女性健康科学研究会誌 （J Soc Wom Health Sci Res） 第3巻 第1号 2014年5月

治療標的分子探索を目指した大腸発癌制御機構の解明

Proteomic analysis of β-catenin-associated colorectal carcinogenesis for drug discovery

*下重美紀

Wnt シグナルは大腸発癌過程において重要な役割を果たしている。大腸癌の80% 以上の症例で家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である adenomatous polyposis coli（*APC*）に変異が生じ、β-catenin が細胞内に蓄積している。蓄積したβ-catenin は核内で、腸上皮の分化、細胞増殖を制御する転写因子 T-cell factor-4（TCF-4）を活性化することで大腸癌の前駆病変を生じる。大腸癌の治療標的として、*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る。そこで、*APC* 遺伝子産物の下流で Wnt シグナルを遮断する方が実現性が高いと考えた。本研究では、TCF4 とβ-catenin の転写複合体に着目し、β-catenin/TCF-4 と相互作用する分子の探索を実施した。大腸癌細胞株である HCT-116 及び DLD1 の内因性蛋白質を抗β-catenin 抗体で免疫沈降した複合体蛋白質を質量解析により網羅的に同定したところ、2 種の細胞で共通して 70 種の結合蛋白質を探索することに成功した。これら蛋白質は大腸発癌制御過程におけるさらなる機能解析により大腸癌治療標的としての可能性が期待できる。

Wnt signaling is a major force driving colorectal carcinogenesis. More than 80% of colorectal cancers show mutation of the *APC* gene, resulting in accumulation of β-catenin and constitutive activation of Wnt signaling. Accumulated β-catenin in colon cancer is translocated into the nucleus, where it binds to T-cell factor-4 (TCF4) that regulates intestinal epithelial cell differentiation and proliferation. Because restoration of the loss of function resulting from mutation of the *APC* gene is not a realistic approach, we have been searching for molecules involved in Wnt signaling downstream of *APC*, especially in the nucleus, that could be potential drug targets. In this study we report the identification of the associating molecules for the TCF4 and β-catenin transcriptional complex. Proteins of two colon cancer cell lines, HCT-116 and DLD1, were immunoprecipitated with anti-β-catenin antibody and analyzed by nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry. 70 proteins immunoprecipitated commonly from two cell lines. A new drug targeting the β-catenin/TCF4 associating molecules might be effective for regulating aberrant Wnt signaling and colorectal cancer growth.

Key words：Colorectal cancer, Wnt signaling, Drug targets

*Miki Shitashige

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences.

背景

近年、生活習慣の欧米化に伴い大腸癌は増加の一途を辿り、年間約10万人近くが大腸癌に罹患し、約４万人が大腸癌（結腸および直腸の悪性新生物）のために絶命を余儀なくされている。特に、結腸と直腸を合わせた大腸癌は日本女性の癌での死亡原因の１位であり、男性についても数年後には同様にさらなる増加が予想されている。リンパ節や遠隔臓器への転移のない大腸癌に対しては外科切除が有効であるが、転移のある症例の治療には、oxaliplatin や irinotecan を含む多剤併用療法や vascular endothelial growth factor（VEGF） や epidermal growth factor receptor（EGFR）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ため、治療成績の向上には、新たに治療標的分子を見出し、治療法の選択を拡げることが急務である。これまでに大腸発癌制御に Wnt シグナル経路が重要な役割を果たしている数多くの知見が報告されている[1)-9)]。

癌抑制遺伝子である *APC* の変異は散在性大腸癌でも80%以上の頻度でみられる。正常な腸上皮では、*APC* は Axin や *glycogen synthase kinase*-3β（GSK3β）を形成しβ-catenin のリン酸化そして引き続き生じるユビキチン化によるβ-catenin の分解を制御している（**図 1a**）。しかし、大腸癌では *APC* が変異により不活化されているためβ-catenin の分解が抑制され細胞内に蓄積される。蓄積したβ-catenin は核に移行し、腸上皮の分化を制御する転写因子である TCF4 と結合し標的遺伝子の転写を活性化することで大腸癌の前駆病変である腺腫形成をもたらし（**図 1b**）、さらに二次的な遺伝子変異の蓄積で大腸癌が発症すると考えられている。

そこで、大腸癌の治療標的分子の探索にあたり、大腸癌細胞の核内における、β-catenin の蓄積は大腸癌のほぼ全例でみられることから、β-catenin および TCF4 を含む転写複合体は良い治療標的（**図 2**）

