には、G007-LK の処理による non-phospho β -catenin の減少が認められたが、Axin2 の発現を抑制した時には、G007-LK 処理に伴った non-phospho β -catenin の減少が抑制された。これらの結果は、内在性 APC をノックダウンした条件下でもそれぞれ同様であった。一方、HCC2998 細胞では、内在性 APC の発現下では、G007-LK 処理による non-phospho β -catenin の減少は Axin1/2 いずれの発現を抑制した時も認められなかった。しかし、APC の発

現抑制下では、G007-LK 処理による non-phospho β -catenin の減少が認められた。この APC 発現抑制がもたらした効果は、Axin2 の発現を抑制することにより阻害された。これらの結果より、20-AARs を完全に欠損する APC を発現する細胞株では APC をロックダウンしても Wnt シグナル活性は変化しない一方で、20-AARs を 2 つ保持する APC を発現する細胞株では APC をロックダウンすることによって Wnt シグナル活性の増大及びタンキラーゼ阻害剤処理による Wnt シグナル活性の抑制能が増強されることが示唆された。また、20-AARs を 2 つ保持する APC は、タンキラーゼ阻害剤処理による Axin2 依存的な β -catenin の分解を抑制していることも示唆された。

④ APC (1-811 aa) と APC (1-1450 aa) の導入

次に、20-AARs を完全に欠失する APC として APC (1-811 aa)、または 20-AARs を 2 つ保持する APC として APC (1-1450 aa) を導入した時の non-phospho β -catenin の細胞内タンパク質量の変動及び Tcf レポーター活性の変動について調べた。

COLO-320DM 細胞に APC (1-811 aa) 発現ベクター、あるいは内在性の APC のみを標的とする APC siRNA を導入した時、non-phospho β -catenin のタンパク質量の変動は認められず、G007-LK 処理に伴った non-phospho β -catenin の減少に対しても変化は認められなかった。また、APC (1-811 aa) 発現ベクターを COLO-320DM 細胞に導入しても Tcf レポーター活性に変化はほぼ認められなかった。

一方、HCC2998 細胞に APC (1-811 aa) 発現ベクターを導入した時、non-phospho β -catenin のタンパク質量、あるいはタンキラーゼ阻害剤処理による non-phospho β -catenin の細胞内タンパク質量の変動に変化は認められなかった。内在性の APC のロックダウンによって non-phospho β -catenin の増大と G007-LK 処理による non-phospho β -catenin の減少が認められたが、APC (1-811 aa) を導入してもこの結果に変化は認められなかった。また、HCC2998 細胞に APC (1-811 aa) 発現ベクターを導入しても Tcf レポーター活性にほぼ変化は認められなかった。

COLO-320 DM 細胞に HCC2998 細胞由来の APC (1-1450 aa) 発現ベクターを導入すると、non-phospho β -catenin はほぼ消失し、また、Tcf レポーター活性の顕著な低下が認められた。

以上の結果より、APC (1-811 aa) は non-phospho β -catenin の安定性や Tcf レポーター活性に影響を与えないが、APC (1-1450 aa) は non-phospho β -catenin を減少させ、Tcf レポーター活性を低下させることが示唆された。

【結論】

β -catenin の分解に重要な 7 つの 20-AARs のうち 2 つを保持する変異型 APC は、大腸がん細胞の Tcf 転写活性を低下させると共に、Axin2 依存的な β -catenin の分解を抑制していることが示唆された。大腸がん細胞のタンキラーゼ阻害剤に対する感受性は APC の欠失変異のステータスによって異なる可能性が示唆された。

【考察】

Tcf 転写活性が高い大腸がん細胞、つまりは Wnt シグナルに対する依存性が高い可能性のある細胞ほど、タンキラーゼ阻害剤に感受性を示しやすい傾向にあることが示唆された。Tcf 転写活性の高さを規定する因子として、APC の変異が関与している可能性がある。本来、APC 内に 7 箇所存在する β -catenin の結合及び分解に必要なとされている 20-AARs を完全に欠損すれば、Wnt シグナルが強く活性化することにより、細胞は同シグナルに強く依存するようになるものと予想される。一方、20-AARs を 2 つ以上保持する APC を発現している場合には、Wnt シグナル活性は部分的に抑制されていることが考えられるため、そのような細胞では Wnt シグナルとは異なるシグナル経路に依存していることが考えられる。このような違いが生じるために、大腸がん細胞株のタンキラーゼ阻害剤に対する感受性は APC の変異ステータスによって左右される可能性がある。また、タンキラーゼ阻害剤で処理した時には、 β -catenin は Axin2 依存的に分解されることが示された。この Axin2 依存的な β -catenin の分解を、20-AARs を 2 つ保持するような APC は何らかのメカニズムで抑制している可能性も示唆された。

これらのことより、20-AARs を 2 つ保持するような APC を発現する細胞では、生存するにあたっての Wnt シグナルへの依存性が低いことと共に、タンキラーゼ阻害剤処理に伴った β -catenin の分解も阻害する、という 2 つの理由でタンキラーゼ阻害剤に対して耐性を示す可能性が示唆された。これらのことより、タンキラーゼ阻害剤の効果の予測が可能となり、患者の層別化が可能となることでタンキラーゼ阻害剤の治療成績の向上につなげることができると考える。

