

博士論文

タンキラーゼ阻害剤による大腸がん幹細胞の標的化と

その作用メカニズム

(Targeting of colorectal cancer stem-like cells

by tankyrase inhibitors and its mode of action)

張 明 奎

目次

序論.....	3
1 大腸がん.....	3
2 Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路.....	4
3 がん幹細胞.....	5
4 タンキラーゼ.....	7
5 大腸がん幹細胞の治療標的としてのタンキラーゼ.....	10
第1章 タンキラーゼ阻害剤によるc-KITチロシンキナーゼの発現抑制.....	16
1.1 タンキラーゼ阻害剤のがん幹細胞選択的増殖抑制効果の検証.....	16
1.2 様々な大腸がん細胞株におけるタンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性率の低下.....	19
1.3 CD44陽性大腸がん細胞におけるc-KITの発現とタンキラーゼ阻害剤による抑制.....	26
1.4 c-KITは大腸がんCD44陽性細胞の増殖と生存に寄与する.....	38
1.5 大腸がんCD44/c-KIT二重陽性細胞のがん幹細胞性.....	47
1.6 c-KITはCD44陽性大腸がん細胞におけるがん幹細胞性の維持に不可欠である.....	50
第2章 タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの減少はAXIN2の蓄積を介して生じる.....	57
2.1 タンキラーゼ阻害剤による大腸がん幹細胞様CD44陽性細胞選択的な増殖抑制作用はAXIN2蓄積を介する.....	57
2.2 タンキラーゼ阻害剤によるc-KIT発現低下のAXIN2依存性.....	62
第3章 タンキラーゼ阻害剤はAXIN2依存的にc-KIT遺伝子プロモーターの転写活性を抑制する.....	67
3.1 タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2を介したc-KIT発現制御の分子機序（プロモーター抑制）.....	67
3.2 大腸がん細胞におけるc-KITプロモーター活性に寄与する転写因子の検索.....	77
3.3 c-KITプロモーター制御における転写因子SP1の寄与.....	82

3.4 タンキラーゼ阻害剤によるSP1のc-KITプロモーターへの結合の抑制はAXIN2の蓄積に依存する.....	85
第4章 NucleolinはSP1のc-KITプロモーター領域への結合を制御する	92
4.1 タンキラーゼ阻害によるc-KIT発現抑制におけるAXIN2-SP1間に介在するシグナル因子の検討	92
4.2 タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2を介したNCLの発現抑制とNCLによるSP1制御	98
考察.....	104
引用文献.....	110
謝辞.....	117

序論

1 大腸がん

日本およびアジア地域では、食生活の欧米化などにより大腸がんの患者数が増加の傾向にあり、日本国内での罹患数は、2019年予測値として男性では約9万人に上り、各種臓器がんの中で1位を占めている。女性でも約7万人の罹患数を示し、2位に位置している。さらに、死亡数予測では男性で3位、女性で1位を占めている (https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/short_pred.html、最終アクセス日：2019年11月24日)。大腸がんは世界的にもがん死亡原因の第4位となっている。現在、大腸がんを初期に発見された場合の治療は手術療法が主流であるが、手術後の再発予防や治癒切除不能な進行がん・再発がんに対しては薬物療法が不可欠である。薬物療法としてイリノテカン (irinotecan)、オキサリプラチン (oxaliplatin) および5-フルオロウラシル (5-fluorouracil、5-FU) などが臨床で広く使用されている。イリノテカンはトポイソメラーゼ I の阻害作用を通じて細胞毒性を示し、胃がんや大腸がんでよく使用される。白金製剤であるオキサリプラチンは、転移性大腸がんや胃がんなどで5-FUと併用で使われる。5-FUは核酸合成を阻害することで制がん効果を示し、乳がんや消化器がんによく使われている。さらに、FOLFOX (レボホリナート・フルオロウラシル・オキサリプラチンの3剤を用いた治療) (1)、FOLFIRI (レボホリナート・フルオロウラシル・イリノテカンの3剤を用いた治療) (2) 療法などの化学療法や、ベバシズマブ [抗vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体] (3)、レゴラフェニブ (VEGRや発がんに関与するKITやplatelet-derived growth factor receptor (PDGFR) を標的としたキナーゼ阻害剤) などの分子標的薬が用いられている。しかしながら、これらの薬物治療の効果は十分なものではなく、耐性化による病勢の進展や再発が生じるため、新たな治療薬の開発が必要となっている。

2 Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路

大腸がんはadenoma-carcinoma sequenceと呼ばれる多段階発がん過程を経て生じる。まず、がん抑制遺伝子adenomatous polyposis coli (APC)に機能喪失型変異が入り、そのあとGTPase活性をもつがん原遺伝子KRASの機能獲得型変異や、DNA修復や細胞増殖停止などに関与するがん抑制遺伝子TP53の機能喪失型変異などを経て、前がん病変から悪性の大腸がんへと進展する。これらの一連の遺伝子変異に伴って変化するシグナル伝達経路のなかでも、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は最も高頻度に認められる。すなわち、約80%の大腸がんではAPCの機能喪失型変異もしくは β -カテニンの機能獲得型変異を持っているため、 β -カテニンが細胞内に蓄積し、Wnt標的遺伝子の発現が上昇することでがんが増殖する。異常に亢進したWnt/ β -カテニンシグナルは、腫瘍の成長と浸潤、がん幹細胞(次項参照)の維持、発がんの調節に重要な役割を果たすことが知られている。Wnt/ β -カテニンシグナルはさらに、細胞の運動、アポトーシスおよび分化にも寄与している。 β -カテニンはE-カドヘリンと複合体を形成する一方で、Wntリガンドが存在しない場合、細胞質中に存在する β -カテニンはAPC、casein kinase 1 (CK1)、AXINおよびglycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)と結合して複合体を形成している(4,5)。GSK3 β は β -カテニンをリン酸化し、それによってユビキチン化とプロテアソームによる分解を引き起こす(6)。具体的には、 β -TrCP (β -transducin repeat containing protein)と呼ばれるF-boxタンパク質を介したポリユビキチン化によってプロテアソーム分解が引き起こされ、 β -カテニンのレベルが低く維持される。一方、Wntリガンドによる刺激を受けると、上記の複合体において β -TrCP依存的なポリユビキチン化が起きなくなり、 β -カテニンが核内に蓄積し、転写因子TCF/LEFと複合体を形成して標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。Wnt/ β -カテニンシグナル経路は、抗がん剤の標的として攻略しやすい因子を持たず、undruggableと考えられてきた。

3 がん幹細胞

腫瘍は不均一ながん細胞および様々な非がん細胞の集団で成り立っており、さらにこのがん細胞集団の中に「がん幹細胞」と呼ばれる腫瘍形成や薬剤抵抗性の核となる亜集団が含まれることが近年、示されてきた(図2)。がん幹細胞は高い自己複製能や造腫瘍性をもつとともに、薬剤療法と放射線療法に耐性であり、がんの再発に寄与すると考えられている(7,8)。これまでの研究では、白血病(9)、乳がん(10)、脳腫瘍(11)、前立腺がん(12)、膵臓がん(13)、胃がん(14)、大腸がん(15)など、さまざまな種類のがんにがん幹細胞が存在することが報告されている。大腸がんにおいては、CD44(16)やLgr5(17)などの幹細胞関連細胞表面抗原を発現するがん細胞の亜集団の中に、がん幹細胞と思われる特性を持つ細胞が存在する。そのうちCD44は、ヒアルロン酸などのリガンドと結合することが知られている。また、選択的なスプライシング (alternative splicing) によるバリエーションが存在する。その中でもCD44v9は、細胞膜においてシスチントランスポーターのxCTと結合し、このxCTがシスチンを細胞内に取り込むことでグルタチオン生成を促進する。これにより、がん細胞内の活性酸素の蓄積が抑制される。すなわち、CD44はがん幹細胞のマーカーであるばかりでなく、がん細胞の維持に機能している(18)。一方、Wntの標的遺伝子であるLgr5は当初、正常幹細胞のマーカーとして同定されたが(19)、APCが欠損することでadenomasを形成するのはLgr5陽性細胞であることも知られている(17)。Wntシグナルの高い活性によりLgr5陽性となる細胞は大腸がん幹細胞として機能すると考えられる(20)。このことから、Lgr5は大腸がん幹細胞を識別する重要な分子であると考えられる。

がんを完全に根絶するには、がん幹細胞を攻撃する治療薬の開発が必要と考えられる(図1)。がん幹細胞の標的経路として注目されているものの一つとして、免疫、分化、アポトーシスなどに関与するSTAT3シグナル伝達経路 (別名 : JAK-STATシグナル伝達経路) が挙げられる。STAT3シグナル伝達経路を標的とするナパブカシン(BBI 608)(21)や、様々な悪性腫瘍で高発現し、細胞周期・細胞増殖や腫瘍形成に関わるmaternal embryonic leucine zipper kinase (MELK)の選択的阻害剤であるOTS167など(22)、がん幹細胞を標的とするいくつかの化合物が開発され、臨床試験中である。しかし、承認に至ったがん幹細胞標的薬は未だにない。

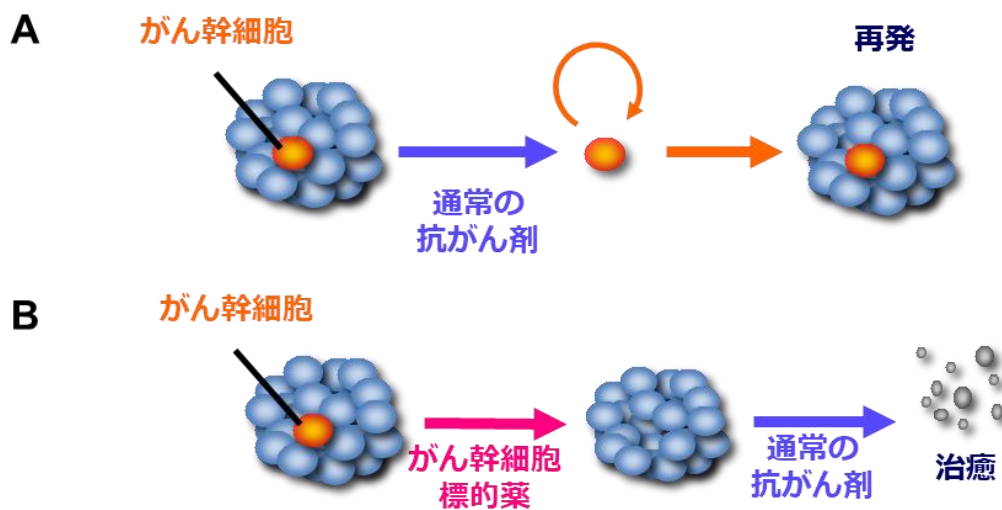


図1. がん幹細胞によるがんの再発とこれを標的とした治療戦略

A: がんに従来の抗がん剤を処理してもがん幹細胞が残存し、再発に繋がる可能性がある。

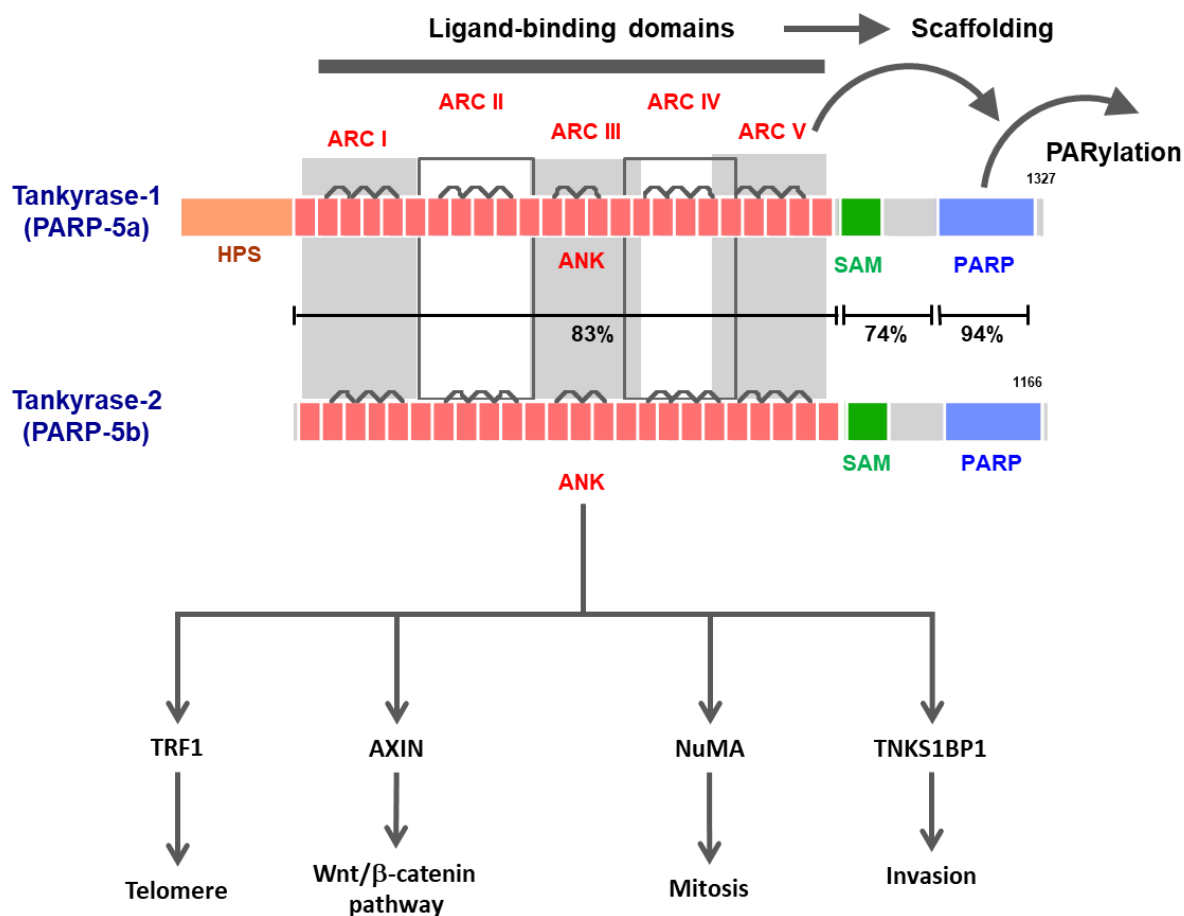
B: がん幹細胞標的薬と従来の抗がん剤を併用することで、がん幹細胞と非幹がん細胞の両方を攻撃し、がんの根治を達成できる可能性がある。

4 タンキラーゼ

タンキラーゼはポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)ファミリーのメンバーであり、テロメア合成酵素テロメラーゼ(23,24)によるテロメア伸長を促進する因子として同定された(25)。テロメアは、TTAGGGの繰り返し配列とその結合タンパク質で構成される複合体であり、染色体の末端に存在する。ヒト正常体細胞では、DNAポリメラーゼが直鎖状DNAの最末端を複製できないといういわゆる末端複製問題(end replication problem)から、テロメアはDNAの複製時に少しずつ短縮する(26)。正常細胞はこのテロメア短縮によって細胞死や細胞老化に導かれる(27)。しかし、がん細胞では逆転写酵素の一種であるテロメラーゼが活性化することによってテロメア長が維持される。これにより、がん細胞は無限の分裂能を獲得している。ポリADPリボシル化(PAR化)は、NAD⁺を基質としてADP-リボースをタンパク質に連鎖付加する翻訳後修飾であり、PARPによって触媒される。PARPをコードする遺伝子ファミリーは、PARP-1の触媒領域と相同性を有する18のメンバーで構成されている(28)。しかし、この18メンバーのうち、PARP活性を持つのは6つ[PARP1、PARP2、PARP3、PARP4、PARP5a(タンキラーゼ1)、PARP5b(タンキラーゼ2)]のみである。残りの10のメンバーはモノ(ADP-リボシル)化を触媒する酵素であり、あとの2つは酵素活性が確認されていない(29)。

ポリ(ADP-リボース)代謝は、DNA修復、転写調節、テロメア長の調節などに重要であることが知られている。タンキラーゼには、HPS(histidine-proline-serine)ドメイン、ANK(ankyrin)ドメイン、SAM(sterile α -motif)ドメイン、PARPドメインの4つの領域が存在する。ANKドメインにはさらにアンキリンリピートクラスター領域(ANK repeat cluster: ARC)が存在し、このARCを通じてtelomeric repeat-binding factor 1(TRF1)(25,30)、NuMA(31)、TNKS1BP1(32)などのタンキラーゼ結合モチーフ配列RXXPDG(33)を有するタンパク質を認識する。これによって、テロメア伸長、有糸分裂、細胞運動などの様々な生物学的プロセスが制御される(図2)(25,30-32,34)。テロメアにおいては、タンキラーゼはテロメア伸長抑制因子TRF1をPAR化することでこれをユビキチン分解へと導く(25)。タンキラーゼはまた、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の正の調節因子として機能する(35)。Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路においては、上述の通り、 β -カテニンがTCF/LEFと複合体を形成して標的遺伝子の発現を誘導する(36)。ここで、タンキラーゼは β -カテニンの負の制御因子であるAXINの働きを抑制する。すなわち、AXINはタンキ

ラーゼ結合モチーフを有しており(33,35)、タンキラーゼによってPAR化され、E3ユビキチン-タンパク質リガーゼであるRNF146によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される(37)。AXINの分解は活性型 β -カテニンの核内蓄積を引き起こし、TCF/LEF標的遺伝子の転写を促進する。XAV939(35)、IWR-1(38)、G007-LK(39)、RK-0287107(40)などのタンキラーゼ特異的PARP阻害剤（以下、タンキラーゼ阻害剤）はAXINのPAR化を抑制し、同タンパク質の蓄積を誘導することで、 β -カテニンの分解を促す(41)。これにより β -カテニンシグナルが遮断され、同シグナルに依存した大腸がん細胞の増殖が抑制される(35)。大腸がんの中でも特に、APCが「短鎖型」(後述)の欠失変異を起こし、 β -カテニンシグナルへの依存性が高まっているものがタンキラーゼ阻害剤に感受性を示すことがわかっている(42)。すなわち、APCには20-amino acid repeats (20-AARs)と呼ばれる7回繰り返し領域があり、 β -カテニンがこの領域に結合することによって分解を受けている。全ての20-AARsを完全欠失した「短鎖型」のAPC変異は β -カテニンを分解することができない。したがって、そのような変異により20-AARsを完全に失った大腸がん細胞では β -カテニンシグナルが強く活性化し、このシグナルへの依存性が高まる。ここにタンキラーゼ阻害剤を処理すると、蓄積したAXIN2によって β -カテニンが分解され、細胞増殖が抑制される(42)。



HPS: homopolymeric runs of His, Pro, and Ser
ANK: ankyrin
ARC: ankyrin repeat clusters
SAM: sterile alpha motif
PARP: poly(ADP-ribose) polymerase

図2. タンキラーゼの構造と様々な結合タンパク質および分子機能

タンキラーゼは分子内のARCを介し、テロメア伸長抑制因子TRF1、Wnt/β-カテニンシグナル抑制因子AXIN、細胞分裂制御因子NuMA、細胞運動・浸潤制御因子TNKS1BP1などに結合し、これらをPAR化修飾することでそれぞれの生理機能を制御する。

5 大腸がん幹細胞の治療標的としてのタンキラーゼ

私は東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻の修士学位論文 (Jang Myung Kyu, Screening of the compounds that preferentially target colorectal cancer stem cells, 2017)

において、大腸がん幹細胞を標的とする化合物の探索を行い、同定された化合物のメカニズム解析を行った。ヒト由来大腸がんCOLO-320DM細胞は、がん幹細胞のマーカーであるCD44分子の発現に不均一性を持つ。私は、フローサイトメトリーによるセルソーティングでCOLO-320DM細胞をCD44陽性・陰性細胞に分離し、CD44陽性細胞分画がマウスゼノグラフト実験で高い造腫瘍性を示すとともに、その他のがん幹細胞マーカーであるLGR5、LRIG1などが高く発現していることを確認した。さらに、分離した細胞を継代培養し続けることで、CD44陽性率が分離前のレベルに戻る「可塑性」を有することも確認した。これらのことから、COLO-320DM CD44陽性細胞はがん幹細胞性を有すると判断した(図3)。

そこでこのCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を用いて、CD44陽性細胞により強い増殖抑制効果を示す化合物のスクリーニングを実施した。スクリーニングは、文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』化学基盤支援活動より頂いた標準阻害剤キット(4つのキットで構成され、キット1と2は従来の抗がん剤および様々なタンパク質をターゲットとする阻害剤で構成される。キット3は様々なキナーゼ阻害剤で構成される。キット4は臨床で承認されている分子標的薬で構成され、計325種類の化合物が含まれている)を用いてCOLO-320DM CD44陽性細胞に選択的な増殖抑制効果を示す化合物の探索として1次スクリーニングを行い、1次スクリーニングより選別された化合物をCOLO-320DM細胞に処理するかたちで2次スクリーニングを行った。2次スクリーニングでは、CD44陽性分画を減少させる化合物の選別を行った。1次および2次スクリーニングの結果、タンキラーゼ阻害剤IWR-1とcdc2-like kinaseの阻害剤であるTG003を同定した。検証実験でスクリーニング結果の再現性を確認したところ、真のヒット化合物としてタンキラーゼ阻害剤を同定した(図4)。この結果を踏まえ、in vivoゼノグラフトモデルにおいて低用量のタンキラーゼ阻害剤とイリノテカンの併用が顕著な制がん効果を示すことを見出した(図5)。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤は大腸がん幹細胞に選択性を示し、抗がん剤の効果を増強させる可能性があることを報告した。ここで興味深いことに、タンキラーゼ阻害剤を処理した際のAXINの蓄積とそれに伴うβ-カテニンの減少(図6, 7)には、CD44陽性・陰性細胞で特に差が認められ

なかったことから、 β -カテニンの減少はCD44陽性細胞選択的な増殖抑制には関与していないと結論づけた。すなわち、タンキラーゼ阻害剤によるCOLO-320DM CD44陽性細胞に対する細胞増殖抑制の選択性については、メカニズムが全くの不明であった。そこで博士課程における本研究では、タンキラーゼ阻害剤がCD44陽性大腸がん幹細胞の増殖をより強く抑制する分子メカニズムを解明することを目的として、以下の実験を行った。

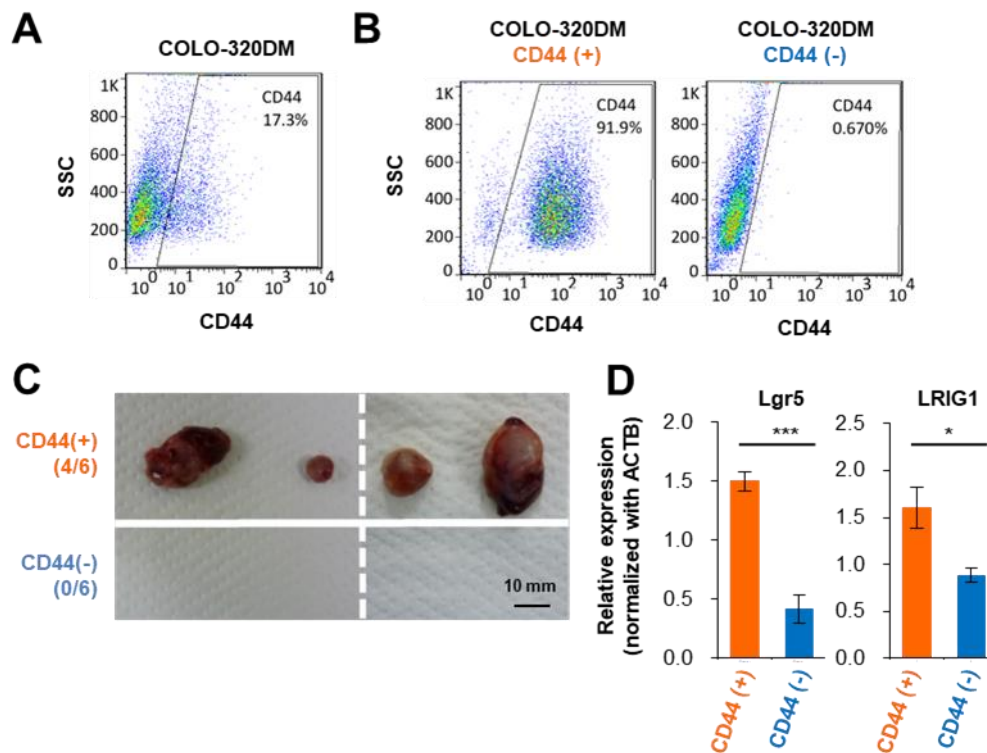


図3. COLO-320DM CD44陽性細胞はがん幹細胞様の性質を示す（修士学位論文データ）

A: COLO-320DM細胞のCD44陽性率をフローサイトメトリーにより検討した。

B: FACS Ariaを用いてCOLO-320DM細胞よりCD44陽性・陰性細胞をソーティングし、フローサイトメトリーで分離効率を確認した。

C: Bで分離されたCD44陽性・陰性細胞を1,000 cells/siteでNOD-SCIDマウスの皮下に移植し、52日目に採材した腫瘍サンプルの写真。CD44陰性細胞からは腫瘍が形成されなかった。

D: CD44陽性・陰性細胞よりRNAを抽出し、がん幹細胞マーカー遺伝子LGR5およびLRIG1の発現をRT-qPCRで評価した。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$

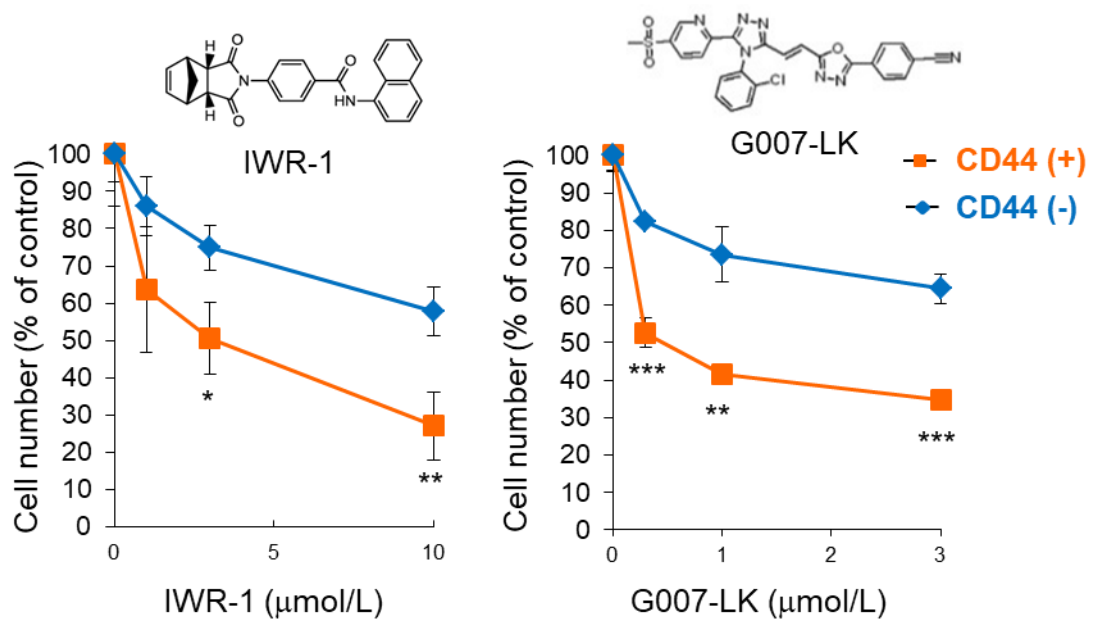


図4. タンキラーゼ阻害剤はCD44陽性大腸がん細胞の増殖をより強く抑制する（修士学位論文データ）

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞に様々な濃度のタンキラーゼ阻害剤 (IWR-1およびG007-LK) をX時間処理し、細胞数をXX法で定量した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

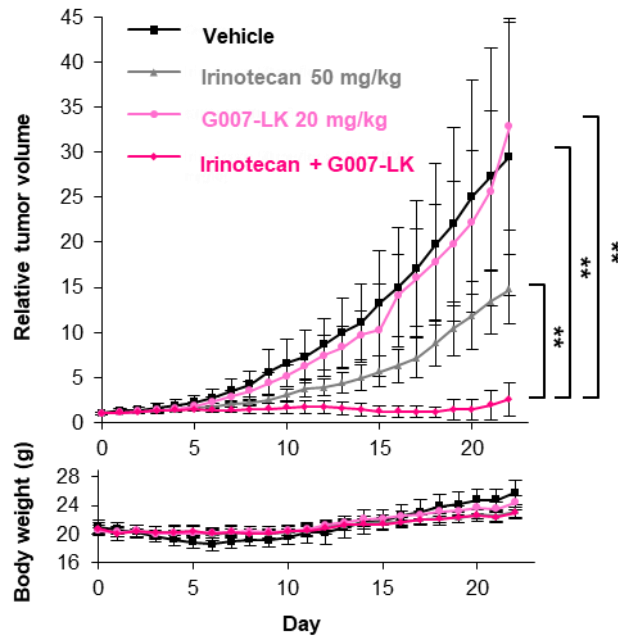


図5. タンキラーゼ阻害剤はイリノテカンの制がん効果を増強する（修士学位論文データ）
 COLO-320DM細胞を皮下移植したヌードマウスに対し、イリノテカンをday 0、7に、タンキラーゼ阻害剤 G007-LKをday 1、2、3、4、5、8、9、10、11、12に投与した。上のグラフは腫瘍サイズ、下のグラフは体重の変化を表す。 $**P < 0.01$



図6. タンキラーゼ阻害剤によるWnt/β-カテニンシグナル経路の抑制

タンキラーゼ阻害剤はAXINのPAR化を阻害してその蓄積を促し、これによってβ-カテニンの分解が誘導される。

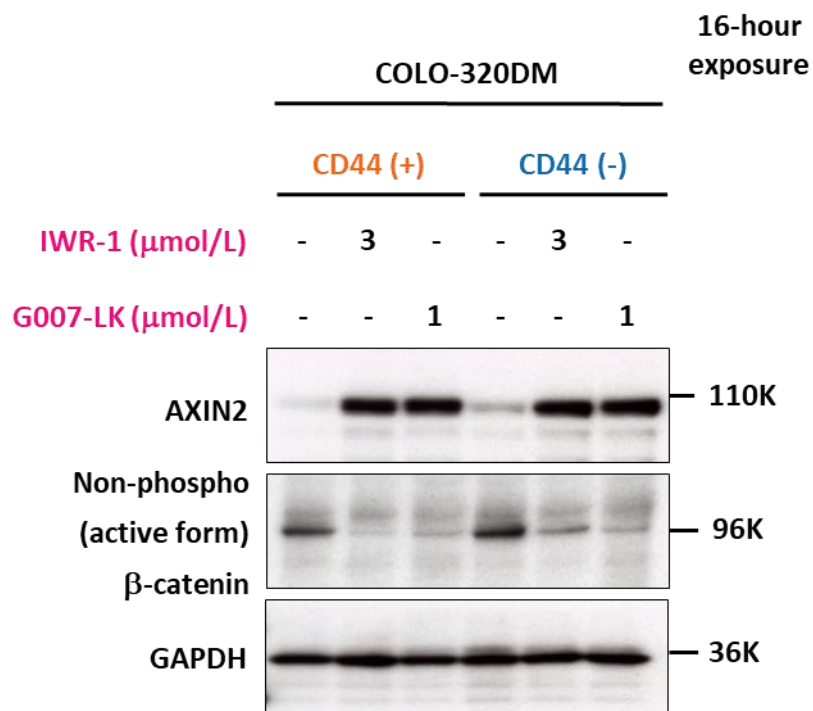


図7. COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞のWnt/β-カテニン経路に対するタンキラーゼ阻害剤の作用（修士学位論文データ）

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤（IWR-1およびG007-LK）を16時間処理したのち、タンパク質を抽出してウェスタンブロット解析を行った。CD44陽性・陰性細胞間でAXIN2の蓄積とその下流のβ-カテニンの低下には差が認められなかった。

第1章 タンキラーゼ阻害剤によるc-KITチロシンキナーゼの発現抑制

1.1 タンキラーゼ阻害剤のがん幹細胞選択的増殖抑制効果の検証

【目的】

私は修士学位研究において、タンキラーゼ阻害剤IWR-1およびG007-LKがヒト由来大腸がん幹細胞様COLO-320DM CD44陽性細胞に対して、CD44陰性細胞と比較してより強い増殖抑制効果を示すことを見出した。そこで本項では、これら以外の3種類のタンキラーゼ阻害剤がCOLO-320DM CD44陽性細胞に対して同様の効果を示すか検討する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株COLO-320DM細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より入手し、RPMI1640培地 (ナカライテスク) に非働化済みのFBS (fetal bovine serum、最終濃度10%) および0.05 g/mLのカナマイシンを1 mL (最終濃度1 µg/mL) 加えたメEDIUMで、37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。培養には10 cmディッシュ (IWAKI) を用いた。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

COLO-320DM細胞をTrypsin/EDTAを用いてディッシュからはがした。はがれた細胞は血清入り培地で懸濁し、1,000 rpm, 4°Cで3分間遠心してペレットとして回収した。その後、suspension buffer [25 mM HEPES (pH 8.0) , 1 mM EDTA, 0.5 % FBSをphosphate buffered salt (PBS) (-) 40 ml に添加] で懸濁し、1次抗体のマウス抗ヒトCD44抗体 (BD biosciences、550989) を添加して4°Cで1時間反応させた。反応後、suspension bufferで2回洗浄した。さらに1 mLのsuspension buffer