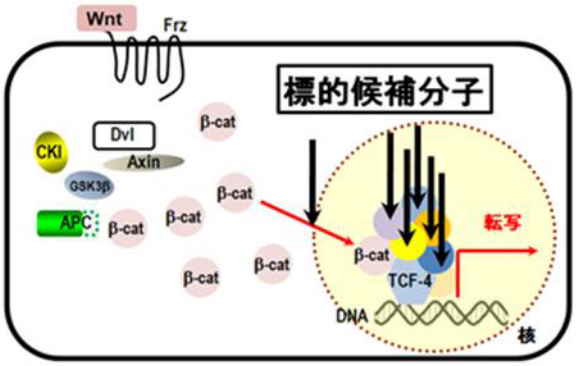

図 2. 大腸癌の治療標的分子探索ポイント

であると考え分子探索ポイントとした[1)]。本研究では、大腸癌治療標的分子候補としてβ-catenin/TCF-4 転写複合体と相互作用（結合）する蛋白質を質量分析を応用した高感度蛋白質解析法[2)]で網羅的に同定した。

方法

β-catenin/TCF4 結合蛋白の網羅的同定[2)]

ヒト大腸癌細胞株である HCT-116（The American Type Culture Collection, Rockville,

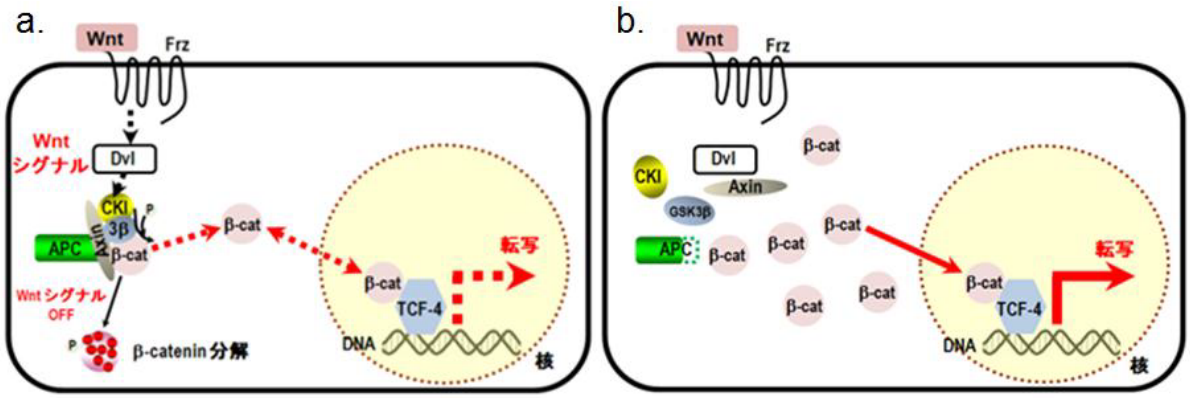

図 1. Wnt シグナル伝達経路

MD），DLD1（ヒューマンサイエンス研究資源バンク，大阪）から、1解析あたり 5x 10^8 cells を用いて蛋白質抽出液を調製した。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, Palo Alto, CA）による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降複合体蛋白質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, Madison, WI）にて断片化した。検出感度および同定蛋白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独自に開発したソフトウエア[2]にて統合を行い、β-catenin 結合蛋白質リストを得た。

標的分子の絞り込み（機能解析の優先順位づけ）

・文献検索

これまでに報告されている文献および公開されている高次構造情報（SGC Structure Gallery, http://www.thesgc.org/structures）などを精査し、分子標的として適していると考えられる分子の優先順位づけを行った。

・臨床検体における発現確認[3)-7),9),10)]

候補分子について、大腸癌臨床検体の組織切片を用いた発現解析の結果、正常大腸上皮に比べ大腸癌細胞や腺腫細胞で発現の亢進している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治療標的候補を選択している。尚、臨床検体を用いた研究の実施にあたっては、所属機関における研究指針に従った。

・β-catenin/TCF-4 転写活性および細胞増殖への影響[2)-5),7),9)]

ヒト大腸癌培養細胞を用いて候補分子をcDNA トランスフェクションによる過剰発現、あるいはRNA 干渉によるノックダウンを行い、ルシフェラーゼアッセイ（Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega）による TCF/LEF の転写活性および細胞増殖（CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega）への影響を検討した。

結果

大腸癌細胞である DLD1 および HCT-116 の２種類の蛋白質抽出液を用いて内因性蛋白質を抗β-catenin 抗体により免疫沈降した複合体蛋白質を、低流速液体クロマトグラフィーと四重極 TOF 型質量分析機を組み合わせたシステム[2]を用い網羅的に解析した。 得られた質量スペクトル情報をデータベースを用いて検索を行ったところ、2種類の細胞について、それぞれ2回の繰り返し実験で大きな変動はなく共通して 70 種の蛋白質を同定した。このβ-catenin 結合蛋白質のリストには、β-catenin、TCF4 そして APC のみならず、既に論文等でβ-catenin との結合が報告されている E-cadherin や P-cadherin、γ-catenin である Plakoglobin そして inhibitoir of β-catenin and TCF4（ICAT）なども検出できていたことから本実験系の信頼性が示唆された。 本解析において網羅的に検出したβ-catenin 結合蛋白質を報告されている機能別に分類したところ、核酸結合蛋白質（42%）、転写因子（10%）、骨格系蛋白質（7%）、細胞接着分子（6%）が高い割合を占めていた（**図 3**）。

