

博士論文 平成 28 (2016) 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

田中 伯享

## 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)* の変異によって引き起こされ、その後 *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* や *TP53* などの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、 $\beta$ -catenin、GSK3 $\beta$ 、CK1 $\alpha$  を構成因子とする複合体 (Destruction complex) を形成しており、この複合体において APC と Axin1/2 は足場タンパクとして機能している。 $\beta$ -catenin は、Wnt シグナル内においては、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、 $\beta$ -catenin は GSK3 $\beta$  や CK1 $\alpha$  によるリン酸化を受け、リン酸化された  $\beta$ -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  $\beta$ -catenin との結合能が低下する事で  $\beta$ -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 (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  $\beta$ -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 はユビキチン-プロテアソーム経路を介する分解を受ける。その結果、 $\beta$ -catenin は CK1 $\alpha$  や GSK3 $\beta$  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  $\beta$ -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事を目的とした。

## 【方法】

### 細胞増殖阻害試験

タンキラーゼ阻害剤 (G007-LK、IWR-1、XAV939) の細胞増殖阻害効果を MTT 試験にて評価した。

### 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、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。

### ウェスタンブロットティング

抗 Axin1、抗 Axin2、抗 phospho  $\beta$ -catenin、抗 non-phospho  $\beta$ -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) 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

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% BSA でブロッキングを行った後、抗 non-phospho  $\beta$ -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。

### 免役沈降

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  $\beta$ -catenin 抗体で免役沈降を行った。

## 【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た。その結果、COLO-320DM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-320DM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相関する因子を探索するべく、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相関する因子

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  $\beta$ -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は認められなかった。

次に、これらの因子の同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細胞では、タンキラーゼ阻害剤によってAxin2の蓄積とnon-phospho  $\beta$ -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細胞株では、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に感受性を示す細胞株と比べるとnon-phospho  $\beta$ -cateninの減少量は少なかった。

また、 $\beta$ -cateninが転写因子として機能するためにはnon-phospho  $\beta$ -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  $\beta$ -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相関する傾向は認められなかった。Non-phospho  $\beta$ -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-

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-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  $\beta$ -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による non-phospho  $\beta$ -catenin の減少が認められる傾向にある事が示唆された。

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

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 knockdown 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  $\beta$ -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 の発現を抑制することによって non-phospho  $\beta$ -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量の減少が認められるようになった。

この non-phospho  $\beta$ -catenin のタンパク量の変動が、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を調べた。COLO-320DM 細胞では、APC 存在下 G007-LK で処理する事によって Axin2 mRNA の発現量の低下が認められ、その効果は APC の発現を抑制しても変化しなかった。20-AARs を 2 つ保持する APC を発現する細胞株では、APC の発現を抑制する事によって Axin2 mRNA の発現が増大し、それは G007-LK によって減少した。G007-LK に

よる *Axin2* mRNA 減少度は 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による  $\beta$ -catenin の分解を抑制する機能を有する事が示唆された。その分子機序を調べる事を目的として次なる検討を行った。

*Axin1* または *Axin2* が  $\beta$ -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による non-phospho  $\beta$ -catenin の細胞内タンパク量の変動を調べた。COLO-320DM 細胞では、*Axin1* の発現を抑制した時には、G007-LK による non-phospho  $\beta$ -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 による non-phospho  $\beta$ -catenin の減少が抑制された。この結果は APC を knockdown した時も同様であった。一方、HCC2998 細胞では、APC の発現下では、G007-LK による non-phospho  $\beta$ -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 による non-phospho  $\beta$ -catenin の減少が認められたが、その効果は *Axin2* の発現を抑制する事により阻害された。

COLO-320DM 細胞と HCC2998 細胞における *Axin2* と phospho  $\beta$ -catenin の結合の有無を免疫沈降により調べたところ、COLO-320DM 細胞では *Axin2* と phospho  $\beta$ -catenin の結合が認められたが、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。

これらの結果より、20-AARs を 2 つ保持する APC は *Axin2* と  $\beta$ -catenin の結合を阻害することで、タンキラーゼ阻害剤による *Axin2* 依存的な  $\beta$ -catenin の減少を抑制している事が示唆された。

#### 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  $\beta$ -catenin の細胞内タンパク量の変動及び 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  $\beta$ -catenin のタンパク量の変動は認められず、G007-LK による non-phospho  $\beta$ -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) 発現ベクターを導入しても Tcf レポーター活性に変化は認められなかった。一方、HCC2998 細胞に APC (1-811 aa) 発現ベクターを導入した時、non-phospho  $\beta$ -catenin のタンパク量、あるいは

タンキラーゼ阻害剤による non-phospho  $\beta$ -catenin の細胞内タンパク量の変動に変化は認められなかった。内在性の APC の knockdown によって non-phospho  $\beta$ -catenin の増大と G007-LK による non-phospho  $\beta$ -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、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  $\beta$ -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。さらに、COLO-320DM に一過性に発現させた APC (1-1450 aa) と  $\beta$ -catenin の結合が免疫沈降により確認された。

以上の結果より、APC (1-811 aa) は non-phospho  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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。

#### 【考察】

Tcf レポーター活性が高い細胞、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程タンキラーゼ阻害剤に感受性を示しやすい傾向にある事が示唆された。Tcf レポーター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 20-AARs を完全に欠損すれば、高い Wnt シグナル活性を維持し、同シグナル経路への依存性が維持されるものと思われる。しかしながら、20-AARs を 2 つ以上保持する APC を発現している場合には、Wnt シグナル活性は抑制されている事が考えられるため、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事が考えられる。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、 $\beta$ -catenin は Axin2 依存的に

分解される事が示された。この Axin2 依存的な  $\beta$ -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。これらの事より、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 Wnt シグナルへの依存性が低下していると共に、タンキラーゼ阻害剤処理による  $\beta$ -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された。

## 論文目録

### 【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.