で懸濁した。得られた細胞懸濁液をFACSAria (BD) にかけて、CD44陽性・陰性分画にソーティングした。sortingした細胞は培地で洗浄後、6 well plateに播種し、37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養を行った。

3. 薬剤感受性試験 (MTTアッセイ)

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞をいずれも350 cells/80 μ L/wellの密度で96-well plateに播種した。翌日にタンキラーゼ阻害剤XAV939(35)、JW55(43)、RK-287107(40)を最終濃度が0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ mol/Lとなるように添加し、5日間培養した。その後、PBS(-)で2.5 mg/mLとなるように溶解した3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (ナカライテスク) を各ウェルに培養液の1/5量加え、37°C、5% CO₂のインキュベーターで4時間培養した。その後、培養液を取り除き100 μ LのDMSO (dimethyl sulfoxide) を添加し、1時間室温にて静置したあと、570 nmおよび630 nmの吸光度をxMark™ Microplate spectrophotometer (Bio-Rad) で測定した。

【結果】

タンキラーゼ阻害剤JW55、XAV939、RK-287107をCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞に加え、増殖阻害効果を比較した。その結果、いずれの阻害剤もCD44陰性細胞よりもCD44陽性細胞に対してより強い増殖抑制効果を示すことが確認された (図8)。

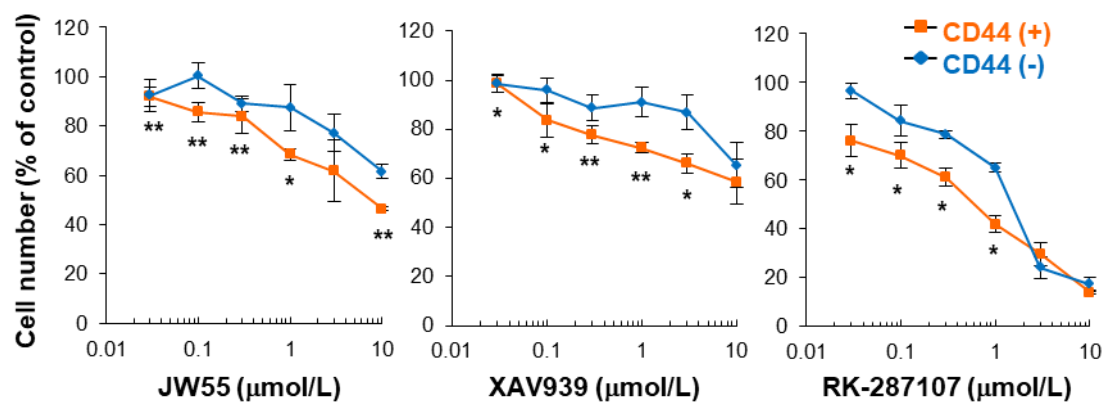


図8. COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞増殖に対するタンキラーゼ阻害剤の効果

FACS Ariaを用いてソーティングしたCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤

(JW55、XAV939、RK-287107) を5日間処理し、細胞数をMTT assayで定量した。* $P < 0.05$ 、

** $P < 0.01$

1.2 様々な大腸がん細胞株におけるタンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性率の低下

【目的】

修士課程の学位研究において、タンキラーゼ阻害剤処理によるCD44陽性率の変動を検討したのは、COLO-320DM細胞のみであった。タンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性率の変動が他の大腸がん細胞株でも観察されるかについて検討するため、様々な大腸がん細胞株および患者由来大腸がん細胞にタンキラーゼ阻害剤を処理し、CD44陽性率の変動をフローサイトメトリーで検討する。

【方法】

1. 細胞培養

1.1 細胞株

ヒト大腸がん細胞株COLO-320DM、DLD-1、HCT15、HT29、LS174T、KM12、HCC2998、COLO-201、COLO-205、SW1417、SW403とHCC2998細胞は、ATCCより入手した。COLO-320DM、DLD-1、HCT15、HT29、HCC2998、COLO-201、COLO-205細胞は、RPMI1640に非働化済みのFBS（最終濃度10%）および0.05 g/mLのカナマイシンを1 mL（最終濃度1 µg/mL）加えたメディウムで、37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。LS174TとKM12細胞は、DMEM/F-12に非働化済みのFBS（最終濃度10%）および0.05 g/mLのカナマイシンを1 mL（最終濃度1 µg/mL）加えたメディウムで、37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。SW1417細胞はLeibovitz's L-15に非働化済みのFBS（最終濃度10%）および0.05 g/mLのカナマイシンを1 mL（最終濃度1 µg/mL）加えたメディウムで37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。いずれも培養には10 cmディッシュを用いた。

1.2 患者腫瘍由来大腸がん細胞

患者腫瘍由来大腸がん細胞を用いた以下の実験は全て、公益財団法人がん研究会倫理審査委員会 (institutional review board: IRB) の事前承認のもと、研究対象者 (患者) からの同意を得て実施した。大腸がん患者腫瘍組織から樹立された大腸がん細胞JC11、JC20、JC26、JC33、JC35およびJC36は、がん研有明病院消火器外科・長山聡医長が採取した患者腫瘍から、公益財団法人がん研究会がん化学療法センター基礎研究部・片山量平部長および青山 (フルネーム) 研究生が樹立したものをを用いた。患者臨床情報は電子医療記録から取得した。JC33細胞はDMEM/F-12に非働化済みのFBS (最終濃度10%) に0.05 g/mLのカナマイシンを1 mL (最終濃度1 µg/mL) 加えたメEDIUMで、37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。それ以外の細胞は、StemPro hESC serum- and feeder-free medium (SFM) (最終1×)、1.8% Bovine serum albumin (BSA)、8 ng/mL Basic fibroblast growth factor (bFGF)、0.1 mM 2-メルカプトエタノールと10 µM Y-27632を添加したDMEM/F-12+GlutaMAX (1×) を用いた。培養には10 cmディッシュを用いた。

2. フローサイトメトリー

細胞回収は1.1に記載した方法に準じて行った。得られた細胞ペレットをsuspension bufferで懸濁し、1次抗体のマウス抗ヒトCD44抗体を添加し、4°Cで1時間反応させた。反応後、suspension bufferで2回洗浄した。その後、suspension bufferで再懸濁を行い、FACSCalibur (BD biosciences) で解析し、CD44陽性細胞の比率を定量した。

【結果】

大腸がん細胞株DLD-1、HCT15、HT29、LS174T、KM12、HCC2998、COLO-201、COLO-205、SW1418、SW403 (図9~12) および患者由来細胞JC11、JC20、JC26、JC33、JC35、JC36にタンキラーゼ阻害剤IWR-1 (最終濃度3 µmol/L) もしくはG007-LK (最終濃度1 µmol/L) を120時間処理したときのCD44陽性率を測定した。その結果、DLD-1、HCT15、HT29、LS174T、JC11、JC33細胞においてCD44陽性率の低下が認められた (図9、図10A)。一方、HCC2998、SW403、JC35、JC36細胞では、タンキラーゼ阻害剤を処理してもCD44陽性率が変動しないか、もしくは軽微に

上昇する傾向が観察された（図10B、11、図12）。COLO-201、COLO-205およびSW1418ではもともとCD44陽性率が低く、タンキラーゼ阻害剤によるさらなる低下を評価することは困難であった（図12）。以上のように、タンキラーゼ阻害剤は様々な大腸がん細胞においてCD44陽性率を低下させるが、この現象がすべての細胞株で認められるわけではないことが明らかとなった。

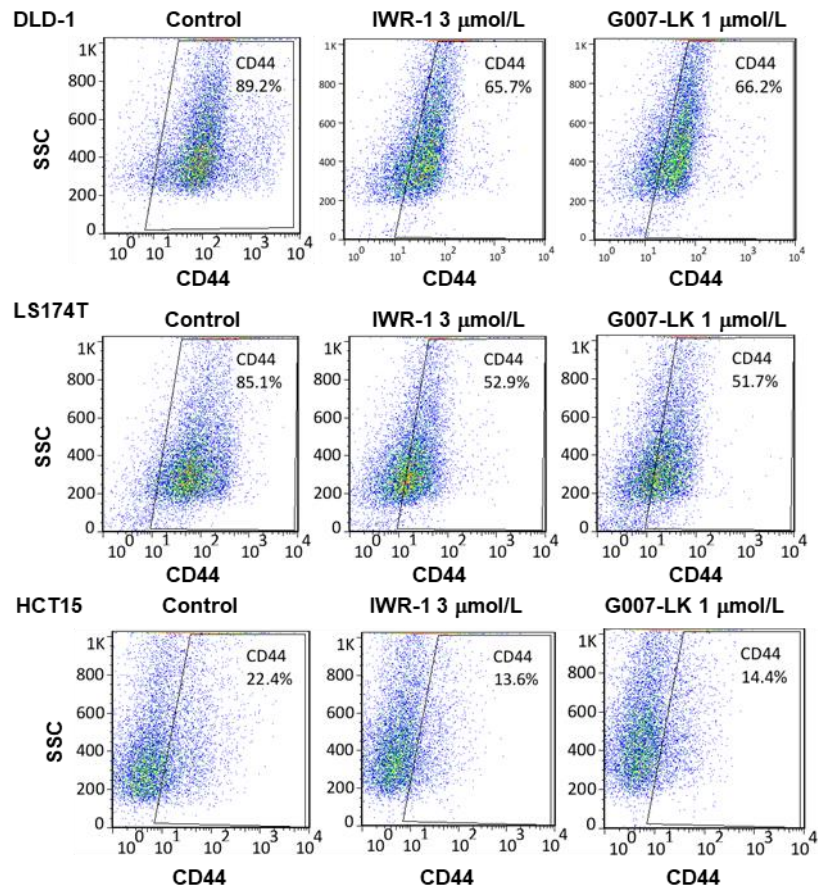


図9. タンキラーゼ阻害剤による大腸がん細胞CD44陽性率の変動（変動の認められた細胞株）

大腸がん DLD-1、LS174T および HCT15細胞にタンキラーゼ阻害剤 IWR-1もしくは G007-LK を図中の濃度で5日間処理し、CD44陽性率の変動をフローサイトメトリーで評価した。

SSC: side scatter

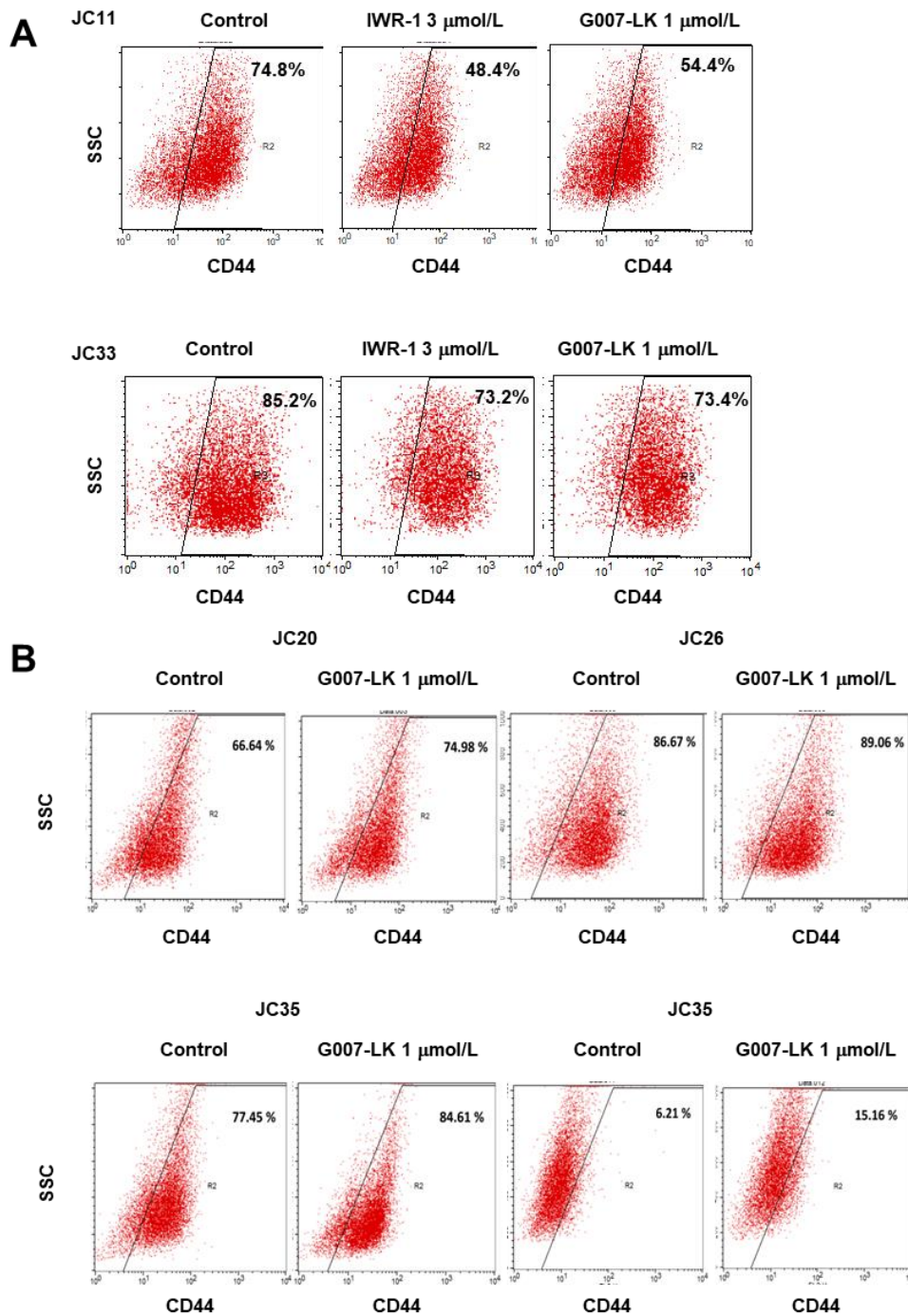


図10. タンキラーゼ阻害剤による大腸がんCD44陽性細胞率の変動（患者由来細胞群）

A: JC11、JC33細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1もしくはG007-LKを図中の濃度で5日間処理し、フローサイトメトリーでCD44陽性率の変動を評価した。SSC: side scatter

B: JC20、JC26、JC35およびJC36細胞にタンキラーゼ阻害剤G007-LKを図中の濃度で5日間処理し、フローサイトメトリーでCD44陽性率の変動を評価した。

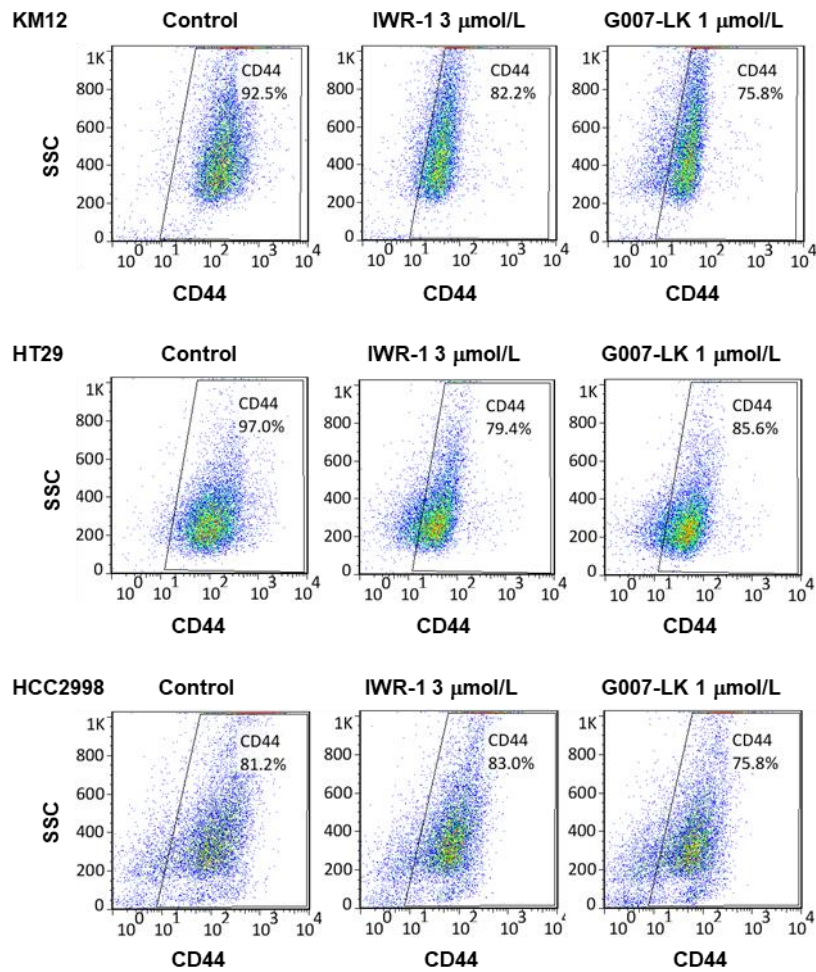


図11. タンキラーゼ阻害剤による大腸がんCD44陽性細胞率の変動（変動が軽微であった細胞株）

KM12、HT29およびHCC2998細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1もしくはG007-LKを図中の濃度で5日間処理し、CD44陽性率の変動をフローサイトメトリーで評価した。SSC: side scatter

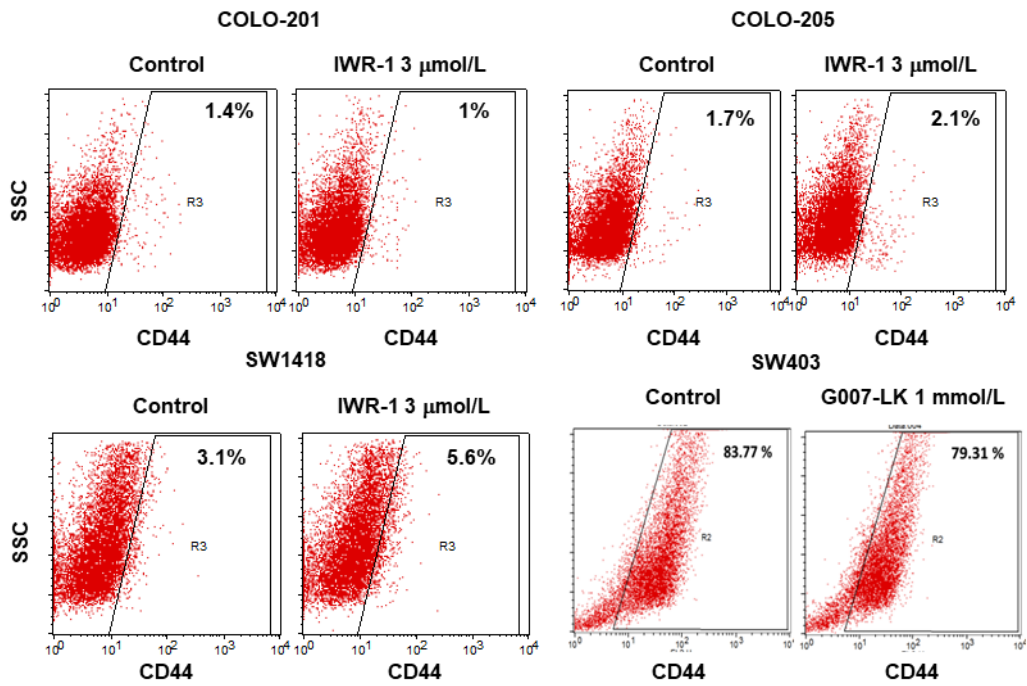


図12. タンキラーゼ阻害剤による大腸がんCD44陽性細胞率の変動（変動の認められなかった細胞株）

COLO-201、COLO-205、SW1418および SW403細胞にタンキラーゼ阻害剤 IWR-1もしくは G007-LK を図中の濃度で5日間処理し、CD44陽性率の変動をフローサイトメトリーで評価した。 S
SC: side scatter

1.3 CD44陽性大腸がん細胞におけるc-KITの発現とタンキラーゼ阻害剤による抑制

【目的】

タンキラーゼ阻害剤処理がCD44陽性細胞の増殖をより強力に抑制するメカニズムを明らかにするため、COLO-320DM細胞より分離したCD44陽性・陰性細胞について網羅的遺伝子発現解析を行い、CD44陽性細胞でより高く発現し、かつタンキラーゼ阻害剤処理で発現が変動する遺伝子を同定する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の培養は1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1とJC33細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。患者由来JC7、13、19、32、37、39、47、48、49、52、53、55、56、58、61細胞は、2.2で使用したメディウムで培養を行った。そのうち、JC7、39、47、49、52、58、61細胞の培養には10 cm コラーゲンディッシュ (IWAKI) を用いた。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1で述べた方法に準じて行った。

3. ウェスタンブロッティング

細胞ペレットにWhole Cell Lysis Buffer (WCE) [150 mM NaCl、500 mM Tris-HCl (pH 8)、1%Nonidet P-40 (NP-40) (ナカライテスク) に2% protease inhibitor cocktail (ナカライテスク、25955-11)、1% PhosSTOP (Roche、04906837001)、150 mMジチオスレイトールを添加したものを]を加えて懸濁し、10分ごとにボルテックス攪拌しながら氷上で30分静置した。その後、同液を15,000 rpm、4°Cで30分間遠心し、上清をWhole Cell Lysateとした。同サンプルについて、

Bio-Rad protein assay Dye reagent (Bio-Rad) を用いてタンパク質定量を行った。サンプルのタンパク質濃度が1 mg/mLになるように、蒸留水および5×SDS sample buffer (250 mM Tris pH6.8、10% SDS、50% Glycerol、0.25% Bromophenol blue、10% 2-Mercaptoethanol) を混和して調整し、100°Cで5分間煮沸した。ポリアクリルアミドゲル (ナカライテスク、32778-34) に15 µgのサンプルと分子サイズマーカー (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards、57318) をロードし、30 mAで1時間泳動した。その後、Immobilion-P Membrane PVDF (Poly vinylidene difluoride, MILLIPORE) をmethanol (ナカライテスク) に5分程度浸漬した。泳動後のゲルをImmobilion-P Membraneにtransferするため、ゲルからタンパク質をmembraneにtransferさせるEL-8Fを用いて45Vで30分、続いて90Vで60分間transferした。その後、メンブレンをponceau溶液 (2% ponceau S、5% 酢酸) で染色し、タンパク質の存在量を確認した。このメンブレンを5% Skim milkまたは5% BSAに浸漬し、1時間ブロッキングを行った。次いで、5% skim milkまたは5% BSAで希釈した1次抗体にメンブレンを浸し、4°Cで一晩反応させた。1次抗体の反応後はTBST (1×Tris-buffered saline (TBS) 、0.1% Tween20) で10分間3回洗浄し、5% skim milkまたは5% BSAで希釈した2次抗体 (ECL™抗マウスIgG、Goreradishペルオキシダーゼ結合ホール抗体、NA931VおよびECL™抗ウサギIgG、Goreradishペルオキシダーゼ結合ホール抗体、NA934V) とメンブレンを室温で1時間反応させた。その後、TBSTで5分、10分、15分で各1回ずつ、5分で3回の計45分間洗浄を行った。ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて現像を行い、タンパク質の検出を行った。使用した1次抗体は以下の通りである。抗c-KIT [(sc-365505、sc-168、Santa Cruz Biotechnology、2 µg/mL) (3074S、Cell Signaling Technology、1:1000)] 、抗phospho-c-KIT (Y703) (3073S、Cell Signaling Technology、1:1000) 、抗phospho-c-KIT (Y719) (3391S、Cell Signaling Technology、1:1000) 、抗AXIN1 (2087S、Cell Signaling Technology、1:500) 、抗AXIN2 (2151S、Cell Signaling Technology、1:500) 、抗TNKS1/2 (sc-8337、Santa Cruz Biotechnology、2 µg/mL) 、抗non-phosphorylated form of β-カテニン (active β-カテニン) (05-665、Millipore、2 µg/mL) 、抗グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (FL-335、Santa Cruz Biotechnology、0.1 µg/mL) 。

4. GeneChipマイクロアレイ解析

細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して添付のプロトコルに従い、RNAを精製した。GeneChip3' IVT Express Kit (Affymetrix) を用いてこのRNAからcDNAを合成したのち、ビオチン化RNA (=aRNA) を合成した。このaRNAをフラグメント化し、Bioanalyzer (Agilent Technology) を用いてRNAの純度を測定した。合成したプローブを使用して、Affymetrix Human Genome U133 plus2.0 array Chipを用いてハイブリダイゼーション、染色、洗浄を行った。詳細は添付のプロトコルに従って行った。その後、GeneChip Scanner (Affymetrix) によりシグナルを検出した。

5. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

マイクロアレイ解析より得られたシグナルよりプローブセットID、データの正規化、アライメントと遺伝子タイトルの初期データ処理については、Gene Spring GX12 (Agilent Technology) を使用して行った。次に、COLO-320DM CD44陽性細胞群とCD44陰性細胞群の発現遺伝子群の違いをGSEA法 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>、最終アクセス日：2017年05月27日) (44) で解析した。

6. フローサイトメトリー

1.2に記載した方法に準じて行った。

7. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

細胞をディッシュから剥がし、1,000 rpm, 4°Cで3分間遠心し、ペレットを回収した。このペレットをPBSで一度洗浄し、もう一度遠心し、ペレットを回収した。得られた細胞ペレットより、RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mixを用いて、回収したRNAよりcDNAを合成した。LightCycler® 480 Probes Master (Roche) を用いて、

qPCRを行った。合成したcDNA 25 ngに対してProbes Master 2×Conc. 7.5 μl、10 μMのプライマーセット 0.3 μLずつおよびプローブ 0.3 μLを加え、全量が15 μLになるように調整した。内部標準としてACTBの発現量も測定し、この値を用いて当該遺伝子の発現量の値を補正した。用いたプライマーは以下のとおりである（表1）。

表1

因子名	フォワード	リヴァース	プローブ番号
c-KIT	5'-gcttaccagaagcttccatagtg-3'	5'-aggatgaactgcaaatacataggg-3'	6
TNC	5'-gacttcagcacaacccctct-3'	5'-tgagagcatcccagctaacc-3'	82
ANXA2	5'-gaaagtagcgcaagtcctgt-3'	5'-caccatttctggacgctca-3'	22
LGR5	5'-accagactatgcctttggaac-3'	5'-ttcccagggagtggattctat-3'	78

【結果】

タンキラーゼ阻害剤のCD44陽性細胞選択的作用のメカニズム解析を行うにあたり、まずCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞におけるタンキラーゼのタンパク質発現量を比較した。その結果、CD44陽性・陰性細胞間で同タンパク質の発現レベルに差は認められなかった（図13）。タンキラーゼ阻害剤はタンキラーゼを自己PAR化し、タンパク質の安定性を上昇させるが、タンキラーゼ阻害剤IWR-1を処理することで3 μmol/Lではタンキラーゼタンパク質が減少し、10 μmol/Lではあまり変化が認められなかった。一方、G007-LKを処理することでIWR-1の10 μmol/Lを処理するときと同じように1 μmol/Lでは特に変化が認められなかったが、3 μmol/L処理で自己PAR化し、タンキラーゼタンパク質が上昇した。しかし、2種類のタンキラーゼ阻害剤処理による効果は、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞間で同様に見られた。

次に、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞間で発現レベルに差のある遺伝子を探索するため、両細胞から抽出したRNAを用いてGeneChipマイクロアレイ解析を行った。得られた遺伝子発現データセットを用い、GSEAを行った結果、胚性幹細胞関連遺伝子セット（genes downregulated during early stages of differentiation of embryoid bodies from V6.5

embryonic stem cells、ESC_V6.5_UP_EARLY.V1_DN) がCD44陰性細胞よりもCD44陽性細胞で高いレベルで発現していることが見出された(図14A)。同遺伝子セットのうち、CD44陽性細胞でより高発現している因子TNC、GAP43、ANXA2、c-KITなどについて、タンキラーゼ阻害剤IWR-1もしくはG007-LKによるRNAレベルの変動をRT-qPCRを用いて検討した。その結果、チロシンキナーゼc-KITのRNAレベルがタンキラーゼ阻害剤処理で減少することが見出された。また、c-KITはタンパク質レベルにおいてもCD44陽性細胞で高発現しており、タンキラーゼ阻害剤処理で減少することが明らかとなった(図14B)。これらのことから、タンキラーゼ阻害剤のCD44陽性細胞選択的効果を説明する候補因子としてc-KITに着目した(図14B)。一方、TNC、ANXA2、GAP43の発現レベルはタンキラーゼ阻害剤処理で変動しなかった(図14C)。COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞において、活性型c-KIT(phospho-c-KIT)は通常状態では検出限界以下であった(図15A)。そこで、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にc-KITリガンドであるstem cells factor(SCF)を加えると活性型c-KITが確認された。Parkら(45)の報告によると、SCFを長時間処理するとc-KITタンパク質は分解してしまう。これと一致する結果として、細胞にSCFを120分処理すると活性型c-KITが減少した(図15A)。さらに、タンキラーゼ阻害剤を前処理し、そこにSCFを15分間処理することで、タンキラーゼ阻害剤によって活性型c-KITが減少することが確認された(図15B)。

c-KIT(CD117)は、SCFによって活性化される受容体型チロシンキナーゼである。SCFが結合したc-KITは自己リン酸化を受け(46)、その下流のmitogen-activated protein kinase(MAPK)キナーゼカスケード(47)およびmTORシグナル伝達経路の活性化をもたらす(48)。c-KITはがん原遺伝子(proto-oncogene)であり、その機能獲得型変異もしくは過剰発現は、消化管間質腫瘍[Gastrointestinal stromal tumor(GIST)](49)、白血病(50)、大腸がん(51)、黒色腫(52)における腫瘍の形成および増殖(53)に関与する。大腸がんでは、c-KIT陽性のがん細胞亜集団が高い腫瘍形成能を示すことが報告されている(53)。c-KITチロシンキナーゼの酵素阻害剤であるイマチニブ(imatinib)(54)は、c-KITエクソン11のV559Dなどの変異(GISTで頻度の高い変異)陽性例に対して制がん効果を示す(55)。しかし、エクソン17のN822H、D816A/G/H/V、D820A/E/G/Yなどの変異(白血病で頻度の高い突然変異)があると、イマチニブ耐性と

なる(56)。

次に、CD44陽性細胞と陰性細胞を分離する前のCOLO-320DM細胞、さらにDLD-1細胞、患者由来大腸がんJC33細胞にタンキラーゼ阻害剤で処理した際のc-KITの発現を調べた。その結果、これらの細胞においても同様に、タンキラーゼ阻害剤処理でc-KITがタンパク質およびRNAレベルで減少することが確認された(図16A-C)。以上の結果から、タンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性細胞選択的な増殖抑制にc-KITが関与している可能性を想定し、以降の実験ではc-KITを中心に検討することとした。

Evanらの報告によると、316症例の大腸がんのうち51%でc-KITが発現している(53)。そこで、私はヒト由来大腸がん細胞株および患者由来大腸がん細胞におけるc-KITの発現をウェスタンブロットティングとRT-qPCR法で調べた。その結果、大腸がん細胞株ではCOLO-320DM、DLD-1、LS174T、HCT15、SW1418においてc-KITの発現が認められた(図17A)。また、患者由来大腸がん細胞においては、c-KIT RNAの発現レベルがDLD-1細胞よりも高い細胞としてJC07、JC19、JC20、JC32、JC33、JC39、JC55、JC61が同定された(図17B)。

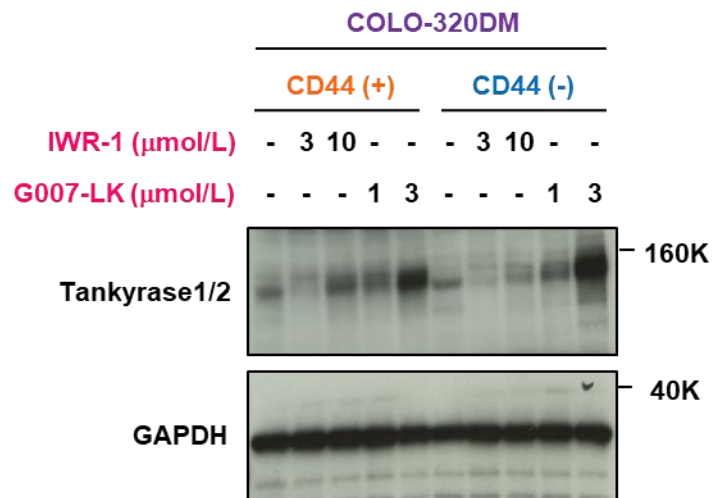
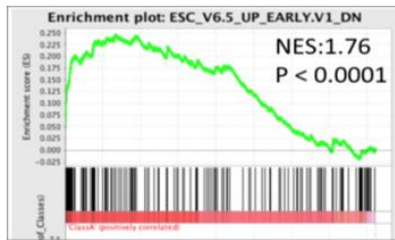