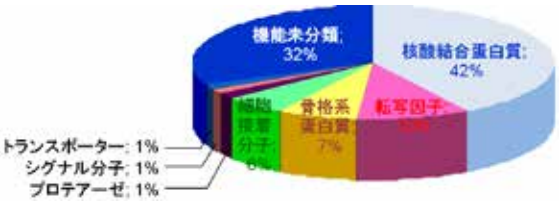

図 3. 大腸癌細胞におけるβ -catenin 結合蛋白質の機能分類

尚、現在進行中であるが、β-catenin 結合蛋白質のうち既知情報などを勘案し、大腸癌治療薬開発のための標的分子として有望な分子については大

腸癌臨床検体における発現解析や大腸癌培養細胞における転写活性および細胞増殖制御への影響について解析を実施している。

考察

日本女性の癌での最も多い死亡原因である大腸癌は、従来の殺細胞性の化学療法剤に加え、より副作用の少ない分子標的治療薬などの治療選択性が期待されている。Wnt シグナル経路の伝達因子であるβ-catenin の核内蓄積は TCF4 の転写を活性化するのみならず、癌および癌の悪性化の指標としても用いられており大腸癌の治療標的分子を探索するには格好のポイント[1]であると考えている（**図 2**）。本研究で網羅的に同定したβ-catenin 結合蛋白質のうち最も大きな割合を占めていた核酸結合蛋白質（**図 3**）には heterogenous nuclear ribonucleoprotein（hnRNP）や ribosomal protein が多く含まれていた。HnRNP は転写された直後の mRNA 前駆体結合蛋白として多く存在し、RNA からヘアピンらせんを取り除いたり、RNA スプライシングの円滑な推進に関与していることが報告されている。我々はこれまでに大腸癌細胞の核内でβ-catenin と TCF4 の結合により発現が抑制される蛋白質として Splicing factor1 を同定し、大腸発癌におけるスプライシング制御を報告している[5),6)]。また、β-catenin のパートナー分子である TCF4 についても網羅的に結合蛋白質の同定を実施しており、同様に核酸結合蛋白質が最も高い割合で含まれていた[2)]。中でも核膜孔に存在する SUMO（Small Ubiquitin-related Modifier）化の E3 ligase である RanBP2 と TCF4 との複合体形成による TCF4 の SUMO 化は核移行シグナルを持たないβ-catenin の核移行を説明する重要な知見をもたらした[2)]。さらに、TCF4 結合蛋白質の中にはセリン / スレオニンリン酸化酵素である TNIK（TRAF2 and NCK interacting kinase）が含まれており、大腸発癌過程において細胞質に存在する TNIK が核移行および自己リン酸化を伴い TCF4 をリン酸化することを報告している[7),8)]。本研究で得られたβ-catenin 結合蛋白質リストの多角的機能解析は、現在までに我々が得ている大腸癌細胞における核内イベントの知見をさらに蓄積することとなり、発癌制御メカニズムに基づいた治療標的分子の同定に繋がるものと期待している。最終的に得られた治療標的分子“シーズ”は、有効で副作用の少ない安全な癌治療薬の開発を可能にするものであり、本研究の発展により大腸癌による死亡率の低下および Quality of Life の向上を目指している。

［文献］

1）Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. Cancer Sci 2008, 99, 631-637.

2）Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Regulation of Wnt Signaling by the Nuclear Pore Complex. Gastroenterology 2008, 134, 1961-1971.

3）Idogawa M, Masutani M, Shitashige M *et al.* Ku70 and poly(ADP-ribose）polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. Cancer Res 2007, 67, 911-918.

4）Huang L, Shitashige M, Satow R *et al.* Functional interaction of DNA topoisomerase IIalpha with the beta-catenin and T-cell factor-4 complex. Gastroenterology 2007, 133, 1569-1578.

5）Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M *et al.* Involvement of splicing factor-1 in beta-catenin/T-cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing. Gastroenterology 2007, 132, 1039-1054.

6）Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Increased susceptibility of *Sfl*$^{(+/-)}$ mice to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. Cancer Sci 2007, 98, 1862-1867.

7）Shitashige M, Satow R, Jigami T, *et al*., Traf2- and Nck-interacting kinase TNIK is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. Cancer Res2010, 70, 5024-5033.

８）Satow R, Shitashige M, Jigami T, *et al*. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in *Xenopus* axis formation. J Biol Chem 2010, 285, 26289-26294.

９）Satow R, Shitashige M, Kanai Y, *et al*., β-catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. Gastroenterology 2012, 142, 572-581.

10）Satow R, Shitashige M, Kanai Y, *et al*. Combined Functional Genome Survey of Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res 2010, 16, 2518-2528.