

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	田中 伯享
主 論 文 題 名： 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				
【背景・目的】 大腸がんは、Wnt シグナルの抑制因子であるがん抑制遺伝子 <i>Adenomatous Polyposis Coli</i> (<i>APC</i>) の変異によって引き起こされる事が多い。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、Wnt シグナル内においては、T-cell factor (Tcf) と共役して同シグナルの標的遺伝子 (<i>Axin2</i> 、 <i>c-Myc</i> など) を転写活性化する。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 はプロテアソーム経路を介する分解を受ける。ポリ (ADP-リボシル) 化酵素 (PARP) の一員であるタンキラーゼは、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。Axin1/2 がタンキラーゼによって PAR 化されると Axin1/2 は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 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 は核内へ移行する事で標的遺伝子の発現が亢進する。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。本研究は、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た。				
【方法】				
<u>細胞増殖阻害試験</u> タンキラーゼ阻害剤 (G007-LK、IWR-1、XAV939) の細胞増殖阻害効果を MTT 試験にて評価した。				
<u>Tcf レポーターアッセイ</u> Tcf 結合部位を有する pTcf7-wt luc ベクター、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。				
<u>ウェスタンブロッティング</u> 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を検出した。				

プラスミドの導入

pLPC ベクター、pLPC-APC (1-811 aa) 発現ベクター、または pLPC-APC (1-1450 aa) 発現ベクターをエレクトロポレーション法にて導入した。

免疫蛍光染色

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をした。

免疫沈降

TNE lysis バッファー (10 mmol/L Tris-HCl pH7.8, 0.5% NP-40, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) で調整した細胞溶解液を用いて抗 Axin2 抗体、抗 β -catenin 抗体で免疫沈降を行った。

【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、COLO-320DM と SW403 の 2 株をタンキラーゼ阻害剤感受性株とし、その他の細胞は耐性株とした。

②タンキラーゼ阻害剤に対する感受性と相関する因子

各大腸がん細胞株について、Axin2、non-phospho β -catenin 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。これらの結果より、APC 内の 20-AARs を完全に欠損している細胞株は、高い Tcf レポーター活性を示し、タンキラーゼ阻害剤に対する感受性を示す可能性が示唆された。

③ APC がタンキラーゼ阻害剤による β -catenin の分解に与える影響

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 knockdown 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。

COLO-320DM 細胞に *Axin1* または *Axin2* siRNA を導入した時、G007-LK 処理による non-phospho β -catenin の減少は *Axin2* siRNA を導入した時にのみ抑制された。HCC2998 細胞では、APC の発現抑制下で生じる G007-LK による non-phospho β -catenin の減少は APC と *Axin2* の発現を抑制した時には認められなかった。COLO-320DM 細胞と HCC2998 細胞における *Axin2* と phospho β -catenin の結合能について調べたところ、COLO-320DM 細胞では *Axin2* と phospho β -catenin の結合が認められ、HCC2998 細胞ではこれらタンパク質の結合は認められなかった。以上より、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。

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

COLO-320DM 細胞と HCC2998 細胞に APC (1-811 aa) 発現ベクターを導入した時、non-phospho β -catenin のタンパク量及び Tcf レポーター活性にほぼ変化は認められなかった。COLO-320DM 細胞に HCC2998 細胞由来の APC (1-1450 aa) 発現ベクターを導入した時、non-phospho β -catenin 及び Tcf レポーター活性の顕著な低下が認められた。また、COLO-320DM 細胞で一過性に発現させた APC (1-1450 aa) と β -catenin の結合も認められた。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事が示された。

【結論】

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 を発現しているとタンキラーゼ阻害剤に耐性を示し、20-AARs を完全に欠失していると同阻害剤に感受性を示す傾向が示された。

【主論文に関する原著論文】

N. Tanaka, T. Mashima, A. Mizutani, A. Sato, A. Aoyama, B. Gong, H. Yoshida, Y. Muramatsu, K. Nakata, M. Matsuura, R. Katayama, S. Nagayama, N. Fujita, Y. Sugimoto and H. Seimiya. APC mutations as a potential biomarker for sensitivity to tankyrase inhibitors in colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.*, in press.