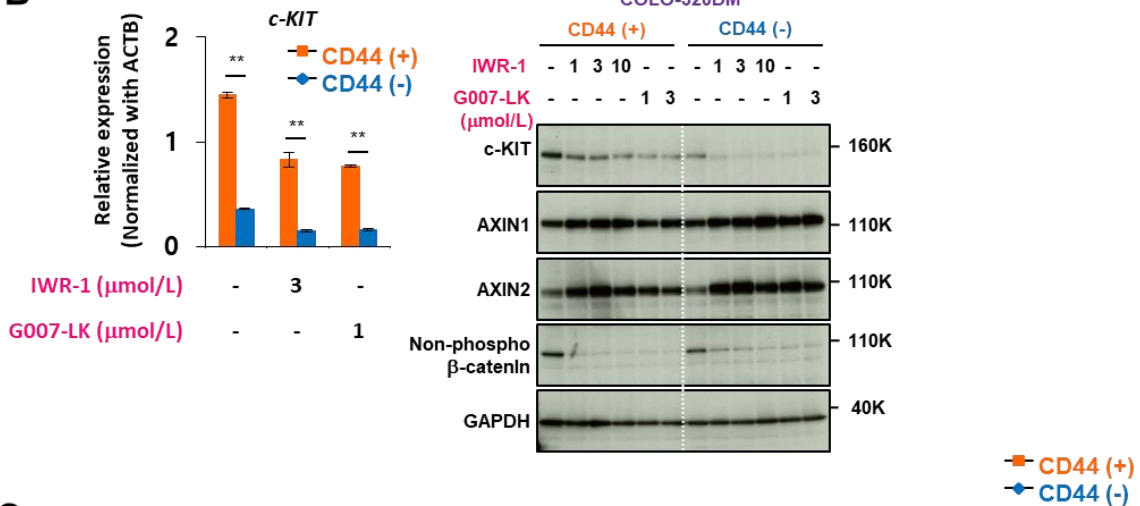
図13. COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞におけるタンキラーゼタンパク質発現とタンキラーゼ阻害剤の影響

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1とG007-LKを5日間処理し、細胞抽出液を調製した。この抽出液について、図中の一次抗体を用いてウェスタンプロットを行った。

A



B



C

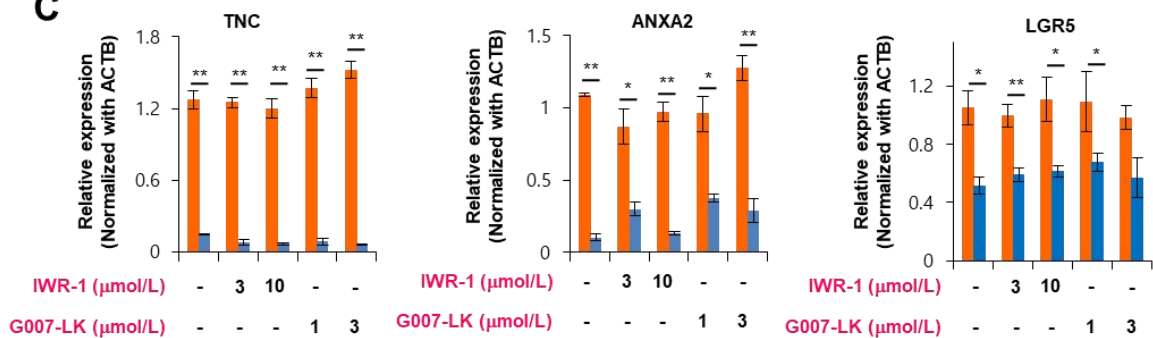


図14. 大腸がんCOLO320DM CD44陽性・陰性細胞における幹細胞関連因子の発現とタンキラーゼ阻害剤の効果

A: FACS Ariaを用いてソーティングしたCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を用いてGeneChipマイクロアレイ解析を行い、そのデータセットを用いてGene Set Enrichment Analysisを行った。

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤（IWR-1もしくはG007-LK）を5日間処理し、c-KITのRNAレベルおよびタンパク質の変動をウェスタンブロットティングとRT-qPCRで解析した。

C: Bの細胞について、TNC、ANXA2およびLGR5の遺伝子発現をRT-qPCRで解析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

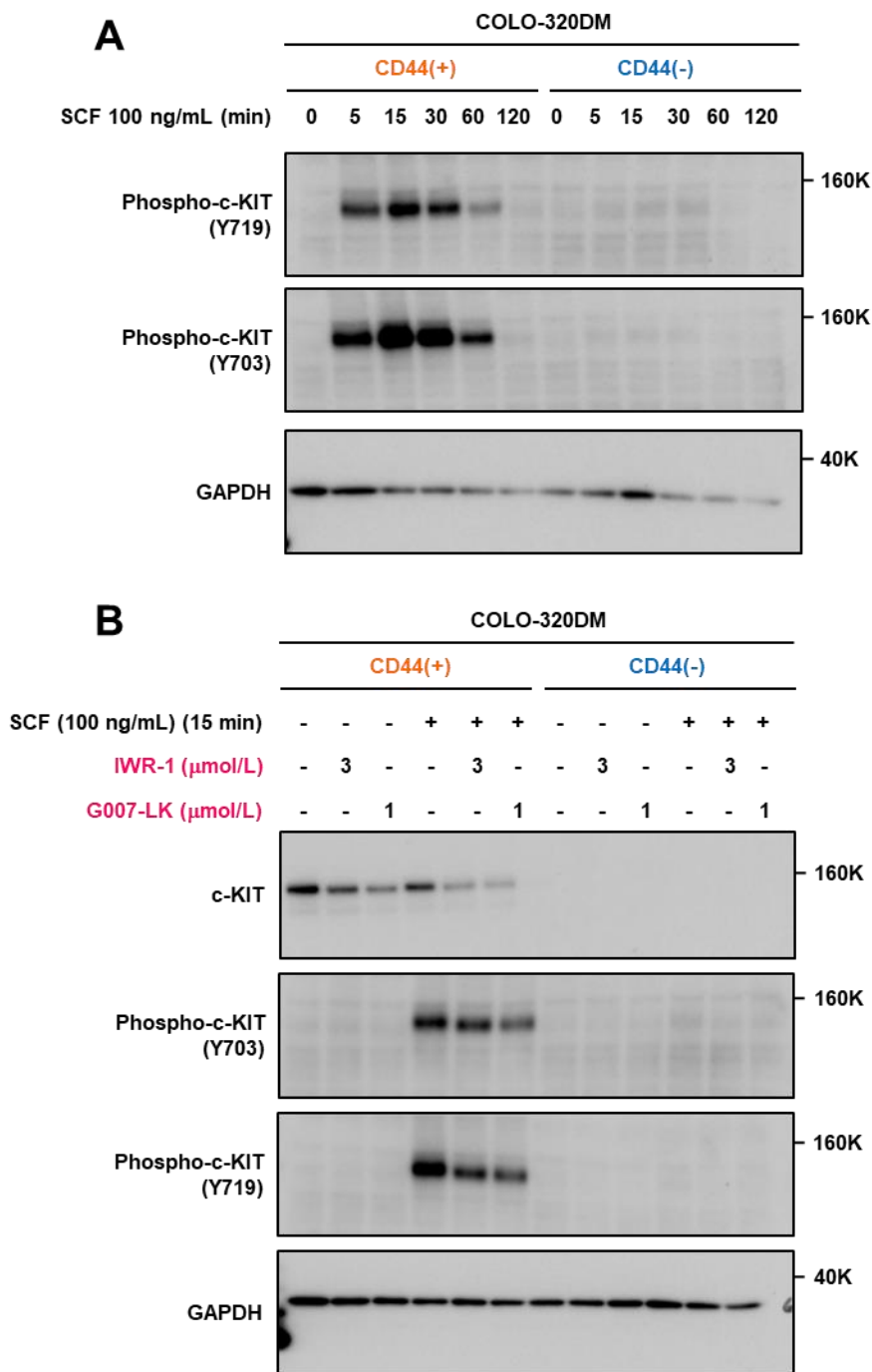


図15. SCF処理による活性形c-KITの誘導とタンキラーゼ阻害剤による活性形c-KITの抑制

A: COLO-320DM細胞 CD44陽性・陰性細胞にSCFを上記に示した時間で処理し、ウェスタンブロットティングで検討した。(B) タンキラーゼ阻害剤を3日間全処理し、SCFを細胞回収15分前から処理した。その後、細胞を回収し、ウェスタンブロットティングで検討した。

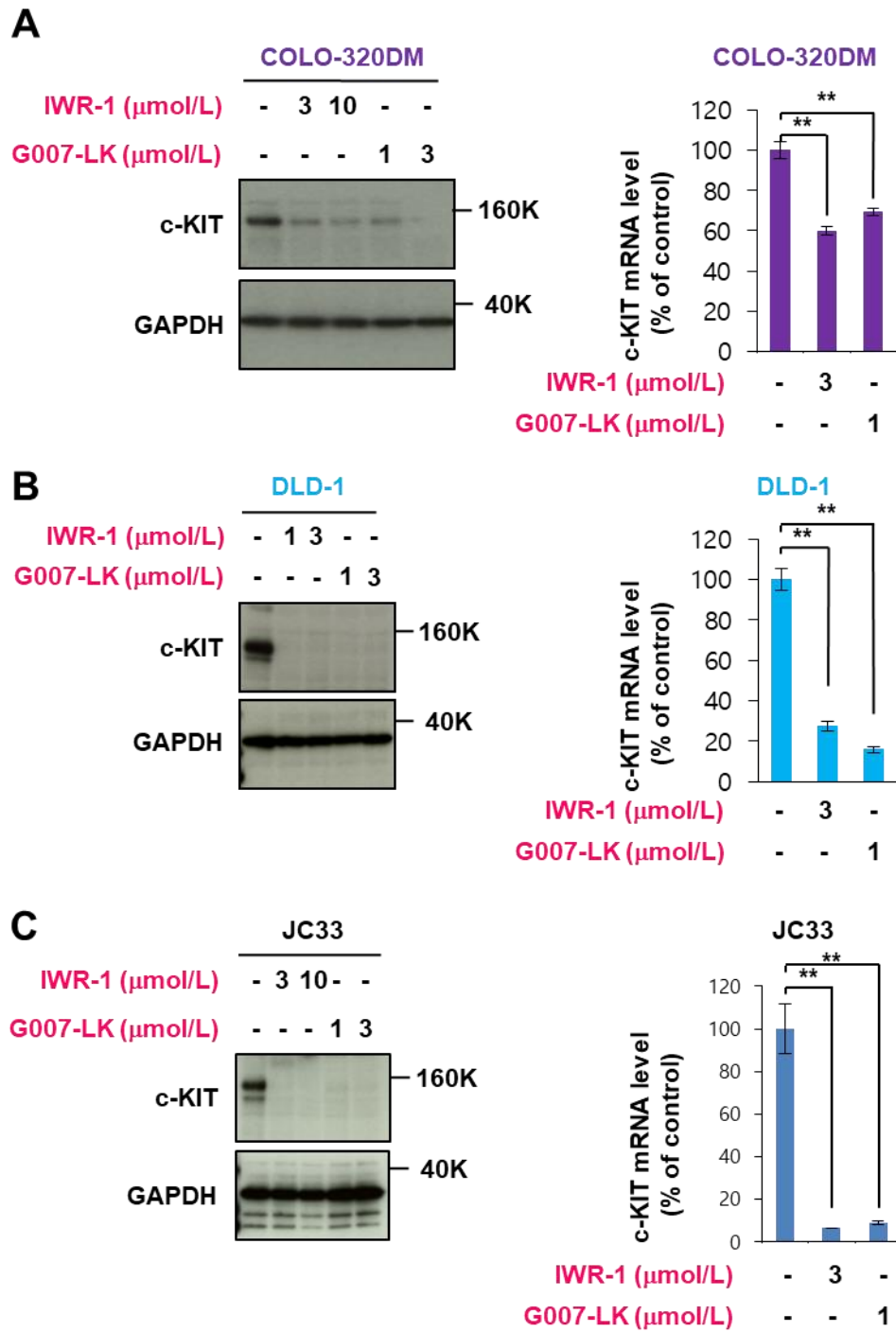


図16. 各種ヒト大腸がん細胞株におけるタンキラーゼ阻害剤によるc-KIT発現の低下
 A: COLO-320DM細胞 (A)、DLD-1細胞 (B)、患者由来大腸がん細胞JC33細胞 (C) にタンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、c-KITのタンパク質およびRNAの発現変化をウエスタンブロッティングおよびRT-qPCRで解析した。** $P < 0.01$

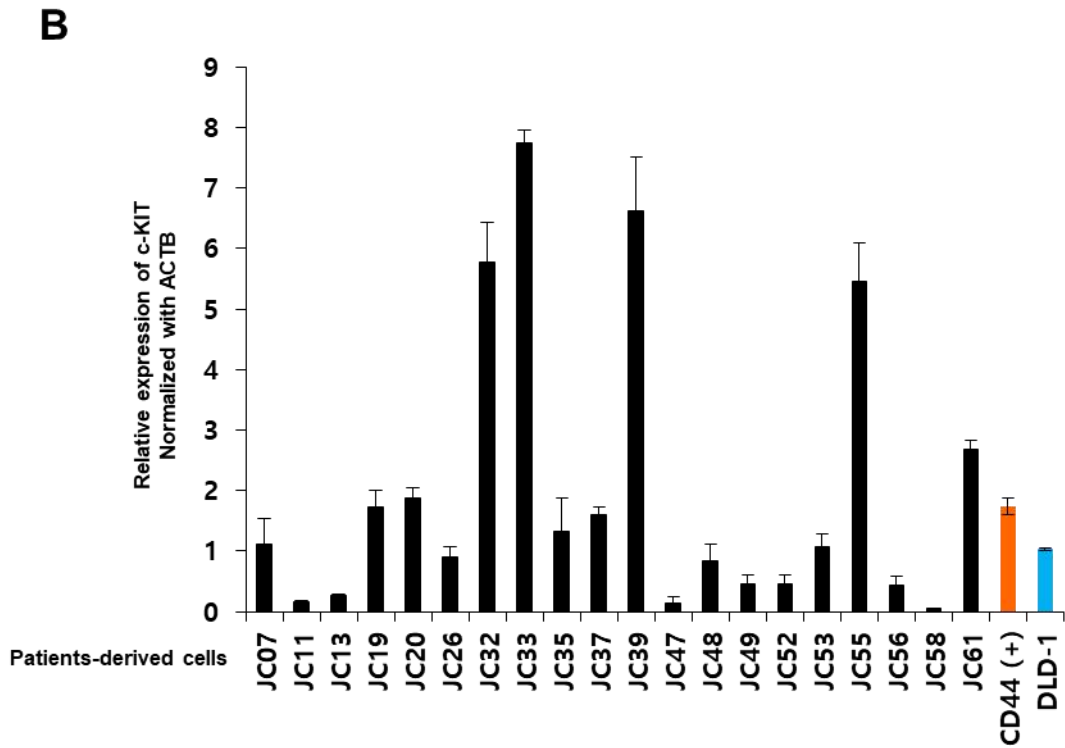
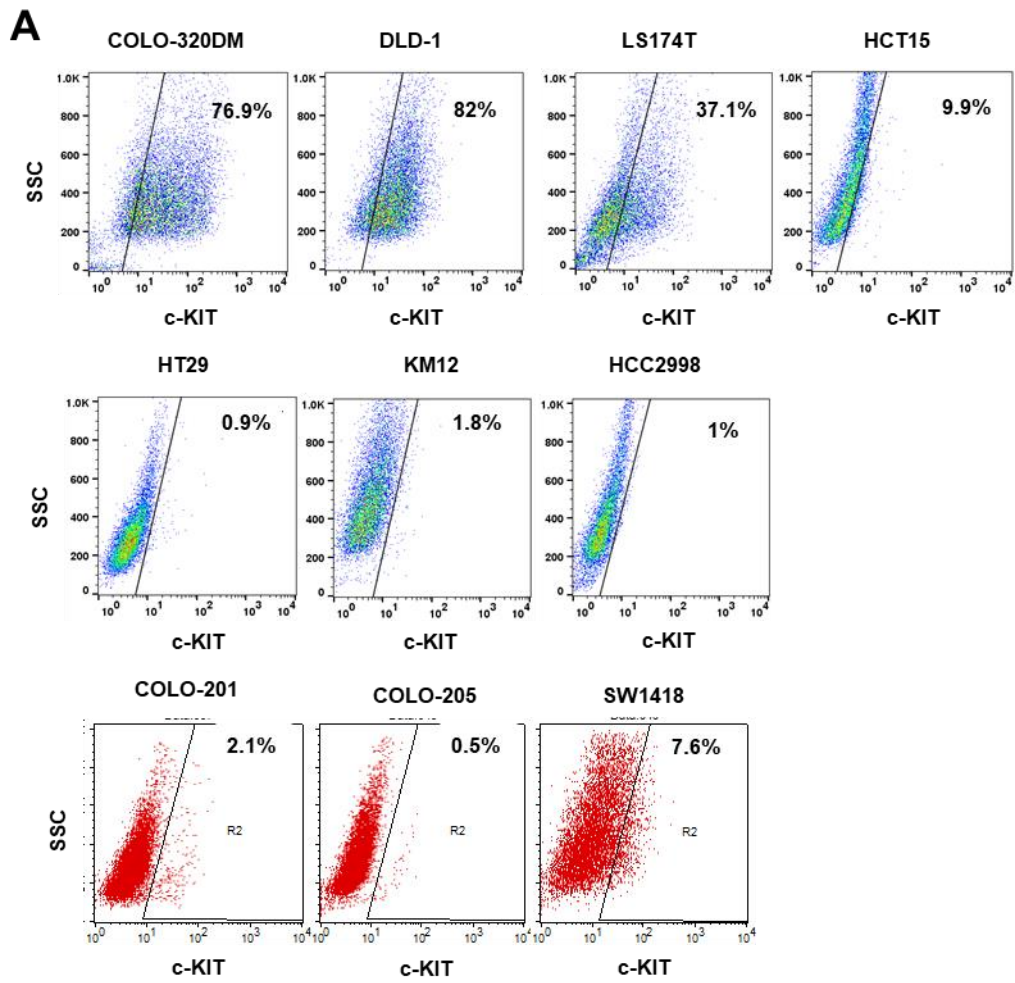


図17. 大腸がん細胞株および患者由来大腸がん細胞におけるc-KIT発現

A: 大腸がん細胞株のc-KIT発現をフローサイトメトリーで解析した。SSC: side scatter

B: 患者由来大腸がん細胞のc-KITの発現をRT-qPCRで解析した。COLO-320DM CD44陽性細胞およびDLD-1細胞はポジティブコントロールとして解析に加えた。

1.4 c-KITは大腸がんCD44陽性細胞の増殖と生存に寄与する

【目的】

タンキラーゼ阻害剤のCD44陽性大腸がん選択的増殖抑制効果に対するc-KITの機能的関与を検討するため、c-KITをノックダウンもしくは過剰発現させたときの細胞増殖への影響を調べる。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM CD44陽性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。。DLD-1細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1に記載した方法に準じて行った。

3. 薬剤感受性試験 (MTTアッセイ)

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を350 cells/80 μ L/wellになるように播種し、37°C、5% CO₂のインキュベーターで一晩培養した。翌日、タンキラーゼ阻害剤 (IWR-1、G007-LK、XAV939)、イマチニブおよびISCK03を最終濃度0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ mol/Lにて処理した。37°C、5% CO₂のインキュベーターで120時間培養したあと1.1に記載した方法に準じて細胞増殖の測定を行った。

4. フローサイトメトリー

細胞にイマチニブを3、10 μ mol/Lの最終濃度で7日間処理した。その後、フローサイトメトリー1.2に記載した方法に準じて行った。

5. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.5-mLチューブにOpti-MEMを900 μ L、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Scientific、13778150)を4.5 μ L、c-KIT siRNA#1 (Sense: 5'-GAAUGCCGGUCGAUUCUAAtt-3'、Antisense: 5'-UUAGAAUCGACCGGCAUUCca-3')、#2 (Sense: 5'-CUCCUUGUAUGGGAAAGAAAtt-3'、Antisense: 5'-UUCUUUCCCAUACAAGGAGcg-3') (Silencer select)を0.81 μ Lを混合し、10分間反応させた。その間に細胞をディッシュから剥がし、1.5-mLチューブに 2.5×10^5 cells/wellになるように分取した。この細胞を1,000 rpm、4°Cで3分間遠心し、細胞ペレットを回収した。用意できた細胞と先に反応させたsiRNAを含む試薬を混合し、6 well plateに400 μ Lずつ播種した。細胞は、37°C、5%のCO₂のインキュベーターで2日間培養したのち、ウェスタンブロッティングおよび逆転写定量PCRでノックダウンの効率を確認した。

6. ウェスタンブロッティング

1.3に記載した方法に準じて行った。

7. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

1.3に記載した方法に準じて行った。用いたプライマーを表2に示す。

表2

因子名	フォワード	リバーズ	プローブ番号
c-KIT	5'-gcttaccagaagcttccatagtg-3'	5'-aggtgaactgcaaatacataggg-3'	6
CD44	5'-gacaccatggacaagtttgg-3'	5'-cggcaggttatattcaaatcg-3'	
LGR5	5'-accagactatgcctttggaac-3'	5'-ttcccaggagtggtattctat-3'	78
CDCA7	5'-tcgcccagtggaagaaatta-3'	5'-ctgacggcattgatgacaag-3'	63
MUC2	5'-ccagctcatcaaggacagc-3'	5'-aacacgcaggcatcgtagta-3'	61
CEACAM1	5'-agcaactggacagttccatgat-3'	5'-acagatccttctctccac-3'	67
MAOA	5'-aggtgaccgagaagatatctgg-3'	5'-gttccttcccagaaggtgtgg-3'	

7. プラスミドの構築

7.1 c-KIT発現レトロウイルスベクターの作製

COLO-320DM細胞よりRNAを回収し、そのRNAより合成したcDNAを用いてc-KITをPCR [94°C 2 min、 (94°C 30 sec、 55°C 10 sec、 72°C 3min) × 35サイクル] で増幅させた。用いたプライマーは以下である (表3)。そのあと、制限酵素XhoIおよびCla Iで切断し、2931 bpのinsertフラグメントを作製した。このinsertを同じくXho I およびCla Iで切断したpLPCX (Clontech) にinsertとベクターを繋ぐため、Ligation Mix (#6023、TAKARA) を用いて16°Cで一晩反応させることで組み込んだ。大腸菌コンピテントセル [Competent high DH5α (DNA-903 : TOYOBO)] 50 μlに上述のライゲーション反応液を5 μlを加え、氷上に20分静置した。その後、42°Cで45秒間熱ショックを与え、直ちに再び氷上で2分間静置した。SOC培地 (2% Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgSO₄、10 mM MgCl₂、20 mM Glucose) を300 μl加え、Ampicillin含有LB寒天培地プレート (Trypton 5 g、Yeast Extract 2.5 g、NaCl 2.5 g、Bacto Agar 7.5 g、100 mg/ml Ampicillin 500 μl/500mL) に全量播き、37°Cで一晩培養した。200 μLのチップで掻き取ったコロニーを3 mLの液体LB培地 (Trypton 5 g、Yeast Extract 2.5 g、NaCl 2.5 g、100 mg/ml Ampicillin 500 μl/500mL) に入れ、ウォータバスシェーカー (タイテック) を用いて37°Cで一晩振とう培養した。振とう培養後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAの精製を行った。精製したプラスミドDNAはNanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) により、濃度測定を行った。

クローニングされたc-KIT cDNAのシークエンスは、Big Dye Terminator V3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて確認した。DNA 0.5 μg、Big Dye 2 μL、5×Sequence buffer 3 μL、5 M betaine 4 μL、10 μMプライマー (表4) 0.6 μLに滅菌済み精製水を全量20 μlになるように調製した。この溶液を96°C 1 min、 (96°C 10 sec、50°C 5 sec、60°C 4 min) × 27サイクル、4°Cで反応させた。反応産物をCENTRI SEP Spin Columns (PRINCETON SEPARATION) を用いて精製して乾燥後、Hi-Diホルムアミド10 μlを加えて溶解し、95°Cで5分加熱後直ちに氷上で冷却した。サンプル全量をMicroAmp® optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) に入れ、

3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析を行った。

表3

因子名	フォワード	リヴァース
c-KIT	5'-aaactcgagatcgagctaccgcatgaga-3'	5'-aaaatcgatgacccaacactgattc-3'

表4

因子名	フォワード
c-KIT	5'-aaactcgagatcgagctaccgcatgaga-3'
c-KIT #1	5'-agcctcttccaaggacttg-3'
c-KIT #2	5'-tccccaacactgaacaccag-3'
c-KIT #3	5'-tttcgtaatcgtagctggcatg-3'
c-KIT #4	5'-ccaccctggtcattacagaa-3'
c-KIT #5	5'-gatcaaggaaggcttccggatg-3'

7.2 レトロウイルスの産生とc-KIT過剰発現細胞株の樹立

293GP2細胞 4.0×10^5 cellsを6 well plate コラーゲンコート dish (IWAKI) に播種し、24時間培養した。作製したレトロウイルスベクター2 μg 、エンベロープベクター (pVSV-G) 0.5 μg 、Lipofectamine2000 6 μL およびOpti-MEM® I Reduced Serum Medium (以下Opti-MEM、Life technologies) 100 μL を混合し、室温で15分静置後、培地に全量添加し、48時間インキュベーターにて培養した。この細胞の培養上清をウイルス液を0.45 μm (Merck、SLHV033RS) のろ過し得られた液をウイルス液として回収し、polybrene (最終濃度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えたウイルス液をDLD-1細胞に2日間、24時間ごとにウイルス液を交換しながら感染させた。その後、puromycin (最終濃度2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で3日間処理することにより、ウイルス感染細胞を選択した。こうして選択

された細胞において、外来性c-KITのタンパク質発現をウェスタンブロット法で解析した。

【結果】

タンキラーゼ阻害剤のCD44陽性細胞選択的な増殖抑制効果がc-KITの抑制に起因する可能性を想定し、まずはc-KITの阻害がCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の増殖に影響を及ぼすかどうかを検討した。具体的には、c-KIT阻害剤イマチニブおよびISCK03(57)をCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞に処理し、細胞増殖を定量した(図18)。その結果、いずれの阻害剤もCOLO-320DM CD44陽性細胞に対してより強い増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、イマチニブをCOLO-320DM CD44陽性細胞およびDLD-1細胞に処理すると、CD44陽性率の減少が認められた(図19)。さらに、siRNAを用いてc-KITをノックダウンすることで、COLO-320DM CD44陽性細胞に選択的な増殖抑制が有意差をもって観察された(図20A)。

一方、先行研究によるとDLD-1細胞はAPCに20-AARが存在することによってタンキラーゼ阻害剤に耐性であることが知られている(42)。この細胞に外来性c-KIT遺伝子を過剰発現させたDLD-1細胞を樹立し、タンキラーゼ阻害剤感受性の変化を調べたところ、c-KITの過剰発現はタンキラーゼ阻害剤による感受性を低下させることが明らかとなった(図20B)。しかしながら、COLO-320DM細胞へのc-KIT過剰発現細胞樹立は多様な方法で挑戦していたが、結果的に樹立まで至っていなかった。このc-KIT過剰発現DLD-1細胞では、CD44、Lgr5やCDCA7などのがん幹細胞性因子の発現上昇やMUC2、CEACAM1やMAOAといった分化マーカー遺伝子の発現減少が認められた(図21)。以上の結果から、タンキラーゼ阻害剤のCD44陽性細胞選択的な増殖抑制効果は、c-KITの発現減少による同キナーゼの機能低下によってもたらされている可能性が示唆された。

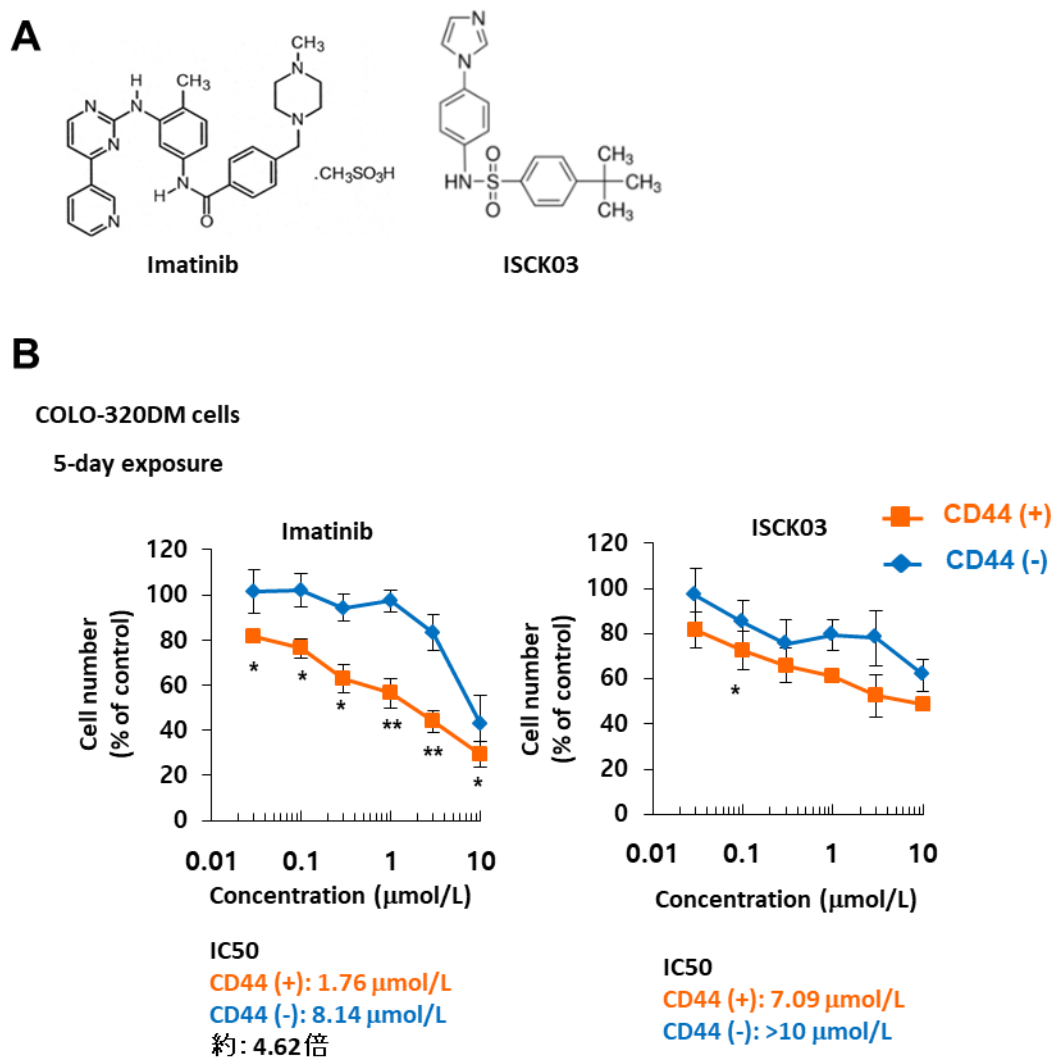


図18. CD44陽性大腸がん細胞の増殖・維持に対するc-KITチロシンキナーゼの寄与

A: イマチニブおよびISCK03の化学構造式

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にイマチニブもしくはISCK03を5日間処理し、細胞増殖抑制効果をMTT assayで定量した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$

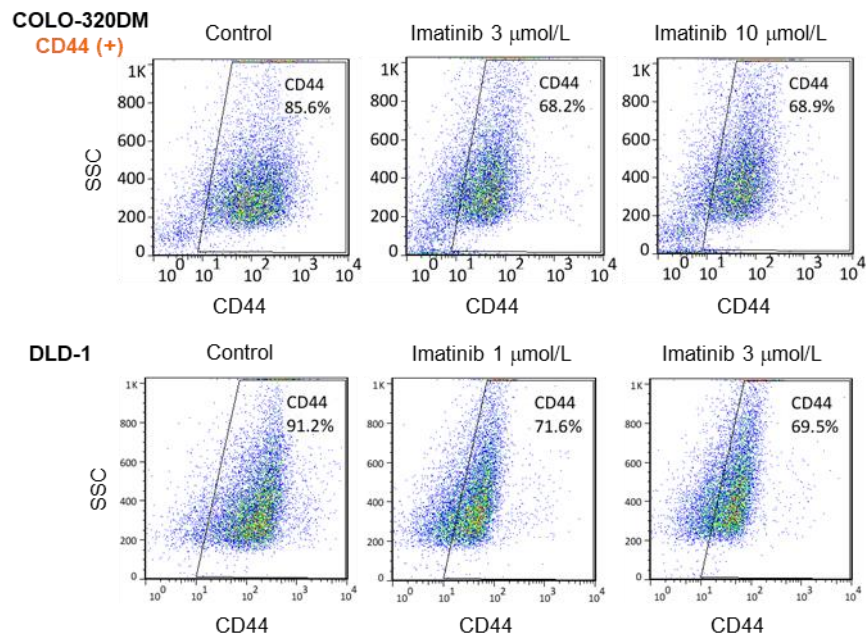


図19. イマチニブを処理した大腸がん細胞株におけるCD44陽性率の減少

COLO-320DM CD44陽性およびDLD-1細胞をイマチニブの存在下で5日間培養し、CD44陽性率の変化をフローサイトメトリーで評価した。SSC: side scatter