論文審査結果の要旨

大腸がんの原因として、Wnt シグナルの抑制因子であるがん抑制遺伝子 Adenomatous Polyposis Coli (APC) の変異がよく知られている。Wnt シグナル経路において、APC は Axin1/2、 β -catenin、Glycogen synthase kinase3 β (GSK3 β)、Casein kinase 1 α (CK1 α) を構成因子とする複合体を形成している。 β -catenin は、T-cell factor (Tcf) と共役して Axin2、*c-Myc*などを転写活性化する。一方 β -catenin は、GSK3 β や CK1 α によるリン酸化を受け、リン酸化された β -catenin はプロテアソーム経路を介する分解を受ける。Axin1/2 は β -catenin の分解を促進する作用を持つが、Axin1/2 は、ポリ (ADP-リボシル) 化酵素 (PARP) であるタンキラーゼによりポリ (ADP-リボシル) 化されると、プロテアソーム経路を介する分解を受ける。その結果、 β -catenin は細胞内に蓄積し、核内へ移行して標的遺伝子の発現を亢進させる。タンキラーゼが Wnt シグナルを亢進させる機能を有することから、タンキラーゼ阻害剤が大腸がんの治療薬になると考えられるが、タンキラーゼ阻害剤がどのようなタイプの大腸がん細胞に有効であるかは不明である。申請者は、大腸がん細胞株のタンキラーゼ阻害剤

に対する感受性規定因子を同定する事を目的として研究を行った。

申請者は最初に、9種類のヒト大腸がん細胞株 (COLO-320DM、SW403、HCC2998、HCT-15、DLD-1、HT-29、KM12、HCT-116、RKO 細胞) を用いて3種類のタンキラーゼ阻害剤 (G007-LK、IWR-1、XAV939) に対する感受性を調べたところ、COLO-320DM と SW403 の2株はタンキラーゼ阻害剤に感受性であり、その他の細胞株は耐性を示した。

タンキラーゼ阻害剤感受性株では、タンキラーゼ阻害剤によって Axin2 の蓄積及び non-phospho β -catenin の減少が認められた。一方、耐性株では同阻害剤で処理した時、Axin2 の蓄積が認められた細胞と認められない細胞が共に存在したが、タンキラーゼ阻害剤感受性株と比べると non-phospho β -catenin の減少量は少なかった。また、タンキラーゼ阻害剤感受性株では耐性を示す細胞株と比較して高い Tcf レポーター活性が認められた。

タンキラーゼ阻害剤感受性株は、野生型 APC 内に7箇所存在する20アミノ酸リピート (20-AARs) を全て欠失していた。一方、タンキラーゼ阻害剤耐性株はいずれも20-AARs を2つ以上保持していた。20-AARs を2つ保持する APC を発現する細胞株では、同欠失変異型 APC の発現を抑制した時にのみタンキラーゼ阻害剤による non-phospho β -catenin の減少が認められた。また、20-AARs を2つ保持する APC はタンキラーゼ阻害剤による Axin2 依存的な β -catenin の減少を抑制している事が示された。変異 APC の遺伝子導入実験より、APC (1-811 aa) は non-phospho β -catenin の安定性や Tcf レポーター活性に影響を与えないが、APC (1-1450 aa) は non-phospho β -catenin を減少させ、Tcf レポーター活性を低下させる事が示された。

以上より、20-AARs を2つ保持する APC は、細胞の Tcf レポーター活性を低下させ、また、タンキラーゼ阻害剤による Axin2 依存的な β -catenin の分解を抑制している事が示された。20-AARs を保持する APC を発現していることが、タンキラーゼ阻害剤に対する耐性を規定する因子となる事が示唆された。

これまで、大腸がんにおける APC の変異は広く報告されているが、変異 APC の機能についての研究は少ない。申請者は、大腸がん細胞に発現する20-AARs を2つ保持する APC が、細胞の Tcf レポーター活性を低下させ、また、タンキラーゼ阻害剤による Axin2 依存的な β -catenin の分解を抑制している、すなわち Wnt シグナルの抑制因子としての機能を持っているということを、初めて明らかにした。そしてこの20-AARs を保持する APC が、タンキラーゼ阻害剤の耐性を規定する因子となることを示した。本研究は、大腸がんの発がんに関する理解、Wnt シグナルの制御機構、タンキラーゼ阻害薬の感受性規定因子という3つの重要な課題に対して新しい概念を提供するものであると評価できる。

申請者は、事前の試問、発表会でのフロアーからの質問に対しても、丁寧かつ的確に答えており、本研究及びその関連領域に対する知識と理解は、ほぼ満足できるものであ

った。今後は、がん領域において研究を続け、さらに活躍されることを期待したい。
以上より、申請者は博士（薬科学）の学位に十分値するものと評価された。

論文目録

Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, Katayama R, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H. APC mutations as a potential biomarker for sensitivity to tankyrase inhibitors in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017 Feb 8. pii: molcanther.0578.2016. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0578.