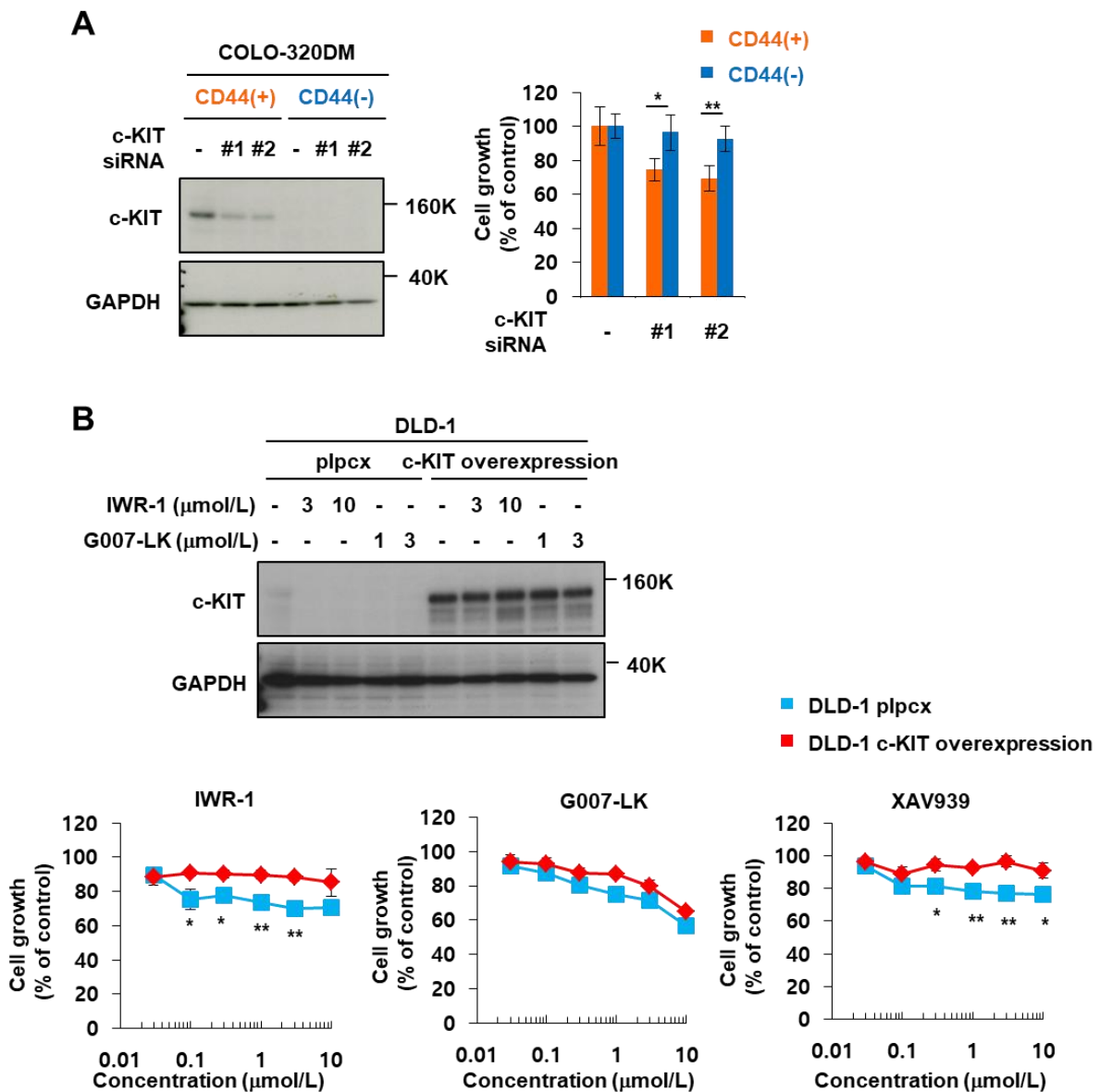


図20. 大腸がん細胞の増殖に対するc-KITの寄与

A: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にc-KIT siRNAを導入し、ウエスタンブロッティング（左図）でsiRNAのノックダウン効率を調べるとともに、MTT assay（右図）で細胞増殖への影響を調べた。

B: DLD-1細胞にc-KIT発現レトロウイルスを感染させ、同タンパク質の発現をウエスタンブロットで調べた（上図）。この細胞にタンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、c-KITの発現変動と阻害剤感受性をそれぞれウエスタンブロット（上図）およびMTT assay（下図）で評価した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

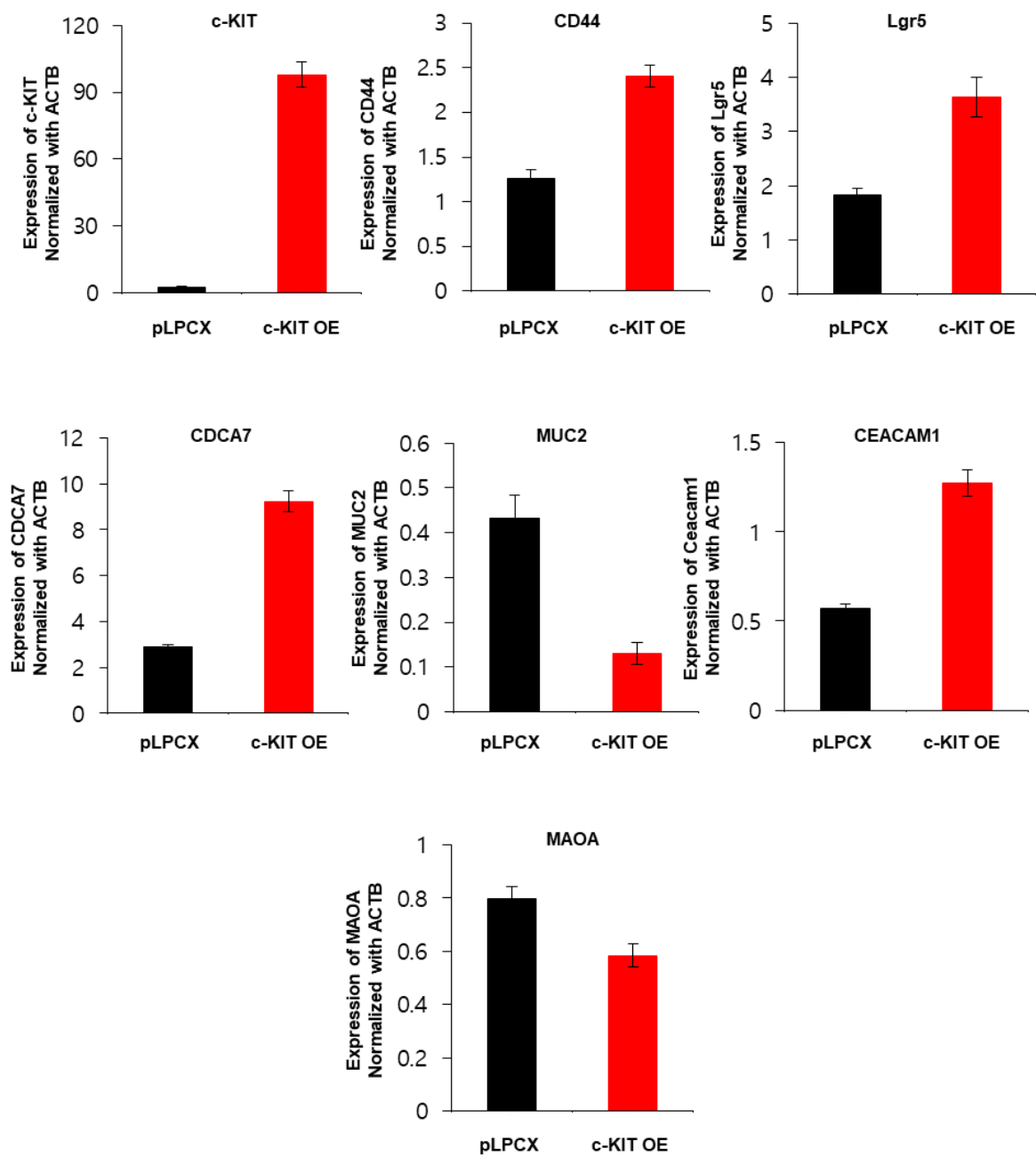


図21. c-KIT過剰発現による幹細胞関連因子および分化マーカー遺伝子の発現変動

c-KIT過剰発現DLD-1細胞およびmock (pLPCX) 細胞よりRNAを抽出し、がん幹細胞性因子および分化マーカー遺伝子の発現レベルをRT-qPCRで定量した。

1.5 大腸がんCD44/c-KIT二重陽性細胞のがん幹細胞性

【目的】

先行研究でc-KITは造腫瘍性の維持や腫瘍の体積に関与することが示唆されている。そこで、私
が用いるCOLO-320DM CD44陽性細胞の中でもc-KITの発現が陽性・陰性に分けて存在すること
よりCD44陽性細胞の中のc-KITにおける造腫瘍性や腫瘍体積にどう関わっているかを検討するた
め、NOD-SCIDマウスにCOLO-320DM CD44陽性細胞よりソーティングしたc-KIT陽性・陰性細
胞の移植を行う。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM CD44陽性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。

2. セルソーティング

COLO-320DM CD44陽性細胞をディッシュから剥がし、1,000 rpm, 4°Cで3分間遠心してペレット
として回収した。これをsuspension bufferで懸濁し、phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ヒトc-KIT
(CD117) 抗体 (BD Biosciences, 340529) およびallophycocyanin (APC)標識マウス抗ヒトCD44
(BD Biosciences, 559942) 抗体を添加して4°Cで1時間反応させた。反応後、suspension buffer
(500 μ L) で1回洗浄した。得られた細胞懸濁液をBD FACS Melody (R6617620083) にか
け、COLO-320DM CD44/c-KIT二重陽性細胞およびCD44陽性/c-KIT陰性細胞分画をソーティングした。

3. マウス皮下ゼノグラフト移植および腫瘍の採材

動物実験は公益財団法人がん研究会動物委員会の審査承認を受けた上で、所内のガイドライン
に基づいて実施した。細胞をディッシュから剥がし、Hanks' balanced salt solution (Thermo Fisher
Scientific) で1,000 cells/100 μ L、500 cells/100 μ L、250 cells/100 μ Lに調整した。NOD-SCIDマウス

(5 weeks、メス：日本チャールスリバー) の皮下にこれらの細胞を100 μ l/マウスで移植した。腫瘍体積は、腫瘍の長辺 (mm) \times 短辺 (mm) \times 短辺 (mm) \times 1/2とし、約3日おきに、移植後28日から40日まで実測した。これらの腫瘍を採材し、その半量をマイルドホルム (Wako) にて固定し、パラフィンブロックを作製した (新組織科学研究所に委託)。また、残余腫瘍は Allprotect Tissue Reagent (QIAGEN) に浸漬のうえ、-80°Cで保存した。

【結果】

Evanらは、c-KITをノックダウンした大腸がん細胞は造腫瘍性を低下させ、また腫瘍の増殖も抑制されることを報告している(53)。COLO-320DM 細胞におけるCD44およびc-KITの発現をフローサイトメトリーで解析したところ、がん幹細胞性を示すCD44陽性細胞の多くはc-KIT陽性細胞でもある一方、亜集団として、c-KIT陰性細胞も含まれることが分かった (図22A)。そこでこれらのCD44陽性細胞において、先行論文に示されるようにc-KITが腫瘍形成性に寄与しているかどうかを検討した。まず、FACS Melodyを用いてCOLO-320DM CD44陽性細胞よりCD44/c-KIT二重陽性細胞とCD44陽性/c-KIT陰性細胞分画をそれぞれソーティングし、NOD-SCIDマウスの皮下に移植した (図22A)。それぞれ1,000個、500個、250個の細胞をNOD-SCIDマウスに移植した結果、1,000個の細胞をNOD-SCIDマウスに移植したときには、両分画で特に大きな差は認められなかった (図22B)。一方、移植細胞数が500個の場合は、CD44/c-KIT二重陽性細胞の方が大きな腫瘍形成を示した。さらに移植細胞数が250個の場合は、造腫瘍性にも差が認められた。すなわち、CD44/c-KIT二重陽性細胞が高い造腫瘍性を示した。以上より、COLO-320DM CD44陽性細胞においてc-KIT発現は、がん幹細胞性の維持に関与している可能性が示唆された。

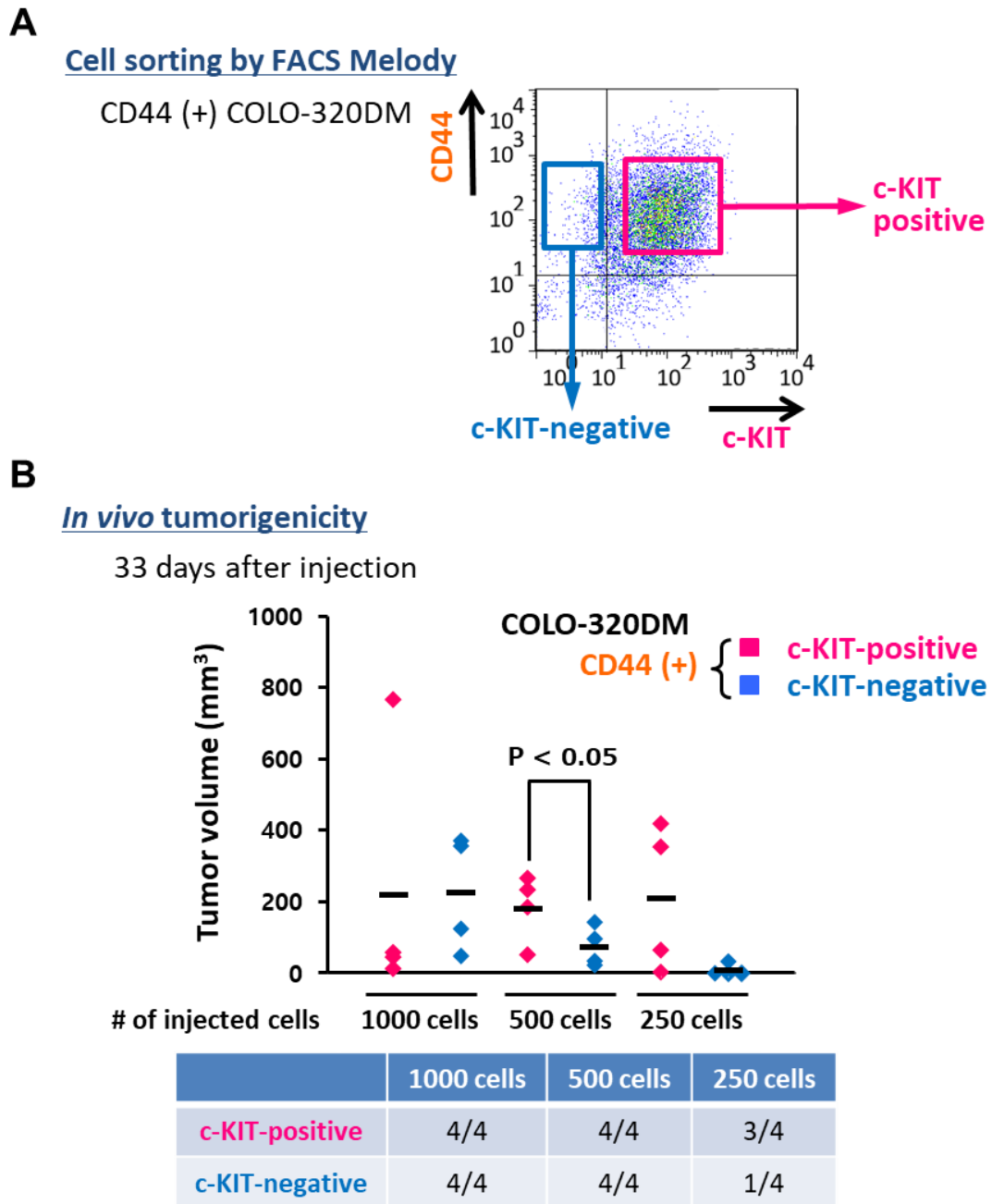


図22. COLO-320DM CD44/c-KIT二重陽性細胞のin vivo造腫瘍性

A: FACS Melodyを用いてCOLO-320DM CD44陽性細胞よりc-KIT陽性・陰性細胞をソーティングした。

B: COLO-320DM CD44/c-KIT二重陽性細胞およびCD44陽性/c-KIT陰性細胞をそれぞれNOD-SCIDマウスに1,000 cells/マウス、500 cells/マウス、250 cells/マウス移植し、33日目の腫瘍形成能および腫瘍体積を測定した。

1.6 c-KITはCD44陽性大腸がん細胞におけるがん幹細胞性の維持に不可欠である

【目的】

c-KITの発現がCD44陽性COLO-320DM細胞のin vivo造腫瘍性と相関することが明らかとなったが、c-KITが実際に同細胞のがん幹細胞性に機能しているかは定かでない。そこでCD44陽性COLO-320DM細胞のc-KIT遺伝子をCRISPR-Cas9法でノックアウトし、がん幹細胞性や各種マーカー因子の発現変化を検討する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM CD44陽性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。

2. CRISPR/Cas9法によるノックアウト細胞株の樹立

2.1 CRISPR/Cas9法を用いたゲノム改変

COLO-320DM CD44陽性細胞 1.0×10^5 cellsを24 well plateに播種した。24時間後、10 μ M trans-activating CRISPR RNA (Tracr RNA, GE Healthcare) 2.5 μ L、10 μ M crRNA (5'-CTGCGTCAGCCGTACCTCGT-3': CM-004235-01-0002、ATCCTGGTGAGGAATAACAA: CM-004235-02-0002、GE Healthcare)、Opti-MEM 50 μ Lを加えた混合液を用意した。さらにOpti-MEMで60 μ g/mLに調整し室温で20分静置させたDharmaFECT Duo Transfection Reagent (GE Healthcare) を25 μ Lを加え、全量400 μ LとなるようにDMEM (-kanamycin (Km)) を加えて細胞に添加し、37°Cで48時間インキュベートした。その後、Blasticidin (最終濃度10 μ g/mL) により感染細胞を選択した。その後、1 cell/wellとなるよう限界希釈した細胞を96-well plate (IWAKI) に播種し、クローン細胞を樹立した。

2.2 ゲノムシーケンスによる遺伝子ノックアウトの確認

ゲノムDNAの抽出にはPuregene® Core Kit B (QIAGEN) を用いて以下のように行った。まず、細胞を200 µL PBSで懸濁し、20 µL Proteinase Kと200 µL Buffer ALを加え、ボルテックス混和した。その後、56°Cで10分間インキュベーションし、EtOH (96%) 200 µLを添加し、DNeasy Mini Spin Columnに移した。チューブを6,000×gで1分間遠心し、DNeasy Mini Spin Columnを新しいチューブに移し、500 µL Buffer AW1を加えさらに6,000×gで遠心した。また、DNeasy Mini Spin Columnを新しいチューブに移し、500 µL Buffer AW2を加え、20,000×gで遠心した。その後、DNeasy Mini Spin Columnを新しい1.5-mLチューブに移し、200 µL Buffer AEを加え、室温で1分間静置した。その後、6,000×gで遠心し、フロースルー画分中のDNA濃度を測定した。

TA クローニングには Target Clone™ (東洋紡) を用いた。抽出したゲノム DNA を鋳型として、KOD-Plus-Neo を用いて [94°C 2 min、(94°C 30 sec、55°C 10 sec、72°C 3 min) ×35サイクル] で PCR を行った。使用したプライマーは表5で示す。増幅した PCR 産物を SDS page で電気泳動し、Gel extraction kit (QIAGEN、28704) を用いて精製し、60°Cで10分間3'-dA 付加反応を行い、pTA ベクターと共に TA DNA Ligase でライゲーションを行い、プラスミドを作製した。得られたプラスミドを2.4に記載した方法に準じてシーケンス反応を行った。

表5

フォワード	リヴァース
5'-aaactcgagatcgagctaccgcatgaga-3'	5'-aaaatcgatgacccaaacactgattc-3'

3. ウェスタンブロッティング

1.3に記載した方法に準じて行った。用いた抗体を表6に記す。

表6

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
c-KIT	1:1000	3074S	Cell Signaling Technology
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	0.1 µg/ML	FL-335	Santa Cruz Biotechnology

4. フローサイトメトリー

1.2に記載した方法に準じて行った。

5. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

1.3に記載した方法に準じて行った。用いたプライマーを表7に記す。

表7

因子名	フォワード	リヴァース	プローブ番号
c-KIT	5'-gcttaccagaagcttccatagtg-3'	5'-aggatgaactgcaaatacataggg-3'	6
CD44	5'-gacacccatggacaagttttgg-3'	5'-cggcaggttatattcaaatcg-3'	
TNC	5'-gacttcagcacaacccctct-3'	5'-tgagagcatcccagctaacc-3'	82
CEACAM1	5'-agcaactggacagttccatgtat-3'	5'-acagatccttgcctccac-3'	67
MAOA	5'-aggatgaccgagaaagatatctgg-3'	5'-gttccttcccagaagggtgg-3'	

6. マウス皮下ゼノグラフト移植および腫瘍の採材

動物実験は公益財団法人がん研究会動物委員会の審査承認を受けた上で、所内のガイドラインに基づいて実施した。COLO-320DM CD44陽性細胞 (mock)、c-KITノックアウト細胞 (#11、#12) をHanks' balanced salt solutionで500 cells/100 μ L、250 cells/100 μ Lに調製した。NOD-SCIDマウス (5 weeks、メス：日本チャールスリバー) の皮下に細胞を100 μ l/マウスで移植した。腫瘍体積は、腫瘍の長辺 (mm) \times 短辺 (mm) \times 短辺 (mm) \times 1/2とし、約3日おきに移植後69日から80日まで測定した。

【結果】

上述のc-KIT阻害剤、c-KITノックダウンおよび過剰発現細胞を用いた検討から、大腸がん細胞において、c-KITががん幹細胞性の維持に関与していることが示唆された。この結果をさらに固めるため、CRISPR-Cas9法を用い、COLO-320DM由来c-KITノックアウト細胞の樹立を行った。

CRISPR-Cas9法でターゲットとした配列はexon 3内に存在し、クローン12において同エクソンの下流に終了コドンが現れた（図23A）。ウェスタンブロッティングの結果、クローン#11および#12において実際にc-KITタンパク質の発現が消失していることが確認された（図23B）。さらにフローサイトメトリーを用いて検討したところ、いずれもc-KIT陽性細胞が完全に消失していることが確認された（図24A）。以上の結果から、2種類のクローン#11, #12をc-KITノックアウト細胞と判断し、これらの細胞を次の実験に用いた。まず、c-KITノックアウト細胞ではCD44陽性率の顕著な低下が観察された（図24B）。さらに、c-KITノックアウト細胞では、CD44およびがん幹細胞性因子TNCのRNA発現レベルが低下していた。一方、分化マーカー遺伝子としてCEACAM1やMAOAなどのRNA発現レベルが上昇していることが確認された（図25A）。これらのc-KITノックアウト細胞とmock細胞をNOD-SCIDマウスの皮下に移植したところ、250個を移植したマウスにおいて造腫瘍性に差が認められた（図25B）。すなわち、c-KITノックアウト#11細胞では、腫瘍の大きさの減少が認められた。さらに、c-KITノックアウト#12細胞を移植したマウスにおいては、腫瘍が形成されてないつまり造腫瘍性がmockに比べ減少していた。以上の結果より、c-KITはCOLO-320DM細胞においてCD44陽性率およびがん幹細胞性の維持に寄与している可能性が考えられた。

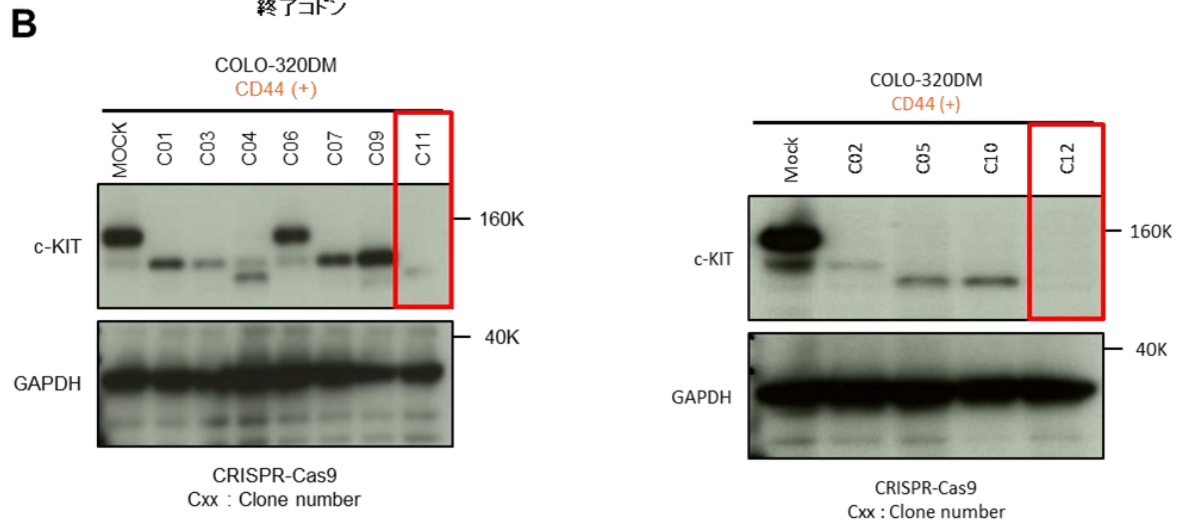
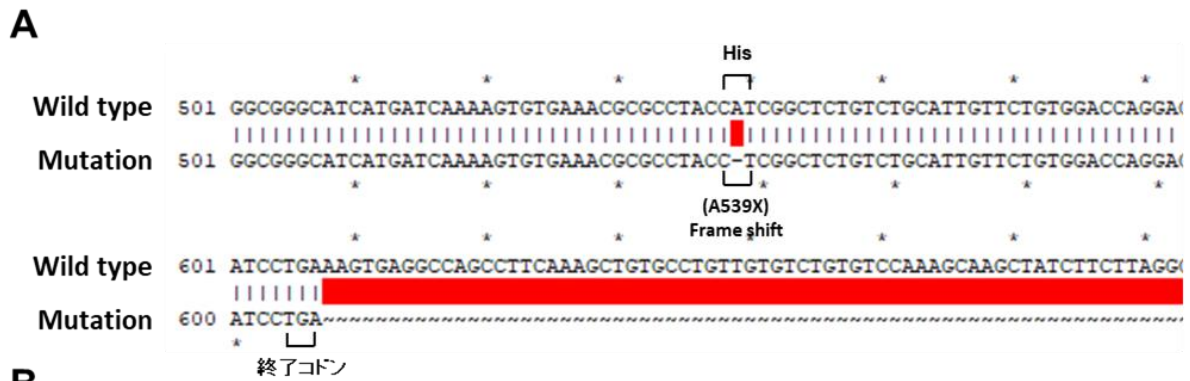


図23. CRISPR-Cas9法によるc-KIT遺伝子破壊 (COLO320DM CD44陽性細胞)

A: ゲノム編集によるCOLO320DM CD44陽性細胞におけるc-KIT遺伝子破壊をDNAシーケンス解析で確認した。

B: c-KIT遺伝子破壊細胞株クローンの細胞抽出液をウェスタンブロット解析し、c-KITタンパク質の発現消失を確認した。

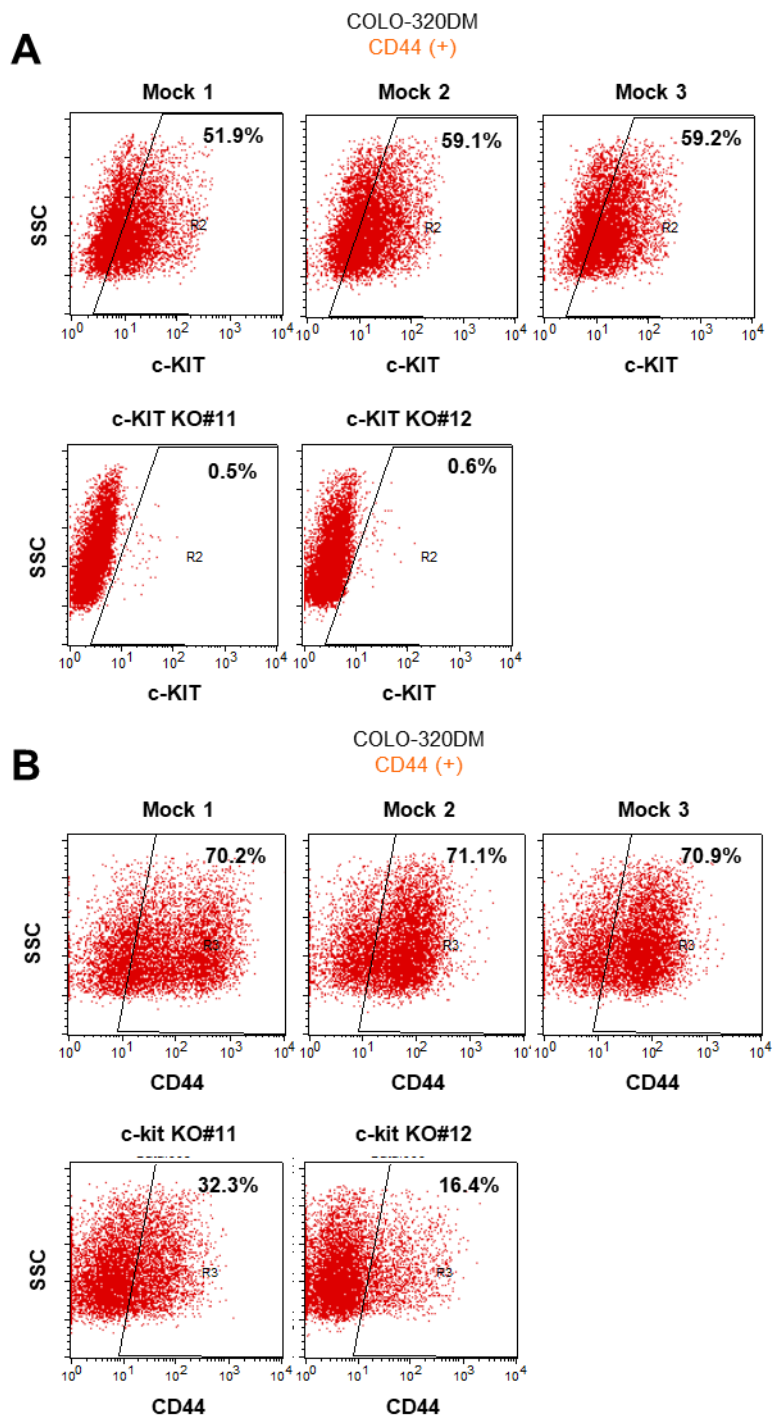


図24. c-KIT遺伝子破壊細胞株におけるCD44陽性率の低下

A: c-KITノックアウトCOLO-320DM細胞におけるc-KIT発現をフローサイトメトリーで確認した。
 B: c-KITノックアウトによるCD44陽性率の変動をフローサイトメトリーで解析した。SSC: side scatter

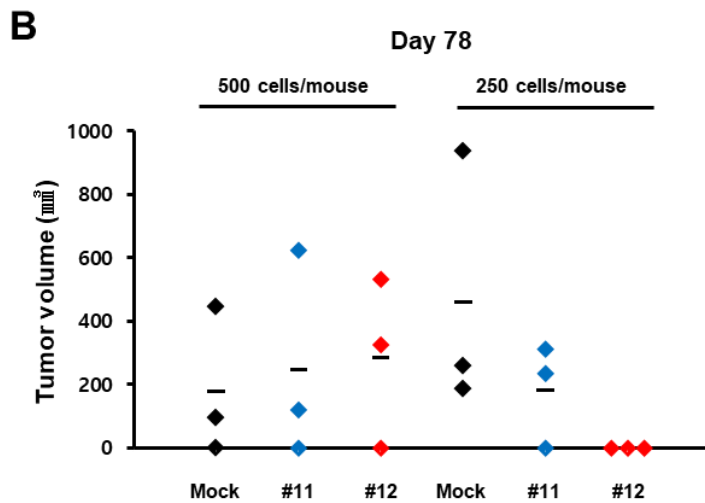
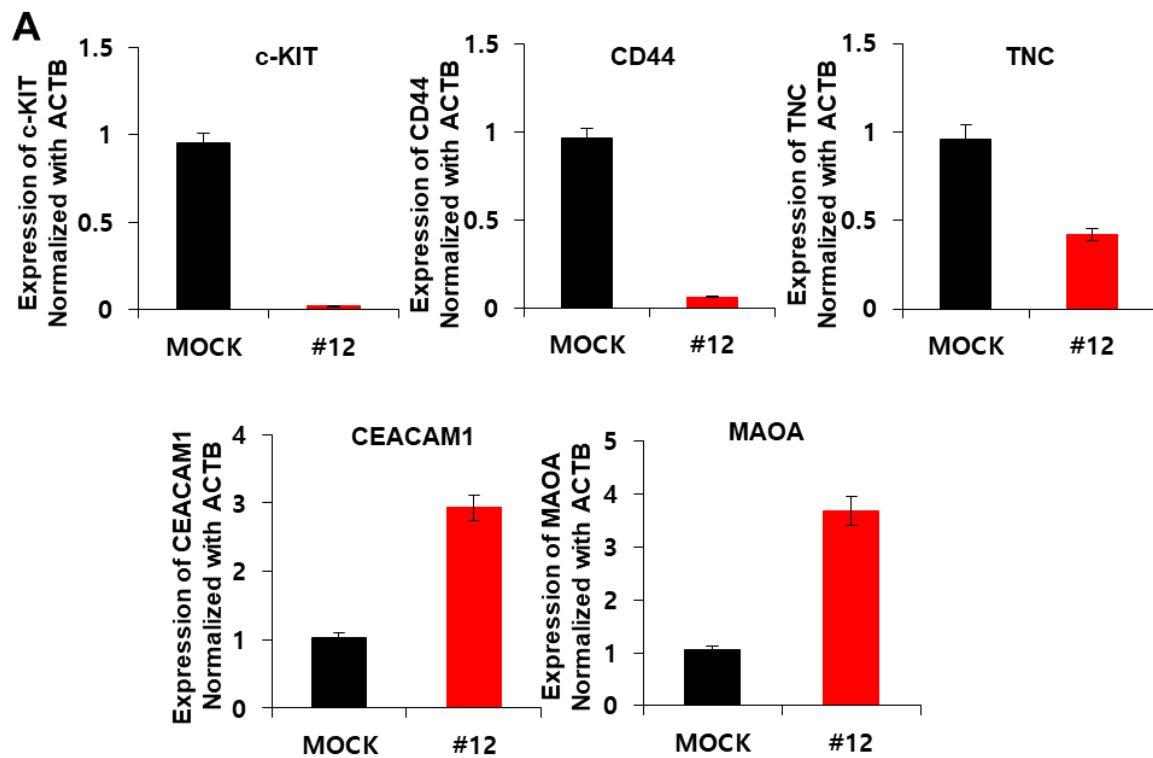


図25. c-KIT遺伝子破壊による幹細胞関連因子および分化マーカーの発現変動

A: COLO-320DM c-KITノックアウト細胞におけるc-KIT、CD44、TNC、CEACAM1およびMAOAのRNA発現レベルをRT-qPCRで解析した。

B: COLO-320DM c-KITノックアウト細胞をNOD-SCIDマウスに500 cells/マウス、250 cells/マウスで皮下移植し、移植後78日目の腫瘍体積を測定した (N=3)。

第2章 タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの減少はAXIN2の蓄積を介して生じる

2.1 タンキラーゼ阻害剤による大腸がん幹細胞様CD44陽性細胞選択的な増殖抑制作用はAXIN2蓄積を介する

【目的】

タンキラーゼ阻害剤処理による大腸がん幹細胞様CD44陽性細胞選択的な増殖抑制のメカニズムを明らかにするため、タンキラーゼ阻害剤の作用点であるAXIN2およびその下流因子であるβ-カテニンをノックダウンし、CD44陽性・陰性細胞の増殖およびタンキラーゼ阻害剤感受性変化を検討する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞とCOLO-320DMの培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。LS174T細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1に記載した方法に準じて行った。

3. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.4に記載した方法に準じて行った。用いたsiRNAは以下の通りである：Silencer Select [AXIN2 (#1: s229719, #2: s15818)、negative control (#1) ON-TARGETplus [CTNNB1 (β-カテニン) and non-targeting control] siRNAs (GE Healthcare Dharmacon)。

4. ウェスタンブロッティング

CTNNB1 siRNAを細胞に導入して2日間、37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養後、回収した細胞より1.3に記載した手法に準じてタンパク質抽出を行った。また、AXIN2 siRNAをCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞に導入して2日間培養後、タンキラーゼ阻害剤IWR-1およびG007-LKをそれぞれ最終濃度3 μmol/Lおよび1 μmol/Lとなるように添加した。5日間の培養後、細胞を回収し、上記と同じ手順でタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットは1.3に記載した方法で行った。用いた一次抗体を表8に示す。

表8

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
non-phosphorylated form of β-catenin (active β-catenin)	2 μg/mL	05-665	Millipore
AXIN2	1:500	2151S	Cell Signaling Technology
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	0.1 μg/ML	FL-335	Santa Cruz Biotechnology

5. 薬剤感受性試験 (MTTアッセイ)

3でβ-カテニンsiRNAを導入した細胞を200 cells/80 μL/wellとなるように96 well plateに播種し、37°C、5% CO₂のインキュベーターで5日間培養した。5日後、1.1と同手順でMTTアッセイを行い、細胞増殖を測定した。3でAXIN2 siRNAを導入したCOLO-320DM CD44陽性・陰性細胞、COLO-320DM細胞、DLD-1細胞、LS174T細胞を350 cells/80 μL/wellとなるように96 well plateに播種し、2日間培養した。2日後、タンキラーゼ阻害剤 (IWR-1、G007-LK、XAV939、RK-287107) を最終濃度が0.03、0.1、0.3、1、3、10 μmol/Lとなるように調整し、20 μL/wellで添加し、5日間培養した。5日後、1.1に記載した方法に準じて細胞増殖を測定を行った。一方、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を350 cells/80 μL/wellになるように96 well plateに播種し、一晚培養した。翌日、FH535を最終濃度が0.03、0.1、0.3、1、3、10 μmol/Lとなるように調整し、20 μL/well添加し、5日間培養した。その後、1.1に記載した方法に準じてMTTアッセイを行った。

【結果】

タンキラーゼはAXIN2をPAR化し、ユビキチン分解を誘導する。タンキラーゼ阻害剤はAXIN2の蓄積およびその下流のactive β -カテニンの減少を引き起こす。そこで、タンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性細胞の増殖抑制がAXIN2もしくは β -カテニンに依存的であるかどうかを検討した。

まず、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にcontrol siRNAおよびAXIN2 siRNAを導入した。この条件下でタンキラーゼ阻害剤G007-LKを処理しても、AXIN2の蓄積はもとの細胞の基底レベルまで抑えられていることが確認された（図26A）。このときの各細胞のタンキラーゼ阻害剤感受性をMTTアッセイで検討したところ、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞いずれにおいても同剤感受性の低下が認められたが、特にCD44陽性細胞の感受性低下が顕著であった（図26B）。

一方、 β -カテニンをノックダウンしたときの細胞増殖の抑制については、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞間で差は認められなかった（図27A, B）。同様に、 β -カテニンの機能を阻害する小分子化合物であるFH535に対する感受性も、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞で差は認められなかった（図27C）。以上の結果より、タンキラーゼ阻害剤のがん幹細胞様CD44陽性細胞選択的な増殖抑制効果は、タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2の蓄積を介する一方、 β -カテニンの分解とは異なるメカニズムを介するものと考えられた。

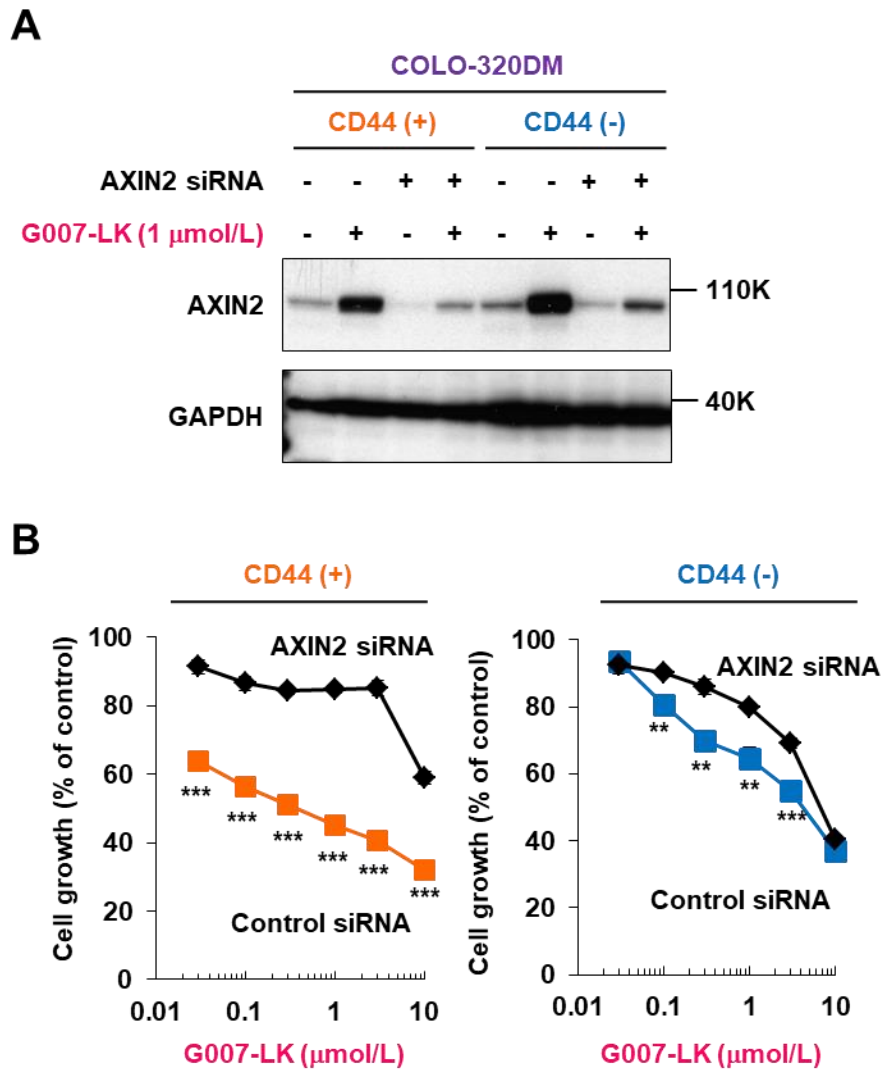


図26. タンキラーゼ阻害剤の大腸がんCD44陽性細胞選択的増殖抑制作用のAXIN2依存性

A: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にAXIN2 siRNAを導入し、48時間培養後に1 μmol/L G007-LKで120時間処理した。タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行った。

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にAXIN2 siRNAを導入し、48時間培養後にG007-LKで5日間培養した。その後、細胞増殖をMTT assayで定量した。**P < 0.01, ***P < 0.001

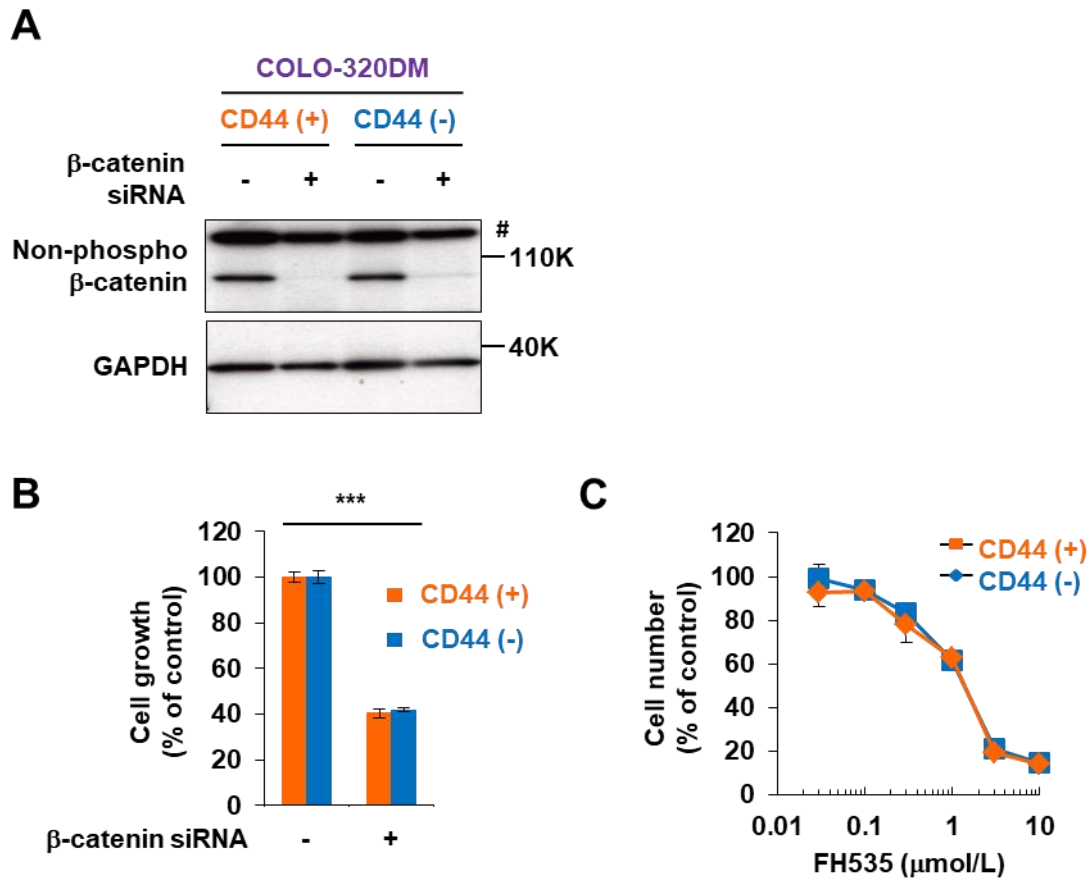


図27. COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の増殖に対する β -カテニンの寄与

A: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞に β -カテニン siRNA を導入して48時間培養後、ノックダウンの効率をウェスタンブロッティングで検討した。#: Non-specific band

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞に β -カテニン siRNA を導入し、2日培養後の細胞数を MTT assay で評価した。*** $P < 0.001$

C: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を β -カテニン阻害剤 FH535で5日間処理し、細胞増殖を MTT assay で評価した。

2.2 タンキラーゼ阻害剤によるc-KIT発現低下のAXIN2依存性

【目的】

タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2の蓄積をsiRNAで抑制することで、タンキラーゼ阻害剤の感受性が低下した。とりわけ、COLO-320DM CD44陽性細胞の感受性低下が顕著であったことから、AXIN2の蓄積がタンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性細胞選択的増殖抑制に関与している可能性がある。そこで、AXIN2をノックダウンした条件下で、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現低下がどのような影響を受けるかを調べる。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DMの培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.4に記載した方法に準じて行った。用いたsiRNAは以下の通りである：Silencer Select [AXIN2 (#1: s229719, #2: s15818), negative control (#1)]。

3. ウェスタンブロッティング

COLO-320DM、DLD-1 細胞にAXIN2 siRNAを導入して2日間の培養後、タンキラーゼ阻害剤IWR-1およびG007-LKをそれぞれ最終濃度が3 $\mu\text{mol/L}$ および1 $\mu\text{mol/L}$ となるように添加した。5日間の培養後、細胞を回収し、1.3に記載した方法に準じてウェスタンブロットを行った。用いた抗体を表9に示す。

表9

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
c-KIT	1:1000	3074S	Cell Signaling Technology
AXIN2	1:500	2151S	Cell Signaling Technology
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	0.1 µg/ML	FL-335	Santa Cruz Biotechnology

4. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

1.3に記載した方法で細胞からRNAを回収し、1.3に記載した方法に準じてRT-qPCRを行った。用いたプライマーを表10に示す。

表10

因子名	フォワード	リヴァース	プローブ番号
c-KIT	5'-gcttaccagaagcttccatagtg-3'	5'-aggatgaactgcaaatacataggg-3'	6

5. 免疫蛍光染色 (Immunofluorescence staining)

カバースリップ (MATSUNAMI) を敷いた6-well plate (IWAKI) に細胞を播種し、24時間培養した後、培地で希釈した薬剤 (最終濃度 3 µM IWR-1もしくは1 µM G007-LK) を200 µL/well添加し、120時間、37°C、5%のCO₂のインキュベーターで培養した。その後、メEDIUMを除去し、PBSで洗浄し、2% Paraformaldehyd (PFA) /PBSを10分間処理して細胞を固定した。これをPBSで2分5回洗浄し、膜透過処理として0.5% NP-40/PBSに10分間浸漬した。その後、PBSで2分5回洗浄し、0.02% アジ化ナトリウム/PBSを加えて4°Cに保存した。このカバースリップを1% BSAPBSで15分間ブロッキング処理し、1% BSA/PBSで希釈した一次抗体を4°Cで一晩反応させた。翌日、1% BSA/PBSで2分5回洗浄し、1% BSAで希釈した二次抗体を室温で30分間反応させた。その後、カバースリップを1% BSA/PBSで2分5回洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (フナコシ) を添加してスライドガラス (MATSUNAMI) に封入した。観察はデジタルCCDカメラ (DP70、オリンパス) 付き蛍光顕微鏡 (IX-71、オリンパス) を用いて行った。用いた一次抗体は抗c-KIT (1 : 1,000、3074S、Cell Signaling Technology)、二次抗体はAlexa 488 Anti-rabbit IgG

[1:500 (4 µg/ml) 、 Thermo Fisher Scientific] である。

【結果】

COLO-320DMおよびDLD-1細胞においてAXIN2をノックダウンし、タンキラーゼ阻害剤 (IWR-1 およびG007-LK) を処理したときのc-KITの発現変化をウェスタンブロットで検討した。その結果、いずれの阻害剤の場合においても、c-KITの発現低下が抑制されることが明らかとなった (図28A)。このときのRNAを抽出してc-KIT RNAレベルを定量したところ、タンパク質レベルと同様に、同RNA量はタンキラーゼ阻害剤によって減少すること、AXIN2のノックダウンによってこの減少が観察されなくなることがわかった (図28B)。さらに、免疫蛍光染色においても、G007-LKによるc-KITの発現低下とAXIN2ノックダウンによる同効果の消失が観察された (図29A、B)。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤処理によるCOLO-320DM CD44陽性細胞選択的増殖抑制にはAXIN2を介したc-KITの発現抑制に起因する可能性が考えられた。

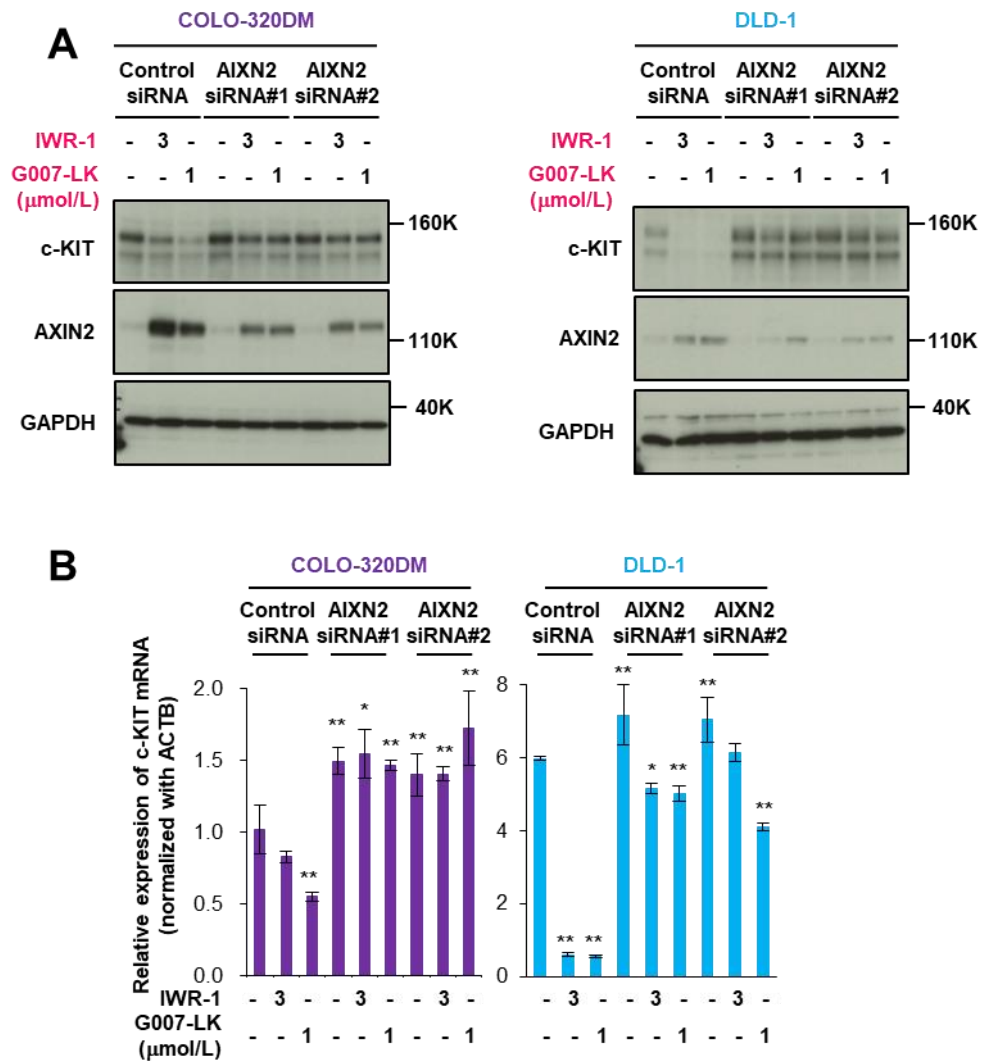


図28. タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2依存的なc-KIT発現の抑制

A: COLO-320DM および DLD-1細胞に AXIN2 siRNA を導入して48時間培養した後、タンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、ウェスタブロットティングで AXIN2および c-KIT の発現レベルを調べた。

B: A と同様に処理した細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR で c-KIT RNA レベルを定量した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

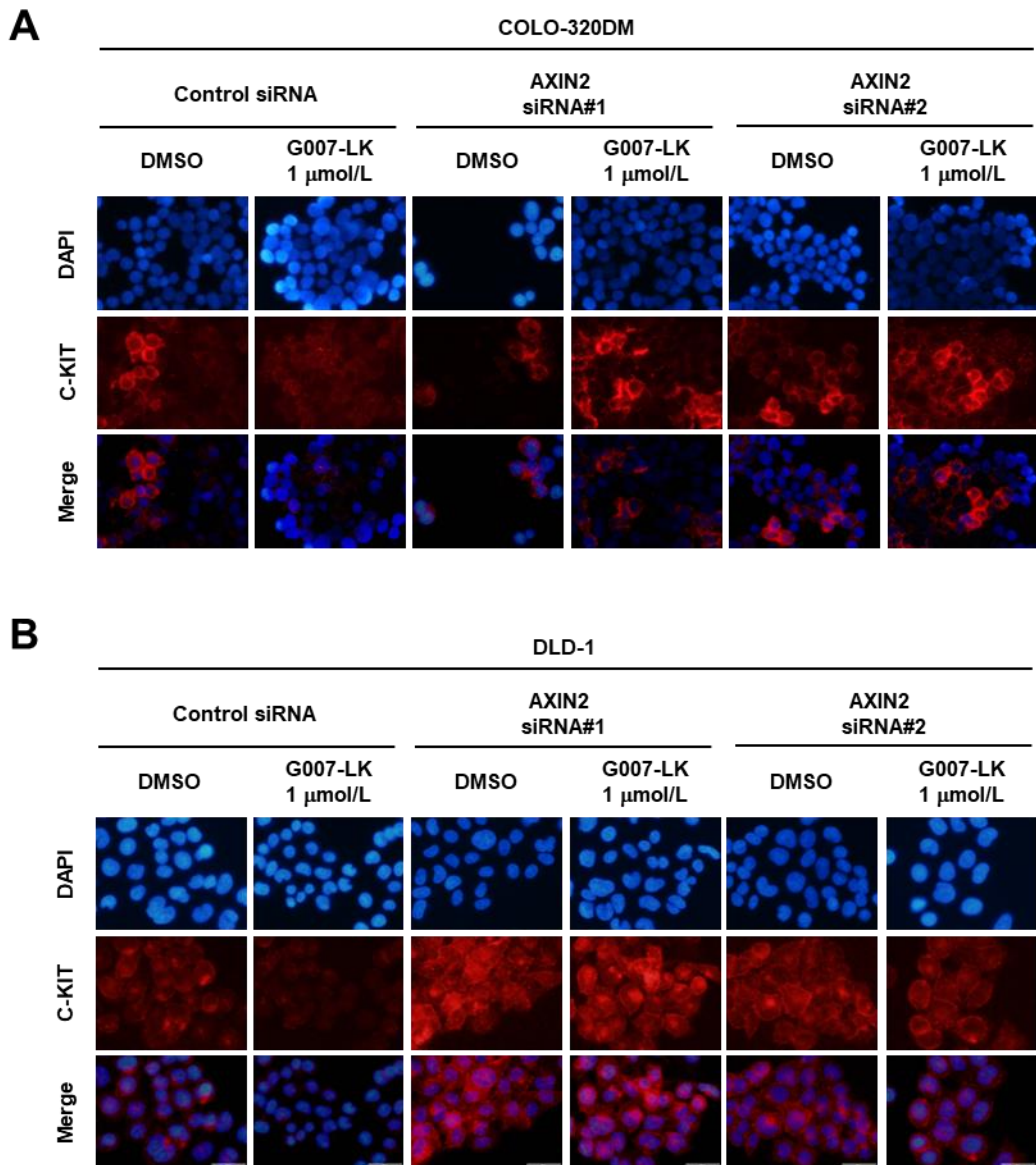


図29. タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2依存的なc-KIT発現の抑制（免疫蛍光染色法による解析）

A, B: COLO-320DMおよびDLD-1細胞にAXIN2 siRNAを導入して48時間培養した後、タンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、免疫蛍光染色でc-KITの発現変化を観察した。

第3章 タンキラーゼ阻害剤はAXIN2依存的にc-KIT遺伝子プロモーターの転写活性を抑制する

3.1 タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2を介したc-KIT発現制御の分子機序（プロモーター抑制）

【目的】

ここまでに得られた結果から、タンキラーゼ阻害剤によるがん幹細胞様CD44陽性細胞選択的増殖抑制には、AXIN2を介したc-KITの発現抑制が関与すると考えられる。しかし、AXIN2によるc-KIT発現抑制の分子機序は不明である。そこで、c-KIT抑制に関わる4つの可能性（1. c-KITタンパク質の安定性、2. c-KITタンパク質がユビキチン化、3. RNA安定性の低下、4. mRNA発現を抑制）について検討する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1に記載した方法に準じて行った。

3. ウェスタンブロッティング

COLO-320DM細胞にタンキラーゼ阻害剤G007-LKを最終濃度1 $\mu\text{mol/L}$ になるように添加し、5日間37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。細胞回収3時間前にcycloheximide (CHX) を100 $\mu\text{g/mL}$ で0.5時間、1時間、2時間もしくは3時間処理した。これらの細胞を回収し、1.3に記載

した方法でウェスタンブロット解析を行った。もう一つの実験では、COLO-320DM細胞をG007-LK (1 $\mu\text{mol/L}$) 存在下で5日間培養し、さらに10 $\mu\text{mol/L}$ MG132で6時間処理した後、細胞を回収してウェスタンブロットを行った。用いた抗体を表11に示す。

表11

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
c-KIT	1:1000	3074S	Cell Signaling Technology
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	0.1 $\mu\text{g/ML}$	FL-335	Santa Cruz Biotechnology

4. 免疫沈降

COLO-320DM細胞を1,000 rpm、4°Cで3分間遠心し、回収したペレットにWhole Cell Lysis Buffer [WCE: 150 mM NaCl、500 mM Tris-HCl (pH 8)、1% NP-40に2% protease inhibitor cocktail (ナカライテスク、25955-11)、1% PhosSTOP (Roche、04906837001)、150 mMジチオスレイトールを添加] を加えてペレットを懸濁し、10分ごとにボルテックス混和しながら氷上に30分間静置した。その後、15,000 rpm、4°Cで30分間遠心し、上清をWhole Cell Lysateとした。Bio-Rad protein assay Dye reagent (Bio-Rad) でタンパク質定量し、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように1.5-mLチューブに分取し、抗体を2 μg /チューブ添加して一晩4°Cで反応させた。翌日、このライセートにDynabeads (invitrogen、10004D) を30 μL 入れ、4°Cで1時間反応させた後、マグネットスタンドにセットし、800 μL のLysis bufferで3回洗浄した。その後、免疫沈降物についてウェスタンブロットで解析した。用いた抗体は、表12に記載した通りである。

表12

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
c-KIT (IP and IB)	1:1000	3074S	Cell Signaling Technology
Anti-Ubiquitinated proteins, clone FK2 (IB)	2 $\mu\text{g/mL}$	46-263	Millipore

5. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

COLO-320DM、DLD-1細胞にG007-LK (1 $\mu\text{mol/L}$) を添加し、37°C、5% CO₂のインキュベーターで5日間培養した。その後、actinomycin Dを10 $\mu\text{g/mL}$ で3時間、6時間、9時間処理した細胞を回収してRNAを抽出し、RT-qPCRを行った。RT-qPCRは1.3に記載した方法に準じて行った。用いたプライマーを表13に示す。

表13

因子名	フォワード	リヴァース	プローブ番号
c-KIT	5'-gcttaccagaagcttccatagtg-3'	5'-agggtgaactgcaaatacataggg-3'	6

6. プラスミドの構築

6.1 c-KITプロモーターレポーターベクターの作製

ヒトc-KIT遺伝子のプロモーター領域 (-433~+1) は、COLO-320DM細胞のゲノムDNAを鋳型として、KOD Plusポリメラーゼ [Toyobo (Osaka, Japan)] を用いたPCR [94°C 2 min、(94°C 30 sec、55°C 10 sec、72°C 3min) \times 35サイクル] により増幅した。用いたプライマーを表14に示す。このPCR産物を制限酵素Kpn IおよびHind IIIで切断し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターであるpGL3-basicベクターにクローニングし、c-KITプロモーターレポーターベクターを構築した。クローニングされたc-KITプロモーター配列は、前述の手法にてシーケンシングにより確認した。コントロールとして使用したphRL-CMV Renilla reniformisルシフェラーゼレポーターベクターはpromegaから入手した。

表14

因子名	フォワード	リヴァース
c-KIT	5'-aaaggtaccgtcggggctcaattcctaacgct-3'	5'-aaaaagcttctggtccacggtccagctctc-3'

6.2 レポーターアッセイ

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を 3.5×10^5 cells/wellの割合で24 well plateに播

種し、一晚培養した。翌日に上述のc-KITプロモーターレポーターベクターとpGL3-Basicベクターをそれぞれ1 mg/well、phRL-CMV Renilla reniformisルシフェラーゼレポーターベクターを0.1 µg/well、Lipofectamine 2000 2 µLとOPTI-MEM 25 µLを1.5-mLチューブ内で混和し、15分間室温で静置した。その後、前日播種した細胞に各ベクター溶液を添加し、120時間培養した後、培地を除去して新しい培地80 µL、基質としてルシフェリンとセレンテラジンが入った試薬を匂い別に添加し、TECAN GENiosで発光を測定した。

7. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.4に記載した方法に準じて行った。用いたsiRNAは以下の通りである：Silencer Select [AXIN2 (#1: s229719, #2: s15818)、negative control (#1)]。

【結果】

タンキラーゼ阻害剤によってc-KITの発現レベルが減少するメカニズムとして4つの可能性を検討した。(1) タンキラーゼ阻害剤処理でc-KITタンパク質の安定性が低下する可能性を検討した。すなわち、COLO-320DM細胞にcyclohexamideを100 ng/mLの濃度で処理し、ウェスタンブロットを行った。その結果、c-KITタンパク質の半減期は約3時間であることが分かった。ここでタンキラーゼ阻害剤G007-LKを処理したところ、c-KITタンパク質の半減期が短縮することはない、むしろ安定になる傾向が観察された(図30A)。この結果から、タンキラーゼ阻害剤処理によるc-KITの発現レベルの低下は、タンパク質の安定性の低下によるものではないと考えられた。(2) タンキラーゼ阻害剤によりc-KITタンパク質がユビキチン化され、積極的に分解される可能性を検討した。その結果、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの低下はプロテアソーム阻害剤であるMG132の影響を受けないことが見出された(図30B)。さらに、ユビキチン化特異的に検出する抗体FK2を用いたウェスタンブロットティングでも、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITタンパク質のユビキチン化は確認できなかった(図30C)。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの減少にユビキチン分解が関与している可能性は低いと考えられた。(3) RNA安定性の

低下によるc-KIT発現減少の可能性を検証するため、actinomycin D添加時のc-KIT RNAの安定性を調べた。タンキラーゼ阻害剤で前処理したCOLO-320DM細胞もしくはDLD-1細胞に10 µg/mLのactinomycin Dを最長で9時間処理した。この細胞からRNAを抽出し、RT-qPCR法でRNAの発現レベルを検討したところ、タンキラーゼ阻害剤処理の有無でc-KIT RNAレベルの安定性に差は認められなかった（図31A）。（4）タンキラーゼ阻害剤処理でc-KITのRNAレベルが減少したことから（図14B、16A-C）、タンキラーゼ阻害剤が同遺伝子のmRNA発現を抑制すると考えた。c-KITプロモーターとしては開始コドンより約500 bp離れた領域が実験に用いられており(58)、この先行実施例を参考に、c-KITプロモーター領域を開始コドン寄り-433 baseから+1 baseまでの領域としてレポーターベクターを作製した。同ベクターをCOLO-320DMおよびDLD-1細胞に導入し、タンキラーゼ阻害剤を処理した際のc-KITプロモーター活性の変化をレポーターアッセイにて検討した。その結果、タンキラーゼ阻害剤を処理することでc-KITプロモーター活性が濃度依存的に減少することが明らかとなった（図31B）。さらに、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を用いて検討したところ、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITプロモーター活性の減少はCD44陰性細胞よりCD44陽性細胞で顕著に観察された（図32）。これらの細胞においてさらにAXIN2をノックダウンすると、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITプロモーター活性の低下が回復した（図33）。以上の結果から、タンキラーゼ阻害剤によるc-KIT発現レベルの減少は、同遺伝子プロモーターのAXIN2依存的な活性減少に起因する可能性が示唆された。

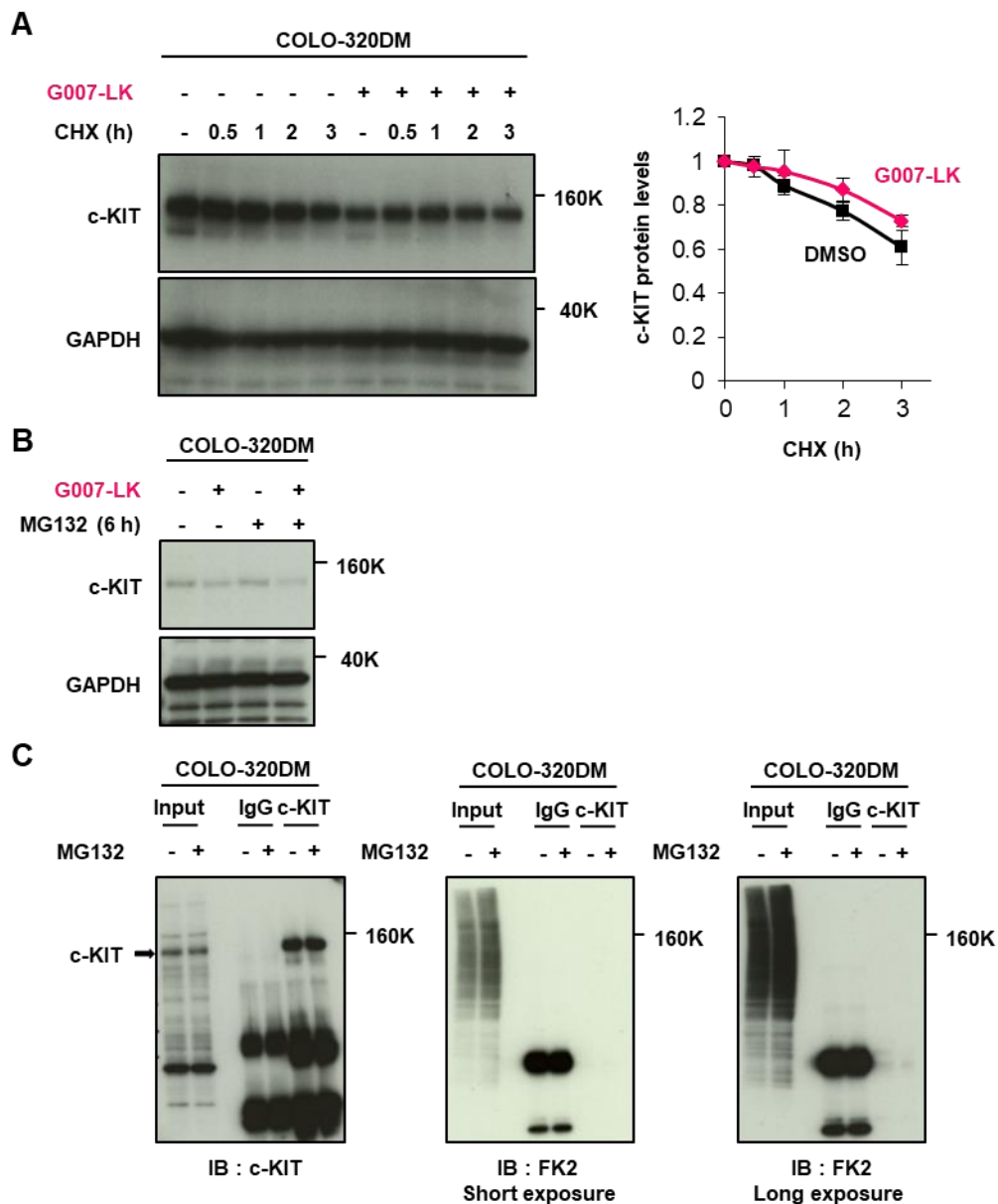


図30. タンキラーゼ阻害剤はc-KITタンパク質の安定性には影響を与えない

A: c-KITタンパク質の安定性（ターンオーバー）に対するG007-LKの効果。左：1 $\mu\text{mol/L}$ G007-LKの処理・未処理下でCOLO-320DM細胞を100 $\mu\text{g/mL}$ のcycloheximide (CHX) で処理したのち、ライセートを調製してウェスタンブロット解析を行った。右：c-KITタンパク質のシグナル強度をデンストメトリーで定量し、GAPDHタンパク質のシグナル強度で補正した。0時間の値を1と定義した。黒：DMSO、赤：G007-LK (1 $\mu\text{mol/L}$)。

B: G007-LKによるc-KIT発現レベルの低下に対するMG132の効果。COLO-320DM細胞を1 $\mu\text{mol/L}$ G007-LKで120時間処理し、回収6時間前に10 $\mu\text{mol/L}$ のMG132を培地に加えた。ライセートを調製してウェスタンブロットで解析した。

C: c-KITユビキチン化の検出。COLO-320DM細胞を10 $\mu\text{mol/L}$ MG132で6時間処理し、ライセートを調製してc-KIT抗体またはコントロール免疫グロブリン (IgG) で免疫沈降した。沈降物について、c-KIT抗体および抗マルチユビキチン (FK2) 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

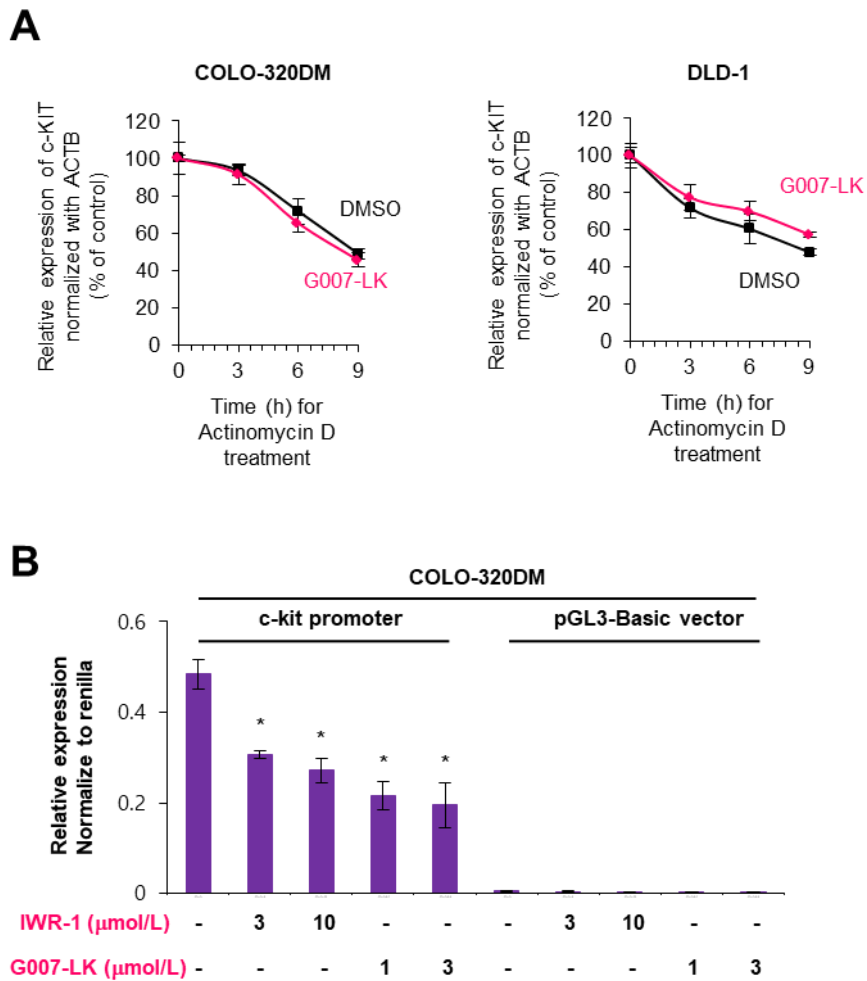


図31. タンキラーゼ阻害剤はc-KIT mRNAの安定性に影響を与えない

A: COLO-320DMおよびDLD-1細胞にDMSOもしくは1 $\mu\text{mol/L}$ G007-LKを処理し、actinomycin D (10 $\mu\text{g/mL}$) で3、6、9時間処理した後にRNAを回収し、RT-qPCRでc-KIT RNAのレベルを定量した。データはACTB RNAの発現レベルで補正し、0時間での値を100%と定義した。

B: COLO-320DMにc-KITプロモーターレポーターベクターを導入し、タンキラーゼ阻害剤を処理した。120時間後、レポーター活性を測定した。

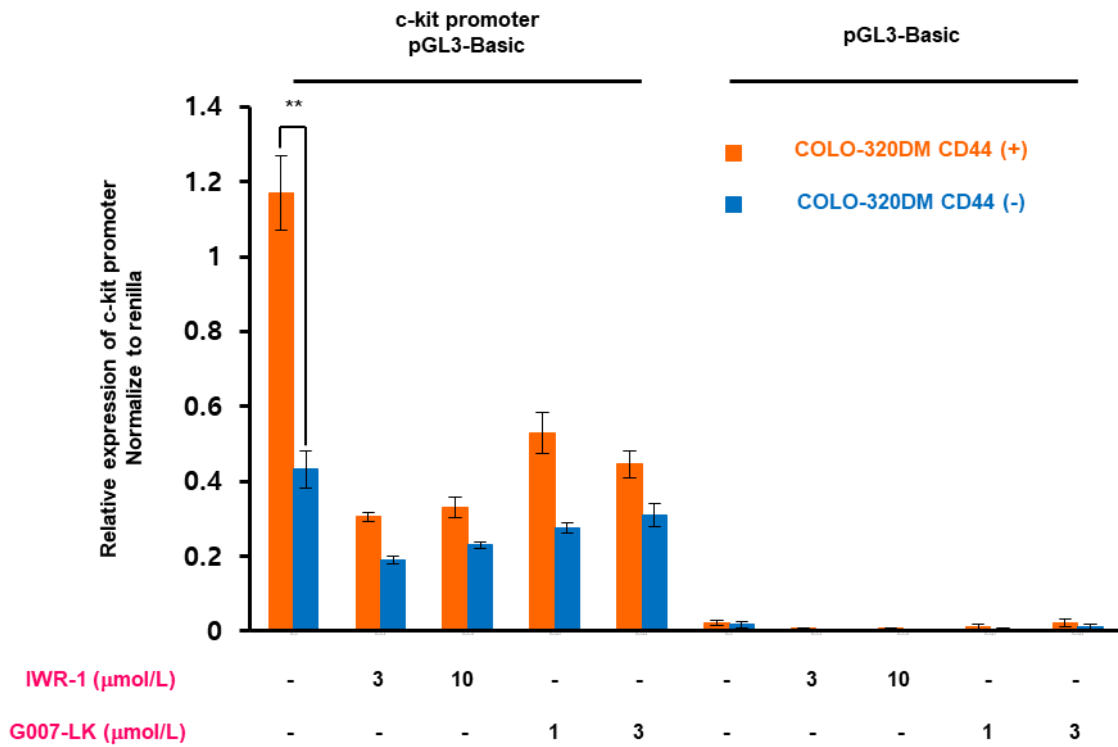


図32. タンキラーゼ阻害剤によるc-KITプロモーター活性の抑制

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にc-KITプロモーターレポーターベクターを導入し、タンキラーゼ阻害剤を120時間処理した。c-KITプロモーター活性は、ルシフェラーゼアッセイで評価した。** $P < 0.01$

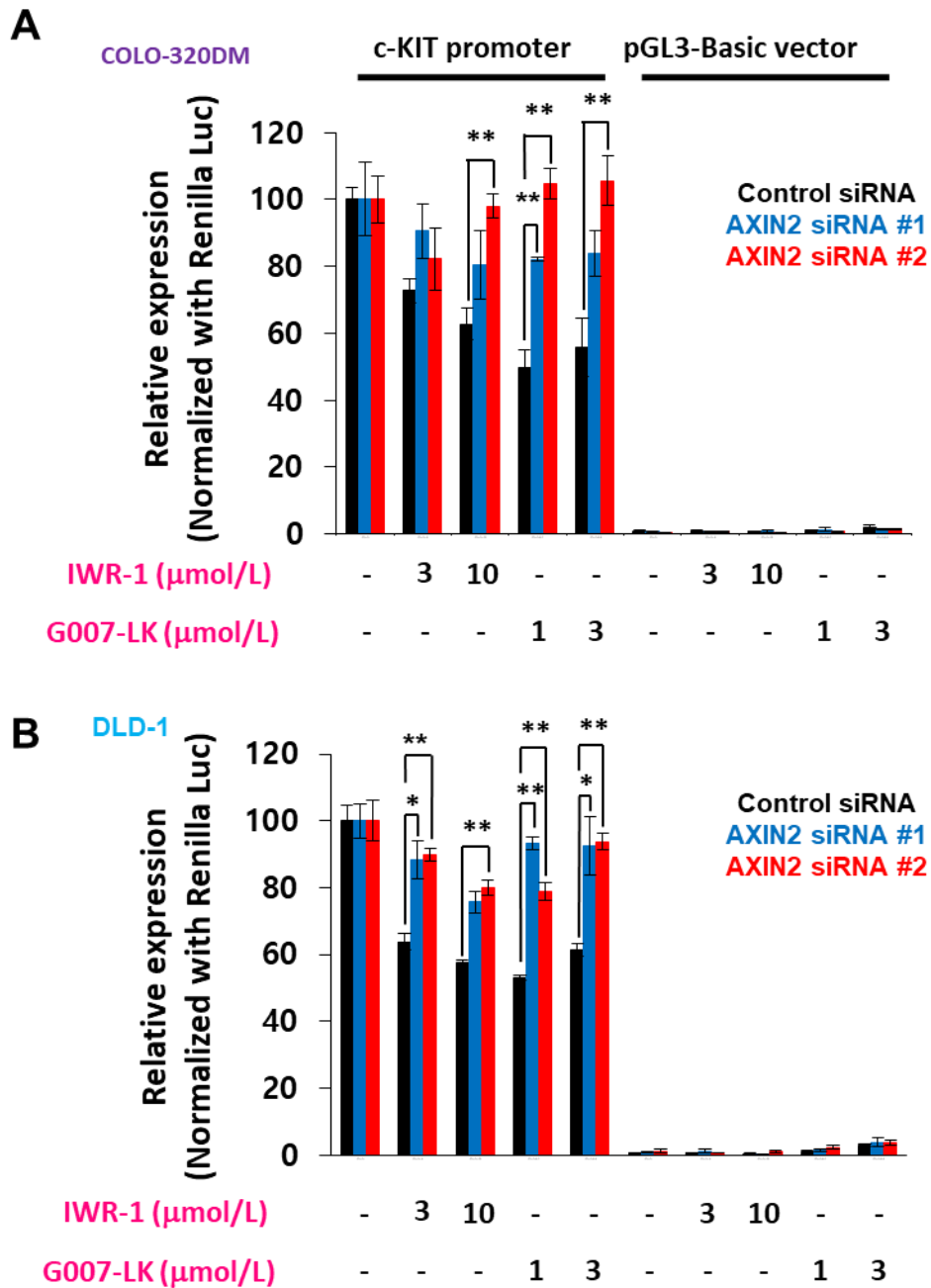


図33. タンキラーゼ阻害剤はAXIN2依存的にc-KITプロモーター活性を抑制する

A-B: COLO-320DMおよびDLD-1細胞にAXIN2 siRNAを導入し、2日間の培養後、c-KITプロモーターレポーターベクターを導入した。細胞をIWR-1またはG007-LKで120時間処理し、ルシフェラーゼアッセイでc-KITプロモーター活性を評価した。 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

3.2 大腸がん細胞におけるc-KITプロモーター活性に寄与する転写因子の検索

【目的】

タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現抑制がAXIN2を介したc-KITプロモーター活性の抑制により生じることが明らかになったので、同プロモーターを介した遺伝子発現に関与している転写因子を探索する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM CD44陽性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。

2. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.4に記載した方法に準じて行った。用いたsiRNA情報は以下である。

Silencer Select [SP1 (s13319)、 HOXB6 (s6803)、 CNOT6 (s33100)、 PHB (s10426)、 PHB2 (s22343)、 UPF2 (s24947)、 UPF3B (s535067) and negative control (#1)

3. ウェスタンブロッティング

剥がれたCOLO-320DM CD44陽性細胞を回収し、ウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングは1.3に記載した方法に準じて行った。用いた抗体は以下である。

表15

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
c-KIT	1:1000	3074S	Cell Signaling Technology
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	0.1 µg/ML	FL-335	Santa Cruz Biotechnology

4. TFbindデータベース解析

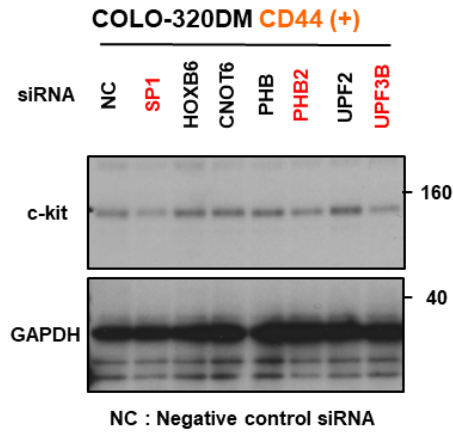
3.1で作製したc-KITプロモーター領域配列を、<http://tfbind.hgc.jp>に導入し、解析を行った。

【結果】

タンキラーゼ阻害剤によるc-KITプロモーター活性制御に関与する転写因子を見出すため、まず、タンキラーゼに直接結合するモチーフを持つ転写因子群に着目した。Liら(59)によれば、タンキラーゼ阻害剤XAV939により発現変動する転写因子としてUPF2、UPF3B、HOXB6、PHB、PHB2、CNOT6などが挙げられている。これらの転写因子に加えて、c-KIT遺伝子発現を制御することが報告されている転写因子であるSP1(60)も合わせて検討した。具体的には、COLO-320DM CD44陽性細胞においてこれらの転写因子をsiRNAでノックダウンし、c-KITタンパク質の変動をウェスタンブロッティングで検討した。その結果、SP1、PHB2、UPF3Bのいずれかをノックダウンすることで、c-KITタンパク質が減少することが明らかとなった(図34A)。これらの結果から、SP1、PHB2とUPF3Bの転写因子はc-KITプロモーター領域に結合し、c-KITの転写を制御する候補因子として考えた。

上記の検討に加え、c-KITプロモーター領域の塩基配列(-433~+1)を、転写因子結合モチーフ検索サイトTFBind(<http://tfbind.hgc.jp>, 最終アクセス日: 2018年11月10日)に入力して検索した結果、c-KITプロモーター領域(-433~+1)で結合する候補因子(複数重なる因子含む)として537個の因子が得られた。得られたデータの中、上記3種類の転写因子のうちSP1のみがヒットした(図34B)。TFBindの結果でSP1は61ヶ所(全体537ヶ所)で結合するモチーフが存在することが分かった。それ以外の候補転写因子としてAP2(38ヶ所)、P53(4ヶ所)、CP2(14ヶ所)、E2F(14ヶ所)、AP4(36ヶ所)、GATA1(13ヶ所)、AML1(3ヶ所)などがデータベースより得られた。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤によって制御される候補転写因子としてSP1を選別した。SP1は、4種類のZnフィンガーDNA結合転写因子ファミリーのプロトタイプメンバーである(61,62)。SP1は普遍的に発現し、様々なハウスキーピング遺伝子および遺伝子発現に必要なトランス活

性因子として機能する。SPファミリーの中では、SP5がWnt/ β -カテニン経路の下流に存在し、大腸がんで高発現していることが報告されている(63)。しかしながら、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞ではSP5はほとんど発現していないことがマイクロアレイ解析のデータより確認された(未発表データ)。他方、c-KITプロモーター領域に結合する転写因子としては、SP1以外にもGATA2(64)などが報告されている。そこで次項では、SP1とGATA2のc-KITプロモーターへの結合とタンキラーゼ阻害剤の影響を検討することにした。

A**B**

M00085	V\$ZID_01	0.776141	342	(+)	NGGCTCYATCAYC	CGGCTCTGGGGGC
M00189	V\$AP2_Q6	0.826517	342	(-)	MKCCCSCNGGCG	CGGCTCTGGGGG
M00084	V\$MZF1_Q2	0.813797	344	(+)	KNNNKAGGGGNA	GCTCTGGGGGCTC
M00189	V\$AP2_Q6	0.878217	344	(-)	MKCCCSCNGGCG	GCTCTGGGGGCT
M00189	V\$AP2_Q6	0.787914	345	(-)	MKCCCSCNGGCG	CTCTGGGGGCTC
M00239	V\$T3R_01	0.743138	345	(+)	SNNTRAGGTCACGSNN	CTCTGGGGGCTCGGCT
M00141	V\$LYF1_01	0.835420	346	(+)	TTGGGAGR	TCTGGGGGC
M00058	V\$HEN1_Q2	0.715410	348	(+)	NNGGGNCGCAGCTGCNCCNN	TGGGGGCTCGGCTTTGCCGCGC
M00068	V\$HEN1_Q1	0.747221	348	(+)	NNNGGNCNCAGCTGCNCCNN	TGGGGGCTCGGCTTTGCCGCGC
M00196	V\$SP1_Q6	0.782746	348	(+)	NGGGGGCGGGGYN	TGGGGGCTCGGCT
M00255	V\$GC_01	0.831700	348	(+)	NRGGGGCGGGGCK	TGGGGGCTCGGCTT
M00008	V\$SP1_Q1	0.887599	350	(+)	GRGGCRGGGW	GGGGCTCGGC
M00051	V\$NFKAPPAB50_01	0.752332	350	(-)	GGGGATYCCC	GGGGCTCGGC
M00272	V\$P53_Q2	0.813013	351	(-)	NGRCWTGYCY	GGGCTCGGCT
M00072	V\$CP2_Q1	0.799743	354	(-)	GCMNAMCMAG	CTCGGCTTTCG
M00008	V\$SP1_Q1	0.800396	355	(+)	GRGGCRGGGW	TCGGCTTTCG
M00143	V\$PAX5_Q1	0.775416	356	(-)	NCNNNRNKCANNNGWGNRKRGC	SRNNN CGGCTTTGCCGCGCTCGCTGCACTTGGG
M00086	V\$IK1_Q1	0.791132	357	(-)	NNNTGGGAATRCC	GGCTTTGCCGCGC
M00180	V\$E2F_Q6	0.764279	359	(-)	NNGCGCGAAANTK	CTTTGCCGCGCTC
M00050	V\$E2F_Q2	0.956679	360	(+)	TTTSGCGC	TTTGCCGC
M00050	V\$E2F_Q2	0.743405	362	(+)	TTTSGCGC	TGCCGCGC
M00245	V\$EGR3_Q1	0.765208	364	(-)	NTGCGTGGGCGK	CCGCGCTCGCTG
M00104	V\$CDPCR1_Q1	0.792250	366	(-)	NATCGATCGS	GCGCTCGCTG
M00004	V\$CMYB_Q1	0.753089	368	(+)	NCNRNNGRCNGTTGGKGG	GCTCGCTGCACTTGGGCG
M00175	V\$AP4_Q5	0.785637	371	(+)	NNCAGCTGNN	CGCTGCACTT
M00055	V\$NMYC_Q1	0.746959	373	(+)	NNNCACGTGNNN	CTGCACTTGGGC
M00055	V\$NMYC_Q1	0.811131	373	(-)	NNNCACGTGNNN	CTGCACTTGGGC
M00277	V\$LMO2COM_Q1	0.916016	373	(-)	SNNCAGGTGNNN	CTGCACTTGGGC
M00189	V\$AP2_Q6	0.838006	374	(-)	MKCCCSCNGGCG	TGCACTTGGGCG
M00217	V\$USF_C	0.848038	375	(-)	NCACGTGN	GCACTTGG

M00227	V\$VMYB_02	0.793622	375	(-)	NSYAACGGN	GCACTTGGG
M00253	V\$CAP_01	0.874322	375	(+)	NCANNNNN	GCACTTGG
M00240	V\$NKX25_01	0.862983	376	(-)	TYAAGTG	CACTTGG
M00072	V\$CP2_01	0.856775	378	(-)	GCNMNAMCMAG	CTGGGCGAGA
M00141	V\$LYF1_01	0.836187	378	(+)	TTTGGGAGR	CTGGGCGA
M00050	V\$E2F_02	0.745904	379	(+)	TTTSGCGC	TTGGGCGA
M00005	V\$AP4_01	0.768012	380	(+)	WGARYCAGCTGYGGNCNK	TGGGCGAGAGCTGGAACG
M00050	V\$E2F_02	0.743405	381	(-)	TTTSGCGC	GGGCGAGA
M00075	V\$GATA1_01	0.793189	382	(+)	SNNGATNNNN	GGCGAGAGCT
M00175	V\$AP4_Q5	0.823721	385	(+)	NNCAGCTGNN	GAGAGCTGGA
M00176	V\$AP4_Q6	0.840641	385	(+)	CWCAGCTGGN	GAGAGCTGGA
M00184	V\$MYOD_Q6	0.825416	385	(-)	NNCANCTGNY	GAGAGCTGGA
M00180	V\$E2F_Q6	0.733395	387	(+)	NNGCGCGAAANTK	GAGCTGGAACGTG
M00236	V\$ARNT_01	0.802992	389	(+)	NNNNNCACGTGNNNNN	GCTGGAACGTGGACCA
M00236	V\$ARNT_01	0.785501	389	(-)	NNNNNCACGTGNNNNN	GCTGGAACGTGGACCA
M00251	V\$XBP1_01	0.750000	389	(+)	NNGNTGACGTGKNNNWT	GCTGGAACGTGGACCAG
M00072	V\$CP2_01	0.786878	390	(-)	GCNMNAMCMAG	CTGGAACGTGG
M00118	V\$MYCMAX_01	0.753108	390	(+)	NNACCACGTGGTNN	CTGGAACGTGGACC
M00118	V\$MYCMAX_01	0.753108	390	(-)	NNACCACGTGGTNN	CTGGAACGTGGACC
M00121	V\$USF_01	0.749604	390	(+)	NNRYCACGTGRYNN	CTGGAACGTGGACC
M00121	V\$USF_01	0.749604	390	(-)	NNRYCACGTGRYNN	CTGGAACGTGGACC
M00055	V\$NMYC_01	0.768552	391	(+)	NNNCACGTGNNN	TGGAACGTGGAC
M00055	V\$NMYC_01	0.806265	391	(-)	NNNCACGTGNNN	TGGAACGTGGAC
M00123	V\$MYCMAX_02	0.838718	391	(-)	NANCACGTGNW	TGGAACGTGGAC
M00187	V\$USF_Q6	0.833100	392	(-)	GYCACGTGNC	GGAACGTGGA
M00217	V\$USF_C	0.845018	393	(-)	NCACGTGN	GAACGTGG
M00271	V\$AML1_01	0.873587	401	(-)	TGTGGT	ACCAGA
M00175	V\$AP4_Q5	0.828074	403	(+)	NNCAGCTGNN	CAGAGCTCGG
M00176	V\$AP4_Q6	0.833626	403	(+)	CWCAGCTGGN	CAGAGCTCGG
M00115	V\$TAXCREB_02	0.617324	406	(+)	RTGACGCATAYCCCC	AGCTCGGATCCCATC

図34. 大腸がん細胞においてc-KIT遺伝子発現に関わる転写因子の検索

A: COLO-320DM CD44陽性細胞にSP1、HOXB6、CNOT6、PHB、PHB2、UPF2およびUPF3Bの siRNAを導入し、2日間の培養後に調製したライセートをウェスタンブロットで解析した。

B: ヒトc-KITプロモーター配列をTfbindにて解析し、c-KITプロモーター領域に結合する可能性のある転写因子のリストを記載した。

3.3 c-KITプロモーター制御における転写因子SP1の寄与

【目的】

COLO-320DM細胞およびDLD-1細胞において、転写因子SP1およびGATA2のc-KITプロモーター領域への結合とそれに対するタンキラーゼ阻害剤の影響を明らかにする。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DMの培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. クロマチン免疫沈降

タンキラーゼ阻害剤 (IWR-1、G007-LK) を5日間処理した細胞を1%ホルムアルデヒドで10分間架橋し、0.125 Mグリシンで室温で5分間処理した。この細胞を4 mLのPBSで2回洗浄し、スクレーパーで1.5-mLチューブに回収した。回収したサンプルを3,000 rpm、4°Cで5分間遠心し、上清を除去した。細胞ペレットにSDS lysis buffer [1% SDS、50 mM Tri-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA および2 tablet/100 mLのcOmplete EDTAフリーProtease Inhibitor Cocktail (Roche)] で溶解し、超音波 (BIORUPTOR、COSMO BIO) (30 sec、ON/OFF) 処理して約500ヌクレオチドのクロマチン断片を得た。各サンプルの10%量をインプットとして冷凍庫 (-80°C) に保存した。残りのサンプルを15-mLチューブに移し、9倍容量のdilution buffer (1% Triton-X100、20 mM Tri-HCl、2 mM EDTA、150 mM NaClおよび2 tablet/100 mLのcOmplete EDTAフリーProtease Inhibitor Cocktail) で希釈し、5 µgのウサギ抗SP1 (Cat.#CS200631、MILIPORE)、5 µgのウサギ抗GATA2 (ab22849、Abcam) またはウサギNormal-IgG (catalog. PP64B、MILIPORE) を添加し、低温室 (4°C) で一晚反応させた。翌日、30 µLのDynabeadsを加え、4°Cで1時間反応させた。その後、3000 rpm、4°Cで5分間遠心し、上清を除去した。このサンプルを洗浄バッファー [1% NP-40、0.7% デオキ

シコール酸ナトリウム塩一水和物、50 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、0.5 M LiCl、1 mM EDTA] で5回 (1回当たり1 mL) 洗浄し、その後TEバッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA) で1回洗浄した。最終洗浄後、サンプルを200 μ LのSDS Lysis bufferに再懸濁し、65°Cで2分ごとに1回ボルテックス混和しながら15分間インキュベートした。その後、前日、取っておいたインプットにも3倍量のSDS lysis bufferを添加し、上記のサンプルと同時に65°Cで一晩インキュベートし、脱クロスリンクした。このサンプルに5倍量のPB buffer (QIAquick PCR Purification Kit、28104) を加え、columnの上に載せ13,000 rpm、4°Cで1分間遠心し、PE bufferを加えて洗浄し、13,000 rpm、4°Cで1分間遠心し、PE bufferを除いた。その後、50 μ L EB bufferをcolumnの上に載せ、1分間室温に置いた。その後13,000 rpm、4°Cで1分間遠心し、得られたサンプルはリアルタイムPCRで分析した。PCRは、94°C 10 minの後、(94°C 20 sec、60°C 1 min) \times 50サイクル反応させた。用いたプライマー配列を表16に示す。

表16

因子名	フォワード	リヴァース
c-KIT	5'-gggatttctctgcttctgc-3'	5'-cttcgccgagtagtcgca-3'

【結果】

c-KITプロモーターに結合する転写因子SP1およびGATA2についてクロマチン免疫沈降を行い、タンキラーゼ阻害剤によってこれらの結合が変動するかを検討した。その結果、COLO-320DMおよびDLD-1細胞においてタンキラーゼ阻害剤処理で変動する転写因子はSP1のみであった (図35A)。GATA2は、COLO-320DM細胞でタンキラーゼ阻害剤IWR-1を処理することでc-KITプロモーター領域に結合する結合率が減少していたが、G007-LK処理群やDLD-1細胞ではその傾向が認められなかった (図35B)。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現減少は同遺伝子プロモーターからのSP1の遊離によってもたらされている可能性が考えられた。

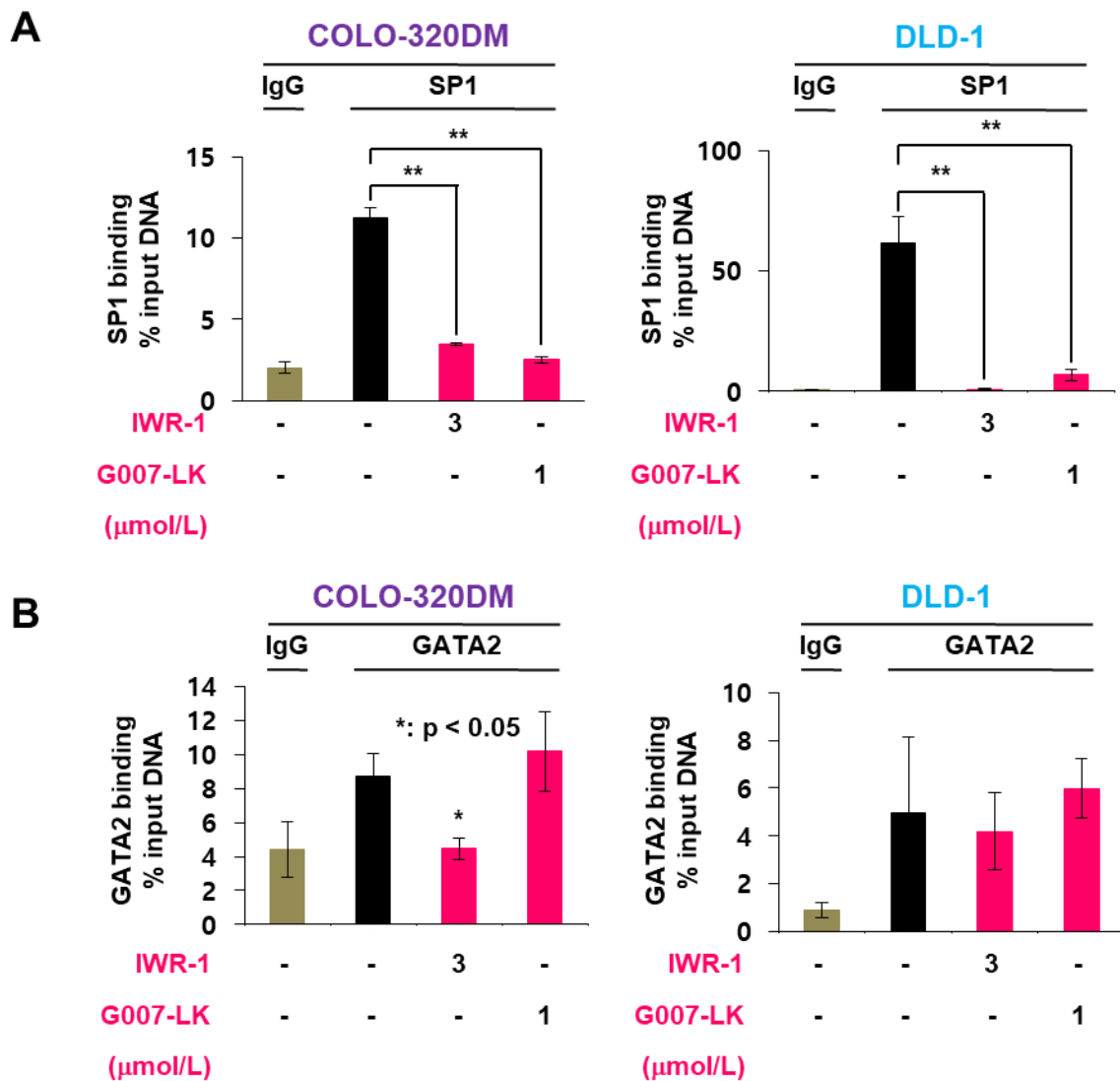


図35. タンキラーゼ阻害剤はSP1のc-KITプロモーターへの結合を抑制する。

A: COLO-320DMおよびDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、抗SP1抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、SP1のc-KITプロモーター領域への結合をqPCRで解析した。 $**P < 0.01$

B: COLO-320DMおよびDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、抗GATA2抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、GATA2のc-KITプロモーター領域への結合をqPCRで解析した。

3.4 タンキラーゼ阻害剤によるSP1のc-KITプロモーターへの結合の抑制はAXIN2の蓄積に依存する

【目的】

SP1のc-KITプロモーター領域への結合に対するタンキラーゼ阻害剤の抑制的効果の特異性を検証するため、タンキラーゼ阻害剤以外の阻害剤の効果を検討する。また、タンキラーゼ阻害剤処理によるSP1のタンパク質の変動およびAXIN2依存性を検討する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1に記載した方法に準じて行った。

3. クロマチン免疫沈降

タンキラーゼ阻害剤（IWR-1、G007-LK）とイマチニブ、ISCK03、PARP-1/2阻害剤（olaparib、veliparib）を5日間処理した細胞を用い、前述（3.3）の方法に準じてクロマチン免疫沈降を行った。また、細胞にAXIN2 siRNAを導入し、2日間の培養後、G007-LKを最終濃度1 $\mu\text{mol/L}$ になるように添加し、さらに5日間培養した。その後細胞を回収し、クロマチン免疫沈降を行った。

4. ウェスタンブロッティング

COLO-320DM、DLD-1、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1を最終濃度3、10 $\mu\text{mol/L}$ 、あるいはG007-LKを最終濃度1、3 $\mu\text{mol/L}$ になるように添加し、5日間培養し

た。その後細胞を回収し、前述（1.3）の方法に準じてウェスタンブロッティングを行った。

5. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.4に記載した方法に準じて行った。用いたsiRNAリストは以下である。

Silencer Select [AXIN2 (#1: s229719, #2: s15818), and negative control (#1)

6. c-KIT プロモーターへの遺伝子変異の導入

10 ng c-KITプロモーターレポーターベクター、5 μ L 10 \times reaction buffer、1 μ L 10 μ M forwardおよびreverseプライマー、1 μ L dNTP mix、3 μ L QuikSolution bufferを混合し、PCR反応を行った。PCR反応は [95 $^{\circ}$ C 1 min、（95 $^{\circ}$ C 50 sec、60 $^{\circ}$ C 50 sec、68 $^{\circ}$ C 6 min） \times 18サイクル、68 $^{\circ}$ C 7 min]で行った。PCR産物に1 μ L Dpn Iを加え、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターで1時間静置した。その間、45 μ L XL10-Gold ultracompetent cellsと2 μ L β -mercaptoethanolを添加して氷上で10分間静置した。その後、Dpn Iと反応が終了したサンプルを2 μ L添加し、42 $^{\circ}$ Cで30秒間ヒートショックを加え、速やかに氷上に2分間置いた。その後、300 μ LのSOCと混合し、Ampicillin含有LB寒天培地に全量播き、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。200 μ Lのチップで掻き取ったコロニーを3 mlの液体LB培地に接種し、ウォーターバスシェーカーで37 $^{\circ}$ C、一晩振とう培養した。その後、QIAprep Spin Miniprep Kitを用いてプラスミドDNAを精製した。用いたベクター配列を表17に示す。

表17

因子名	フォワード	リヴァース
Δ SP1 binding site	5'-ggaggcgagggcgcgagaggaggcgctggaggagg-3'	5'-ccctcctcccagcgccctcctctgcgcgccctgcctcc-3'

7. レポーターアッセイ

3.1に記載した方法に準じて行った。

【結果】

SP1は普遍性の高い転写因子であり、様々な経路で関与している可能性があるため、タンキラーゼ阻害剤以外の阻害剤のSP1に対する影響を検討した。具体的には、c-KIT阻害剤であるイマチニブおよびISCK03、また、PARP阻害剤であるolaparib(65)およびveliparib(66)をCOLO-320DM細胞に処理し、SP1のc-KITプロモーター領域への結合の減弱がタンキラーゼ阻害剤に選択的なものであるかどうかを検討した。その結果、これらのうちいずれの化合物を処理してもSP1の結合減弱は認められたが、タンキラーゼ阻害剤による結合減弱が最も顕著であった（図36AとB）。この結果から、c-KITの発現減少におけるSP1の寄与は、c-KIT自身あるいはPARP-1/2よりもタンキラーゼにより強く支配されていると判断された。

c-KITプロモーター領域にはSP1の結合部位が多数存在する(67)。Parkらは、その中でもSP1結合のコアサイトが存在することを報告した(67)。そこで、上述のc-KITプロモーターレポーターベクターからSP1結合のコアサイト（-153から-141の領域）を欠損させたベクターを構築し、c-KITプロモーター活性を検討した。その結果、同サイトが欠損することでc-KITプロモーター活性が減少することが確認された（図37A）。さらにこのとき、タンキラーゼ阻害剤を処理してもc-KITプロモーター活性が低下しなくなった（図37B）。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITプロモーター活性の減少は、SP1の結合低下に起因すると考えられた。

COLO-320DM、DLD-1、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞において、タンキラーゼ阻害剤はSP1のタンパク質レベルには影響を与えなかった（図38AとB）。一方、AXIN2をノックダウンするとタンキラーゼ阻害剤によるSP1のc-KITプロモーター領域への結合減弱が部分的ではあるが回復した（図39）。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現減少は、AXIN2を介したSP1のc-KITプロモーター領域への結合減弱によるものであることが分かった。

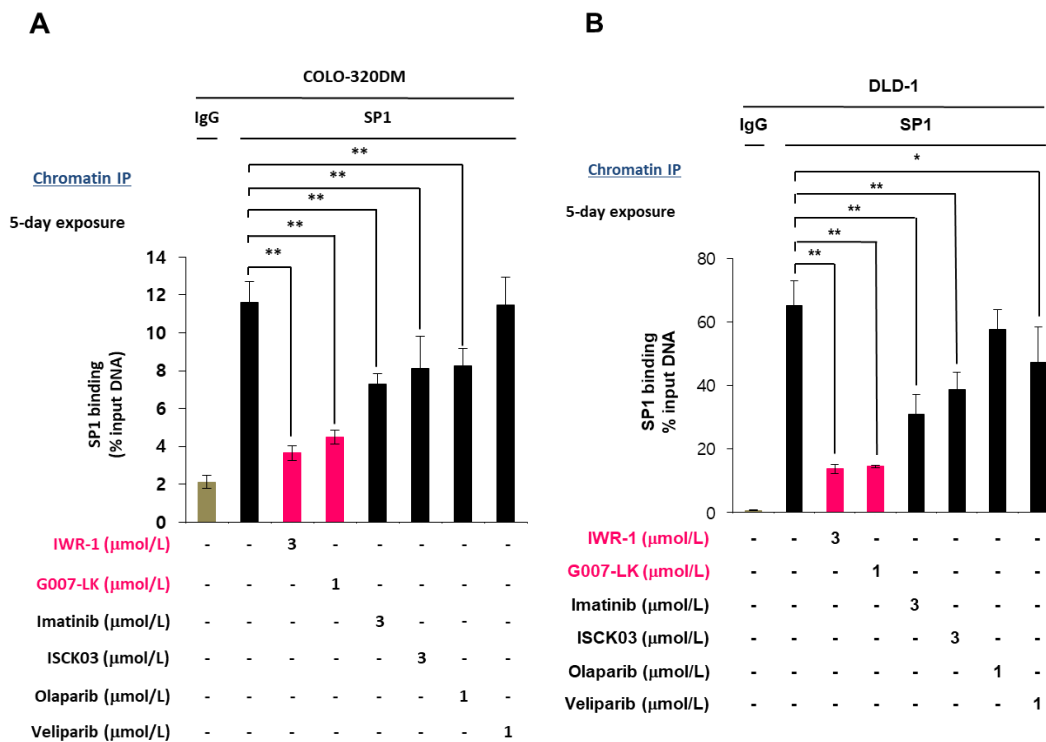


図36. タンキラーゼ阻害剤はc-KITプロモーターへのSP1の結合を抑制する。

A: COLO-320DM細胞にタンキラーゼ阻害剤 (IWR-1、G007-LK)、c-KIT阻害剤 (イマチニブ、ISCK03) とPARP阻害剤 (Olaparib、Veliparib)を120時間処理し、抗SP1抗体を用いたクロマチン免疫沈降でc-KITプロモーター領域に結合するSP1の結合率をqPCRで定量した。

B: DLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤 (IWR-1、G007-LK)、c-KIT阻害剤 (イマチニブ、ISCK03) とPARP阻害剤 (Olaparib、Veliparib)を120時間処理し、抗SP1抗体を用いたクロマチン免疫沈降でc-KITプロモーター領域に結合するSP1の結合率をqPCRで定量した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

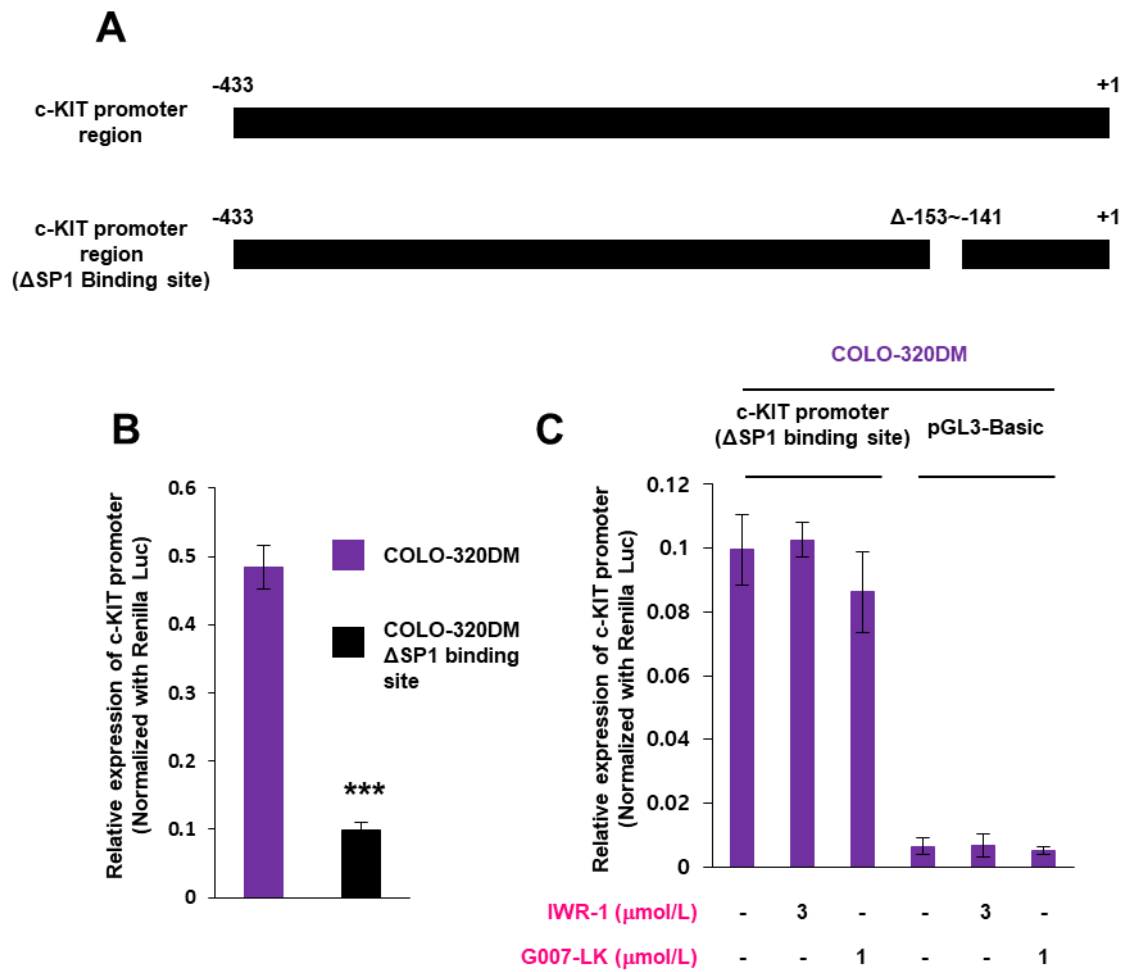


図37. SP1結合サイトの欠損がc-KITプロモーター活性に与える影響

A: SP1 Binding siteが欠損したc-KITプロモーターの模式図

B: c-KITプロモーターベクターとSP1結合サイトの欠損したc-KITプロモーターベクターをCOLO-320DM細胞に導入し、それぞれのプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで評価した。

*** $P < 0.001$

C: タンキラーゼ阻害剤IWR-1 (3 μmol/L) とG007-LK (1 μmol/L) を5日間処理したCOLO-320DM細胞にSP1結合サイトを欠損させたc-KITプロモーターベクターを導入した。レポーターアッセイでc-KITプロモーター活性を測定した。

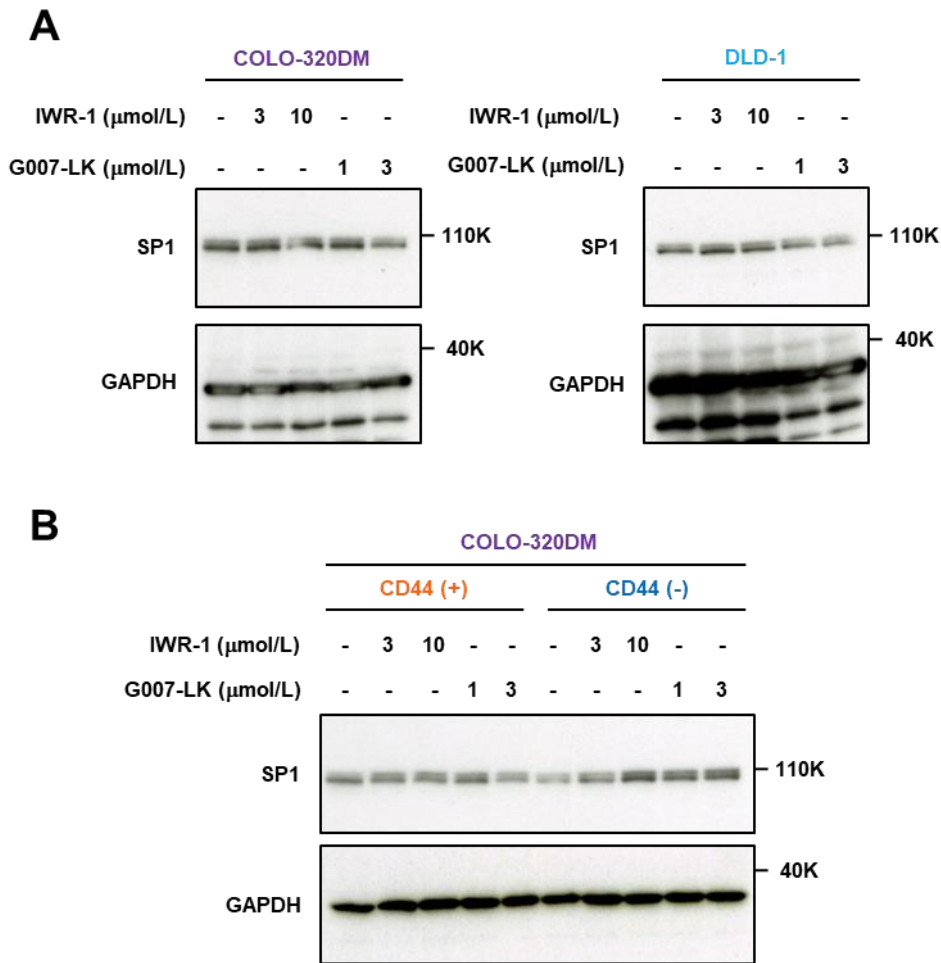


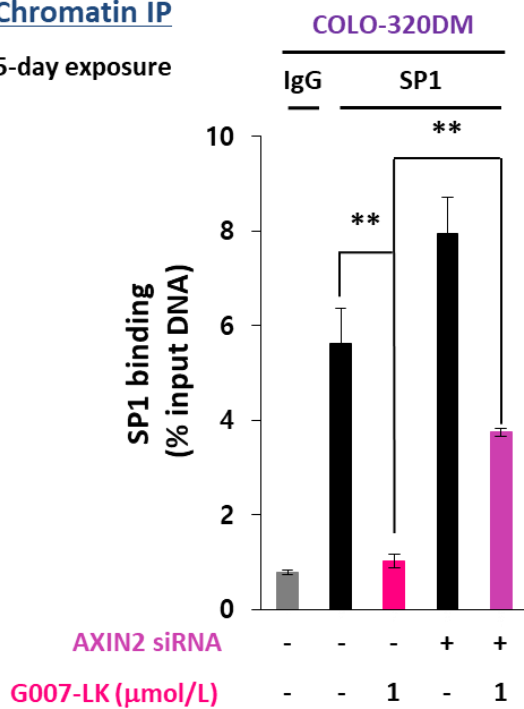
図38. タンキラーゼ阻害剤はSP1のタンパク質発現には影響を与えない

A: COLO-320DM細胞およびDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1もしくはG007-LKを図上の濃度で5日間処理し、細胞を回収した。細胞抽出液を調製し、SP1のタンパク質発現をウェスタンブロットにより評価した。

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤を図上の濃度で5日間処理し、ウェスタンブロットでSP1のタンパク質量変化を評価した。

Chromatin IP

5-day exposure



Chromatin IP

5-day exposure

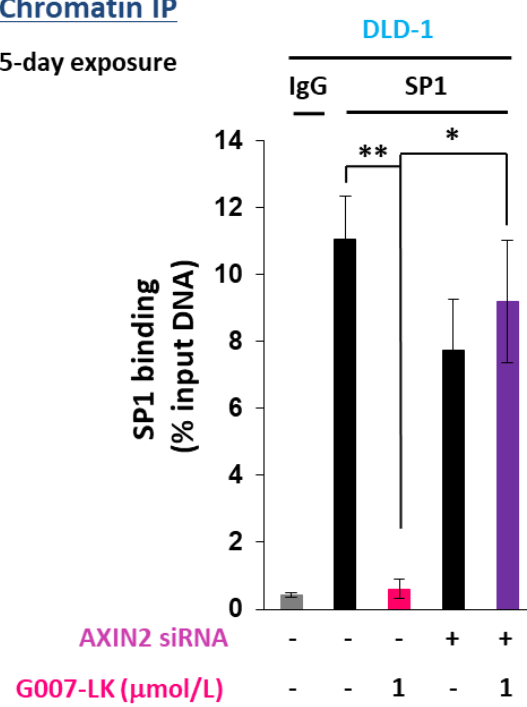


図39. AXIN2のノックダウンによる、タンキラーゼ阻害剤処理後のSP1のc-KITプロモーター結合性の回復

COLO-320DM 細胞および DLD-1細胞に AXIN2 siRNA を導入し、2日後にタンキラーゼ阻害剤 (G007-LK) を添加した。5日間の培養後、抗 SP1抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、SP1 の c-KIT プロモーター領域への結合を qPCR で測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

第4章 NucleolinはSP1のc-KITプロモーター領域への結合を制御する

4.1 タンキラーゼ阻害によるc-KIT発現抑制におけるAXIN2-SP1間に介在するシグナル因子の検討

【目的】

SP1のc-KITプロモーター領域への結合減弱がAXIN2を介することは分かったが、AXIN2がどのようなメカニズムでSP1を制御しているかについては明らかでない。そこで、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてAXIN2とSP1の間に存在する候補因子を抽出し、その機能的妥当性を検証する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1に記載した方法に準じて行った。

3. IPA解析

IPAを開いて「my pathway」タブを選択した。Tool欄で「path explorer」を選択し、interactionタブの「DirectやIndirect」にチェックを入れたうえで、Set A欄にAXIN2を、Set B欄にはSP1をそれぞれ入力して「add」を押下した。「apply」を実行し、現れた因子群の選別を行った。

4. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性とDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1 (3、10 μmol/L) およびG007-LK (1、3 μmol/L) を5日間処理してRNAを回収し、RT-qPCRを行った。RT-qPCRは1.3に記載した方法に準じて行った。用いたプライマーは以下である。

表18

因子名	フォワード	リヴァース	プローブ番号
GSK3β	5'-gaaagtattgcaggacaagagattt-3'	5'-cggactatgttacagtgatctagctt-3'	50
ESR1	5'-aaccagtgaccattgataaaa-3'	5'-ccctcctctcggctctttc-3'	69
NCL	5'-ccactgtccgcttcaca-3'	5'-tcttggggtcaccttgattt-3'	70

【結果】

AXIN2とSP1の間に存在することが論文で報告されている因子を IPAにより同定し、それらの因子の発現に対するタンキラーゼ阻害剤の影響をRT-qPCRで検討した。まず、IPAによりAXIN2とSP1の間に存在する可能性がある候補因子群を抽出した (図40)。そこで、これらの因子群が関与している可能性のある経路について検討した。

(1) AXIN2-GSK3β-ESR1-SP1-c-KIT経路 (図40A) : COLO-320DM細胞およびDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤を処理した際のGSK3βとESR1のRNAレベルの変動を解析した。その結果、いずれの細胞においてもGSK3βの遺伝子発現は確認されたが、タンキラーゼ阻害剤による顕著な変動は認められなかった (図41A)。一方、ESR1の遺伝子発現はCOLO-320DM細胞にタンキラーゼ阻害剤を処理した際に減少する傾向が観察されたが、DLD-1細胞では発現が検出感度以下であり、タンキラーゼ阻害剤の影響を評価できなかった (図41B)。

(2) AXIN2-NCL-SP1-c-KIT : タンキラーゼ阻害剤処理によるNCL (別名 : nucleolin) の変動をRNAレベルで検討した (図40B)。その結果、COLO-320DM細胞やDLD-1細胞においてタンキラーゼ阻害剤処理によってNCLが減少する傾向が認められた (図42A)。さらに、COLO-320DM

CD44陽性・陰性細胞におけるタンキラーゼ阻害剤によるNCLの発現変動は、CD44陽性細胞でより顕著に認められた（図42B）。NCLは核内でSP1と相互作用しており、この複合体が解離することで標的遺伝子p21の発現が上昇するという報告がある(68)。また、NCLはAXIN2と結合する可能性が示唆されている(69)。これらのことから、AXIN2とSP1の間の介在候補因子としてNCLについてさらなる実験を行うことにした。

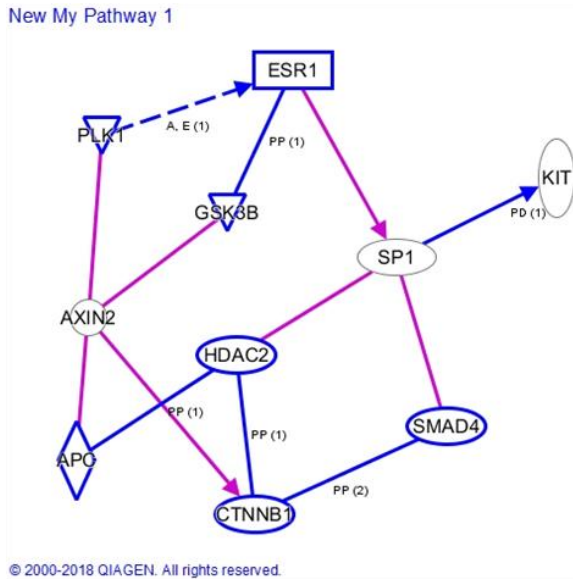
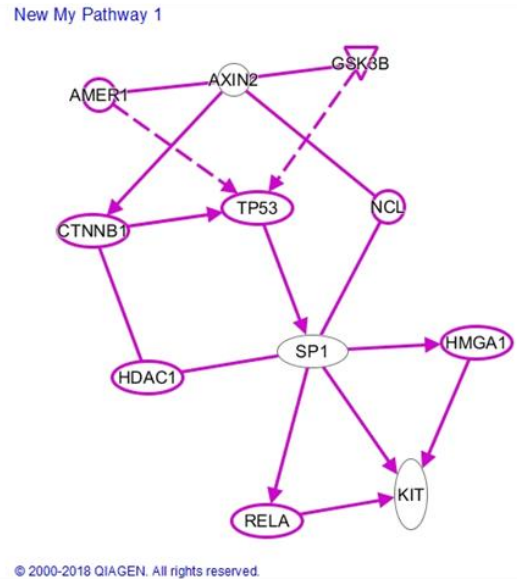
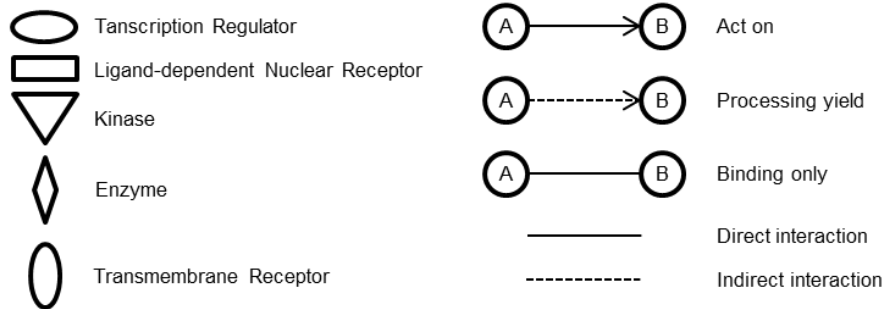
A**B****C**

図40. IPAによるAXIN2とSP1の間に介在する候補因子の抽出

A: AXIN2とSP1を入力し、path explorerの項目でAXIN2からSP1への制御を選択し、得られたデータのうち、AXIN2-GSK3β-ESR1-SP1-c-KITのパスウェイ図を示した。

B: Aと同じ方法で得られたAXIN2-NCL-SP1-c-KIT経路の模式図を示した。

C: ネットワーク表示アイコンの説明

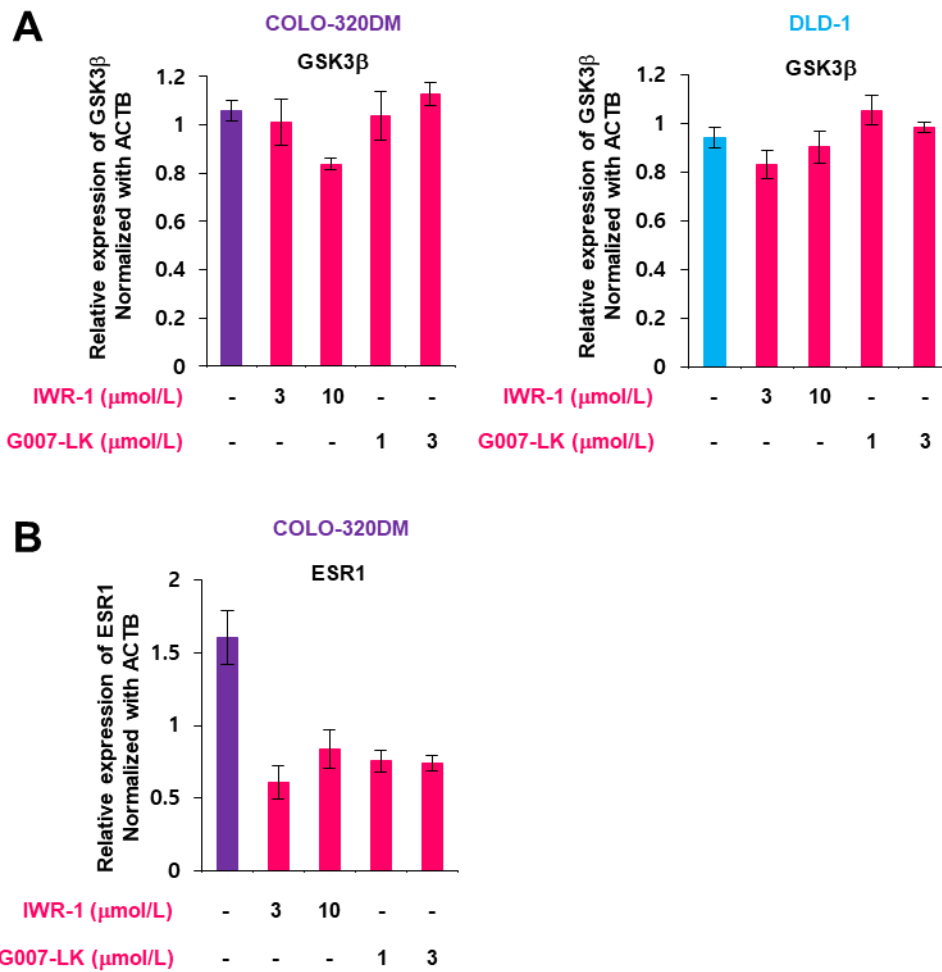


図41. GSK3 β およびESR1遺伝子発現レベルに対するタンキラーゼ阻害剤の影響

A: COLO-320DMやDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1およびG007-LKを5日間処理し、抽出したRNAを用いてRT-qPCRにてGSK3 β の発現を定量した。

B: Aと同様の手順でESR1の発現を定量した。

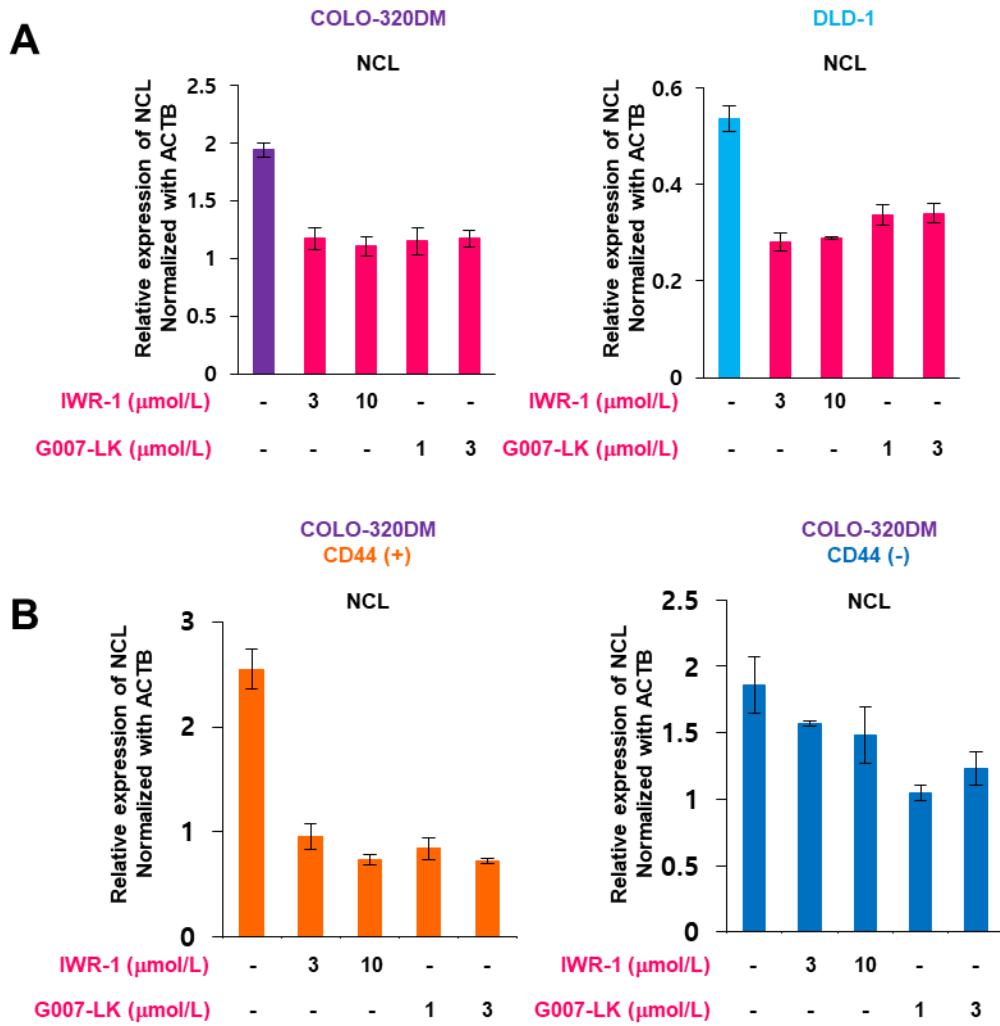


図42. NCL遺伝子発現レベルに対するタンキラーゼ阻害剤の影響

A: COLO-320DM細胞およびDLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1もしくはG007-LKを5日間処理し、抽出したRNAについてRT-qPCRを行い、NCLの発現を定量した。

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞について、Aと同様の解析を行った。

4.2 タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2を介したNCLの発現抑制とNCLによるSP1制御

【目的】

タンキラーゼ阻害剤によるNCLの発現抑制に対するAXIN2の寄与、およびNCL-SP1複合体形成に対するタンキラーゼ阻害剤の効果を検討する。

【材料と方法】

1. 細胞培養

COLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞の培養は、1.1に記載した方法に準じて行った。DLD-1細胞の培養は、1.2に記載した方法に準じて行った。

2. フローサイトメトリーによるCD44陽性・陰性細胞の分離

1.1に記載した方法に準じて行った。

3. siRNAによる遺伝子のノックダウン

1.4に記載した方法に準じて行った。用いたsiRNAリストは以下である。

Silencer Select [AXIN2 (#1: s229719, #2: s15818)、 and negative control (#1)

4. 逆転写-定量PCR (RT-qPCR)

AXIN2 siRNAを導入したCOLO-320DM、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞とDLD-1細胞を2日間37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。2日後、タンキラーゼ阻害剤G007-LKを最終濃度1 μmol/Lになるように添加し、さらに5日間37°C、5% CO₂のインキュベーターで培養した。5日後、細胞よりRNAを回収し、RT-qPCRを行った。RT-qPCRは1.3に記載した方法に準じて行った。用いたプライマーは以下である。

表19

因子名	フォワード	リヴァース	プローブ番号
NCL	5'-ccactgtccgcttcaca-3'	5'-tcttgggggtcaccttgattt-3'	70

5. ウェスタンブロットティング

COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤IWR-1（最終濃度3、10 $\mu\text{mol/L}$ ）とG007-LK（最終濃度1、3 $\mu\text{mol/L}$ ）を5日間処理し、細胞を回収した。回収した細胞を用いてウェスタンブロットティングを行った。DLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤G007-LK（最終濃度1 $\mu\text{mol/L}$ ）を5日間処理し、核と細胞質分画を分離し、ウェスタンブロットティングを行った。ウェスタンブロットティングは1.3に記載した方法に準じて行った。用いた抗体は以下である。

表20

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
c-KIT	1:1000	3074S	Cell Signaling Technology
AXIN2	1:500	2151S	Cell Signaling Technology
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	0.1 $\mu\text{g/mL}$	FL-335	Santa Cruz Biotechnology
SP1	1:1000	9389S	Cell Signaling Technology
NCL (nucleolin)	1:1000	14574S	Cell Signaling Technology
Calpain I	5 $\mu\text{g/mL}$	H-65	Santa Cruz Biotechnology
HDAC	1 $\mu\text{g/mL}$	3601-30T	BioVision

6. 核抽出キット

DLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤G007-LK（最終濃度1 $\mu\text{mol/L}$ ）を5日間処理し、回収した細胞に0.1 mM DTTと1% Protease inhibitor cocktail (PIC)入れた10 x hypotonic Lysis Buffer 100 μL で再懸濁した。その後、15分間上氷上に静置し、10% IGEPALCA-630 solutionを6 μL 添加した。ボルテ

ックスを10秒間かけたあと10,000×gで30秒間遠心した。この遠心上清を細胞質分画とした。一方、残ったペレットに0.1 M DTTと1% PICを添加したExtraction bufferを100 μL入れ、再懸濁した。その後、ボルテックスを30分かけたあと20,000×gで5分間遠心した。得られた上清を核分画とした。

7. 免疫沈降

3.1に記載した方法に準じて行った。用いた抗体は以下である。

表21

抗体名	濃度	カタログ番号	購入先
SP1 (IP)	1:1000	9389S	Cell Signaling Technology
NCL (nucleolin) (IB)	1:1000	14574S	Cell Signaling Technology

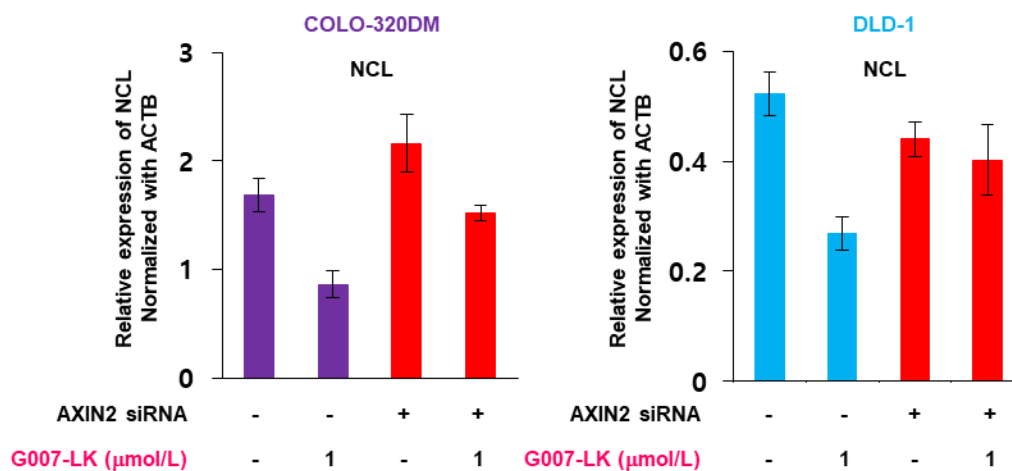
【結果】

AXIN2のノックダウンがタンキラーゼ阻害剤によるNCLの発現抑制にどのような影響を及ぼすか、RT-qPCRで検討した。その結果、タンキラーゼ阻害剤処理で減少するNCL RNAが、AXIN2のノックダウンとともにc-KITと同様に減少しなくなることがCOLO-320DM細胞およびDLD-1細胞で認められた (図43A)。さらに、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞を用いた同様の実験では、COLO-320DM CD44陽性細胞のみでタンキラーゼ阻害剤によるNCLの発現減少が認められ、この減少はAXIN2ノックダウンによって回復した (図43B)。これらの結果よりタンキラーゼ阻害剤によるc-KITの変動にはNCLも関与している可能性が考えられた。

NCLはタンキラーゼ阻害剤処理でタンパク質量が変動しなかった (図44A)。核と細胞質に分画したウェスタンブロットにより、NCLが核の中だけでなく細胞質にも存在することが確認された (図44B)。そこでさらに、SP1とNCLの結合を免疫沈降法で検討した。その結果、COLO-320DM細胞およびDLD-1細胞においてNCLとSP1が結合していること、そしてタンキラーゼ阻害剤がこれらの結合を解離させることが明らかとなった (図44C)。Sakaguchiらの論文(68)では

SP1とNCLの結合が解消することでSP1標的遺伝子の発現が上昇するが、今回の結果ではそれとは逆にSP1とNCLの結合が解消することでSP1がc-KITプロモーター領域にリクルートされなくなる可能性が示唆された。

A



B

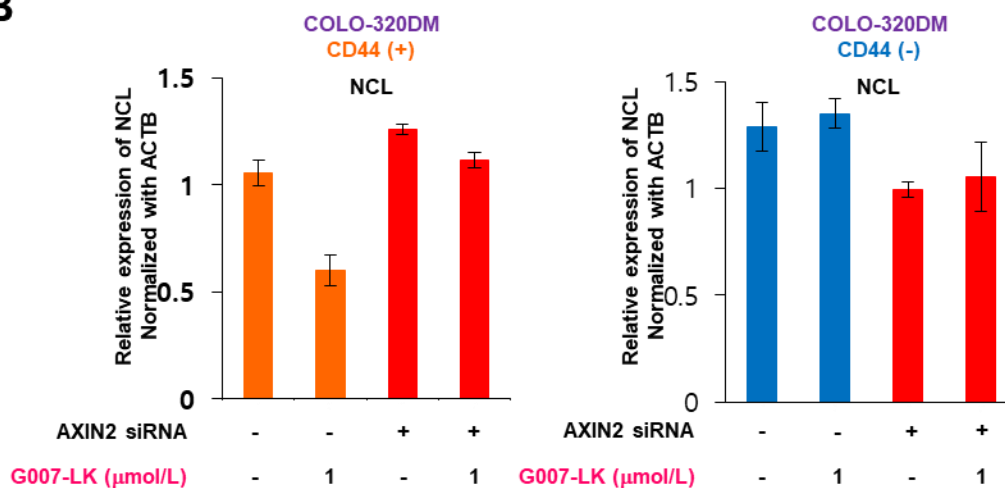


図43. AXIN2ノックダウンによるNCL mRNAの発現変動

A: COLO-320DM細胞およびDLD-1細胞にAXIN2 siRNAを導入し、2日後タンキラーゼ阻害剤G007-LKを5日間処理し、抽出したRNAについてRT-qPCRを行い、NCLの発現を定量した。

B: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞について、Aと同様の解析を行った。

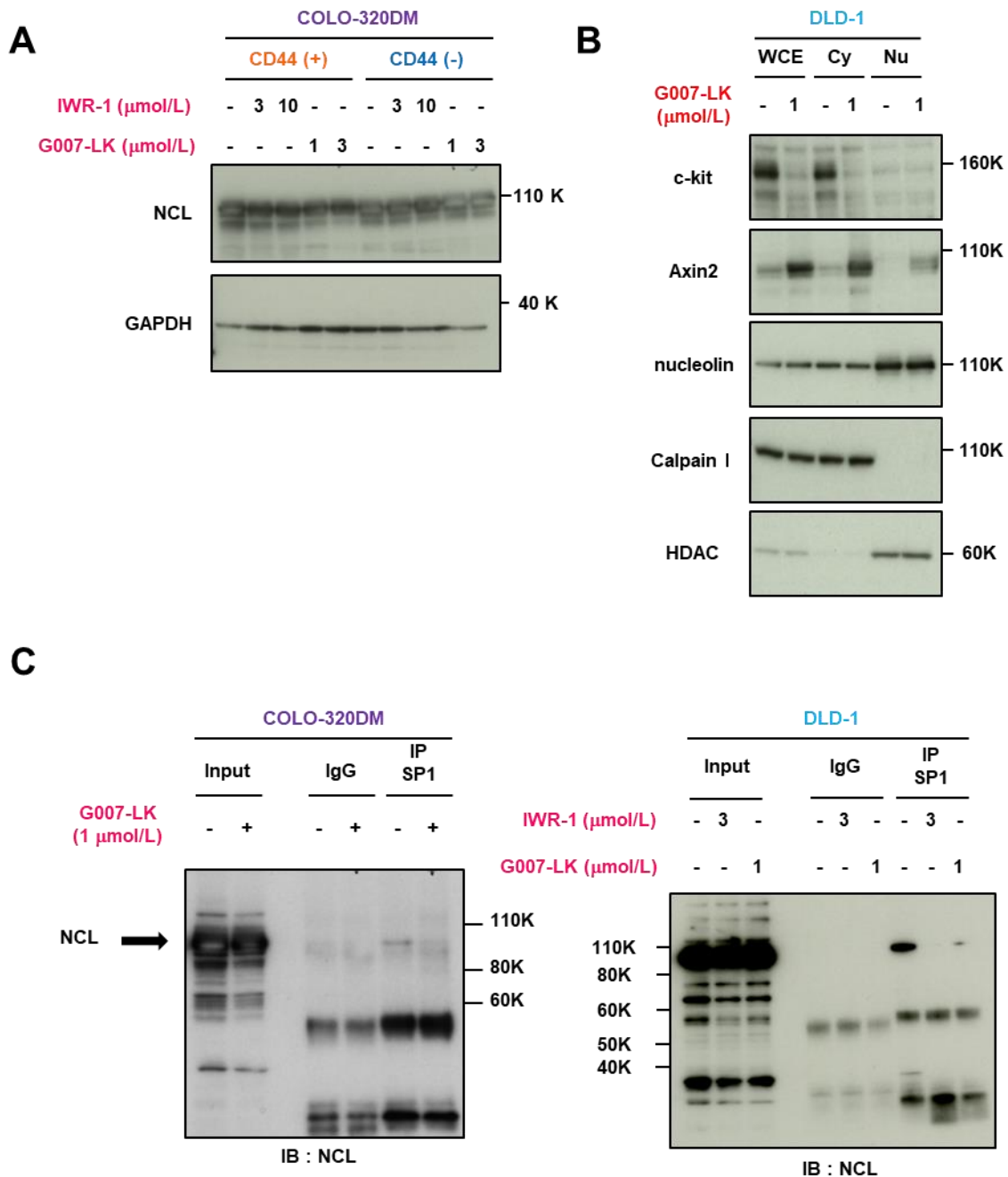


図44. タンキラーゼ阻害剤によるNCL-SP1相互作用の解消

A: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞にタンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、抽出したライセートについてウェスタンブロットで解析した。

B: DLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤G007-LKを5日間処理し、細胞質と核を分離し、ウェスタンブロット解析した。内部標準として細胞質側ではCalpainI、核側ではHDACを用いた。

C: COLO-320DM 細胞および DLD-1細胞にタンキラーゼ阻害剤を5日間処理し、抽出したライセートを用いて免疫沈降-ウェスタンブロットを行った。

考察

私は、当専攻修士課程の学位研究において、ヒト大腸がんCOLO-320DM細胞に存在するがん幹細胞様CD44陽性細胞の増殖を選択的に抑制する化合物として、タンキラーゼ阻害剤を同定した。今回の研究ではまず、タンキラーゼ阻害剤が様々な大腸がん細胞のCD44陽性率もしくはCD44発現レベルを低下させることを見出した。CD44は、大腸がんのがん化に主要な役割を果たすβ-カテニン/TCFの標的遺伝子として、その発現が制御されている(70)。しかし、CTNNB1 (β-カテニン) 遺伝子に機能獲得型変異が入ることでタンキラーゼ阻害剤に耐性を示す大腸がん細胞株のLS174Tにおいても、タンキラーゼ阻害剤処理によってCD44陽性率の減少が観察された。さらに修士課程の学位研究において、COLO-320DM細胞から分離したCD44陽性細胞とCD44陰性細胞の間で活性型β-カテニンの定常発現レベルは同等であること、また、タンキラーゼ阻害剤はこれら2つの細胞において、活性型β-カテニンのレベルを同等に低下させることを明らかにしていた。これらの結果から、大腸がん細胞におけるタンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性率の低下およびCD44陽性細胞に対する選択的な増殖抑制は、β-カテニンに依存しない経路で引き起こされるものと考えられた。

様々な大腸がん細胞株等のうち、COLO-320DM、DLD-1、LS174T細胞ではタンキラーゼ阻害剤によってCD44陽性率が減少した。さらに、顕著な差ではなかったものの、HCT15細胞でもCD44陽性率の減少傾向が認められた。一方、HT29およびHCC2998細胞ではタンキラーゼ阻害剤処理を行ってもCD44陽性率の減少が認められなかった。これらの結果から、CD44陽性率の減少には2つのメカニズムが関与していると考えられる。第一に、当研究部の先行研究によると、タンキラーゼ阻害剤は、COLO-320DM、DLD-1、HCT15の各細胞においてTCFレポーター活性すなわちβ-カテニンシグナルを抑制するが、HCC2998細胞ではβ-カテニンシグナルは抑制されない(42)。したがって、タンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性率の低下には少なくとも一部、β-カテニンシグナルの抑制が寄与するものと推定される。本研究ではさらに第二のメカニズムとして、タンキラーゼ阻害剤が幹細胞性機能因子であるチロシンキナーゼc-KITの遺伝子発現を抑制することで、がん幹細胞性を示すCOLO-320DM CD44陽性細胞の増殖をより強く抑制することを明らかにした。

注目すべきは、COLO-320DM、DLD-1、HCT15およびLS174T細胞はc-KITを発現していたのに対してHT29、HCC2998細胞ではc-KITが検出感度以下であった。このことは、大腸がんのがん幹細胞性を維持するうえでc-KIT発現が重要であることを強く支持している。また、c-KITの下流にはmTOR経路やMAPK経路が寄与していることが報告されている。しかし、本研究で用いたCOLO-320DM CD44陽性細胞とCD44陰性細胞の間ではこれらの経路の活性（キナーゼの活性型リン酸化状態）に差は認められなかった（未発表データ）。さらに、タンキラーゼ阻害剤はこれらの経路の活性にも特に影響を与えなかった。c-KITの過剰発現がどのような仕組みでがん幹細胞性に寄与しているのかについては、さらなる研究を通じて検討する必要がある。

AXIN2は、タンキラーゼによるPAR化を介して分解に導かれる。タンキラーゼ阻害剤によるAXIN2の蓄積は、タンキラーゼ阻害剤による β -カテニンシグナルの抑制に必要である。本研究では、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現低下はAXIN2に依存して生じることが分かった。一方、タンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性細胞選択的増殖抑制効果には、AXIN2の下流因子である β -カテニンは特に関与していない可能性が示唆された。では、AXIN2依存的で β -カテニン非依存的な因子としてどのようなものがタンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性細胞選択的増殖抑制効果に寄与しているのであろうか。AXINにより制御される β -カテニン非依存的な経路として、AXINがc-Jun NH₂末端キナーゼ（JNK）シグナル伝達経路におけるMEKK1/4の足場として機能することが知られている(71,72) JNK経路は、転写因子SP1を活性化することが知られている(73,74)。したがって、AXIN2がJNK経路を介してSP1を制御し、SP1を介したc-KITプロモーターを介した転写を制御している可能性も考えられる。重要なことに、タンキラーゼ阻害剤は内因性c-KIT遺伝子プロモーターの支配を受けない外因性c-KITタンパク質の発現レベルは抑制できないことを見出した。この結果は、タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現抑制が、c-KITプロモーターの抑制を介して起きていることを支持するものである。さらに、外来性c-KITを過剰発現させたDLD-1細胞では、タンキラーゼ阻害剤の増殖抑制効果が低減している傾向が観察された。これらの結果から、タンキラーゼ阻害剤によるCD44陽性がん幹細胞分画の増殖抑制は、c-KITの発現低下により引き起こされるものと考えられた。

一方、COLO-320DM細胞をもとにc-KITの過剰発現細胞を作製しようとしたが、レトロウイルス感染やエレクトロポレーションを含む複数の手法を試みたにもかかわらず、こちらについては成功しなかった。この過剰発現細胞が樹立されなかった理由として、c-KITの過剰発現がCOLO-320DM細胞の細胞死を引き起こした可能性が考えられる。実際、WangらはA549、IMR32とHMCB細胞にc-KIT過剰発現することでアポトーシスが誘導されることを報告している(75)。

本研究では、c-KITプロモーター領域の結合因子のうち、転写因子SP1の結合がタンキラーゼ阻害剤によって抑制されることを見出した。別の転写因子としてNF- κ Bがc-KITプロモーター領域に結合し、転写を制御するという報告(60,76)もあるが、COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞についてウェスタンブロッティングで解析した結果、IKK-a、IKK-b、I κ BなどのNF- κ Bシグナル因子の発現に関しては二つの細胞間で差は認められていない（未発表データ）。このことから、タンキラーゼ阻害剤処理によるc-KITの減少にNF- κ Bが関与している可能性は低いと推察した。

先行報告(53)と一致した結果として、c-KITは免疫不全マウスにおけるゼノグラフト造腫瘍性や腫瘍増殖に関与していることが分かった。すなわち、COLO-320DM CD44/c-KIT二重陽性細胞とCD44陽性/c-KIT陰性細胞をそれぞれ250個/マウスに移植した結果、前者が高い造腫瘍性を示した。このことから、c-KITはがん幹細胞を攻撃する治療標的となる可能性が示唆された。実際、c-KIT阻害剤であるイマチニブやISCK03は、大腸がん幹細胞のコロニー形成能や造腫瘍性を抑制するという報告がある(77)。重要なことに、COLO-320DM CD44陽性細胞はCD44陰性細胞よりもイマチニブに対して高い感受性を示した。CD44陽性細胞ではc-KITの発現がCD44陰性細胞より高いため、c-KITに対する依存性がより強く、c-KIT阻害剤に高い感受性を示すものと考えられる。

本研究により、タンキラーゼ阻害剤は β -カテニンシグナル伝達経路に対する直接的な阻害効果に加え、c-KIT発現に対する阻害効果を発揮することで、CD44陽性大腸がん幹細胞の増殖をより強く抑制することが明らかとなった。後者の作用の具体的メカニズムとして、タンキラーゼ阻害剤はAXIN2の蓄積を介して転写因子SP1をc-KITプロモーター領域から遊離させることを明らかにした。細胞質に存在するAXIN2が核内のSP1をどのようなメカニズムで制御するのか不明であったため、パスウェイ解析（IPA）を基軸としてさらに検討した結果、AXIN2とSP1の間の機

能介在因子としてNCLを見出した。しかし、AXIN2がNCLを制御する直接の詳細メカニズムに関しては未だに明らかでない。Luiらが実施したプロテオーム解析によると、AXIN2はNCLと複合体を形成する可能性が示唆されている(69)。しかし、私自身が免疫沈降で検証した範囲においては、AXIN2とNCLの結合は確認されなかった(未発表データ)。一方、細胞質分画と核分画を分離して行ったウェスタンブロットティングでは、AXIN2も核内に存在することが示され、さらにNCLも核と細胞質の双方に存在することが明らかになった。AXIN2はNCLを直接制御しているのか興味深い。

Sakaguchiらは、NCLがストレス誘導因子S100Cを核内に移行させ、核内でSP1ホモダイマーと相互作用することでSP1/SP3と結合していたNCLとの結合がなくなり、遊離したSP1/SP3がp21遺伝子の発現上昇を引き起こすことを報告している(68)。一方、本研究では、SP1がNCLと結合しているとc-KITの転写発現が正に制御され、タンキラーゼ阻害剤処理によりSP1からNCLが離れると、それによってc-KITプロモーターからSP1が離れることが示唆された。このような機能的差異がどのようなメカニズムで生じるのかについては、さらなる検討が必要である。

Wnt/ β -カテニン経路は大腸発がんに関与する重要な経路でありながら、この分子経路を標的とした薬剤の開発は未だ成功に至っていなかった。タンキラーゼは、Wnt/ β -カテニン経路の正の制御因子であることが報告されて以来、同経路を遮断する有望な標的候補分子として注目されている。事実、これまでに行われた非臨床レベルの検討では、G007-LKやRK-287107などのタンキラーゼ阻害剤がヒト大腸がん細胞をマウスに移植した異種移植モデルの腫瘍増殖を有意に抑制している(40)。しかし、Wnt/ β -カテニン経路は正常腸陰窩の維持にも重要な役割を果たしているため、大きな副作用を引き起こすことなく十分な腫瘍抑制効果を発揮させる有効濃度域が狭い可能性があるという懸念もある。この点に関して、私は修士課程の学位研究においてすでに、忍容用量範囲のタンキラーゼ阻害剤が細胞傷害性抗がん剤イリノテカンの腫瘍増殖抑制効果を顕著に増強することを明らかにしている。具体的には、ヌードマウスに対するCOLO-320DM細胞の皮下ゼノグラフトモデルにおいて、単剤では腫瘍増殖抑制効果も腸管毒性などの副作用も誘発しない低用量のタンキラーゼ阻害剤G007-LKが、イリノテカンとの併用で腫瘍増殖をほぼ完全に抑制することを

明らかにしている。Lauらの報告による(39)と、G007-LKは10 mg/kgと20 mg/kgで1日に1回投与、または10 mg/kgで1日2回（1日あたり計20 mg/kg）投与する限りでは、マウスの体重変動は特に認められていない。しかし、30 mg/kgで1日1回または20 mg/kgで1日2回（1日あたり計40 mg/kg）投与することで顕著な体重減少が認められている。つまり、マウスゼノグラフトモデルにおいて、タンキラーゼ阻害剤G007-LKが体重減少なしに腫瘍増殖抑制効果を示す用量は、10 mg/kg~20 mg/kgの狭い範囲に限られる。その中でも、より腫瘍抑制を示す濃度20 mg/kgが効率よく制がん効果を示すと予想される。このことと今回の私の実験結果を合わせると、タンキラーゼ阻害剤は従来の抗がん剤との併用剤として用いるのが望ましいかも知れない。本研究では、タンキラーゼ阻害剤とイリノテカンの併用効果の作用メカニズムとして、タンキラーゼ阻害剤が抗がん剤耐性のがん幹細胞を攻撃し、イリノテカンが非幹がん細胞を攻撃することで、両剤が腫瘍内のがん細胞集団全体の増殖を抑制する可能性が示唆された。

他方、タンキラーゼ阻害剤に抵抗性を示す大腸がんDLD-1細胞を移植したマウス実験では、タンキラーゼ阻害剤G007-LKとイリノテカンの併用効果は認められなかった（未発表データ）。DLD-1細胞は20-amino acid repeats (20-AARs) という β -カテニンの分解に必要な7回リピート構造を部分的に保持した“long型”の欠失APC変異体（long APC）を有する。Long APCは、 β -カテニンのAXIN2依存的分解に対して優性不活性（dominant negative）の影響を及ぼし、タンキラーゼ阻害剤による β -カテニンの分解を抑制する(42)。これらのことから、*in vivo*におけるタンキラーゼ阻害剤とイリノテカンとの併用による制がん効果の増強には、 β -カテニンシグナルの効果的抑制が必要である可能性が示唆された。最近、所属研究部は、タンキラーゼがBRCA-DNA損傷応答複合体の構成因子であるMERIT40に結合し、DNA損傷修復を促進していることを報告した(78)。このことから、タンキラーゼ阻害剤はがん幹細胞を標的とした作用に加え、DNA損傷修復を阻害することで、DNAトポイソメラーゼ I を阻害してDNA鎖切断を誘導するイリノテカンの効果を増強する効果も期待される。

本研究により、タンキラーゼ阻害剤はCOLO-320DMなどの大腸がん細胞におけるCD44陽性がん幹細胞の増殖をCD44陰性非幹がん細胞の増殖よりも強く抑制すること、そのメカニズムとし

てc-KITの転写抑制が生じることを明らかにした。なお、本研究で用いた大腸がん幹細胞が正常消化管の分化過程のどの段階に位置するかは不明である。また、本研究では主に安定な大腸がん細胞株を解析に用いたため、原発あるいは進行・再発した臨床腫瘍から採取されたがん細胞で同様な結果が得られるかなどは十分に検討されていない。がん幹細胞性を示すCD44/c-KIT二重陽性の大腸がん細胞ががんの再発に寄与する恐れがあるが、本研究で明らかにした通り、タンキラーゼ阻害剤がそのような細胞をより効率的に攻撃することで、がんの再発を防止する可能性が考えられる。これらについては更なる研究を通じて検討する必要がある。

以上のように本研究では、大腸がんの治療抵抗性および再発の根源となるがん幹細胞を標的とする新たな治療薬候補としてタンキラーゼ阻害剤を見出し、さらにその作用機序を明らかにした。本研究が、がんの治療をもたらし新薬開発の礎となることを期待したい。

引用文献

1. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A, Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* **2000**;18:2938-47
2. Andre T, Louvet C, Maindrault-Goebel F, Couteau C, Mabro M, Lotz JP, Gilles-Amar V, Krulik M, Carola E, Izrael V, de Gramont A. CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. GERCOR. *Eur J Cancer* **1999**;35:1343-7
3. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E.. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **2004**;351:337-45
4. Minde DP, Anvarian Z, Rudiger SG, Maurice MM. Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer* **2011**;10:101
5. Minde DP, Radli M, Forneris F, Maurice MM, Rudiger SG. Large extent of disorder in Adenomatous Polyposis Coli offers a strategy to guard Wnt signalling against point mutations. *PLoS One* **2013**;8:e77257
6. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **2009**;17:9-26
7. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **2011**;17:313-9
8. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa J. J, Stassi G, Huntly B, Herrmann H, Soulier J, Roesch A, Schuurhuis G. J, Wohrer S, Arock M, Zuber J, Cerny-Reiterer S, Johnsen H. E, Andreeff M, Eaves C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* **2012**;12:767-75
9. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri M. A, Dick J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **1994**;367:645-8
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**;100:3983-8
11. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **2003**;63:5821-8
12. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* **2005**;65:10946-51
13. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke M. F, Simeone D. M. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **2007**;67:1030-7

14. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon S. A, Shimada Y, Wang T. C. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* **2009**;27:1006-20
15. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **2007**;445:106-10
16. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang E. H, Simeone D. M, Shelton A. A, Parmiani G, Castelli C, Clarke M. F. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**;104:10158-63
17. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke A. R, Sansom O. J, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **2009**;457:608-11
18. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H, Saya H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* **2011**;19:387-400
19. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters P. J, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **2007**;449:1003-7
20. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman J. B, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick M. R, Kemper K, Richel D. J, Stassi G, Medema J. P. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* **2010**;12:468-76
21. Li Y, Rogoff HA, Keates S, Gao Y, Murikipudi S, Mikule K, Leggett D, Li W, Pardee A. B, Li C. J. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**;112:1839-44
22. Chung S, Suzuki H, Miyamoto T, Takamatsu N, Tatsuguchi A, Ueda K, Kijima K, Nakamura Y, Matsuo Y. Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer. *Oncotarget* **2012**;3:1629-40
23. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **1985**;43:405-13
24. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **1989**;337:331-7
25. Smith S, Gariat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **1998**;282:1484-7
26. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **1990**;345:458-60

27. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter N. P, Jackson S. P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **2003**;426:194-8
28. Diefenbach J, Burkle A. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell Mol Life Sci* **2005**;62:721-30
29. Riffell JL, Lord CJ, Ashworth A. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov* **2012**;11:923-36
30. Smith S, de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* **2000**;10:1299-302
31. Chang W, Dynek JN, Smith S. NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosyl)ation by tankyrase 1 in mitosis. *Biochem J* **2005**;391:177-84
32. Ohishi T, Yoshida H, Katori M, Migita T, Muramatsu Y, Miyake M, Ishikawa Y, Saiura A, Iemura S, I, Natsume T, Seimiya H. Tankyrase-Binding Protein TNKS1BP1 Regulates Actin Cytoskeleton Rearrangement and Cancer Cell Invasion. *Cancer Res* **2017**;77:2328-38
33. Guettler S, LaRose J, Petsalaki E, Gish G, Scotter A, Pawson T, Rottapel R, Sicheri F. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell* **2011**;147:1340-54
34. Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol* **2005**;7:1133-9
35. Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson C. J, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner M. W, Lengauer C, Finan P. M, Tallarico J. A, Bouwmeester T, Porter J. A, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **2009**;461:614-20
36. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **2000**;11:273-82
37. Zhang Y, Liu S, Mickanin C, Feng Y, Charlat O, Michaud GA, Schirle M, Shi X, Hild M, Bauer A, Myer V. E, Finan P. M, Porter J. A, Huang S. M, Cong F. RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat Cell Biol* **2011**;13:623-9
38. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams N. S, Roth M. G, Amatruda J. F, Chen C, Lum, L. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* **2009**;5:100-7
39. Lau T, Chan E, Callow M, Waaler J, Boggs J, Blake RA, Magnuson S, Sambrone A, Schutten M, Firestein R, Machon O, Korinek V, Choo E, Diaz D, Merchant M, Polakis P, Holsworth D. D, Krauss S, Costa M. A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res* **2013**;73:3132-44
40. Mizutani A, Yashiroda Y, Muramatsu Y, Yoshida H, Chikada T, Tsumura T, Okue M, Shirai F,

- Fukami T, Yoshida M, Seimiya H. RK-287107, a potent and specific tankyrase inhibitor, blocks colorectal cancer cell growth in a preclinical model. *Cancer Sci* **2018**;109:4003-14
41. Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101:2882-7
 42. 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**;16:752-62
 43. Waaler J, Machon O, Tumova L, Dinh H, Korinek V, Wilson SR, Paulsen J. E, Pedersen N. M, Eide T. J, Machonova O, Gradl D, Voronkov A, von Kries J. P, Krauss S. A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res* **2012**;72:2822-32
 44. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy S. L, Golub T. R, Lander E. S, Mesirov J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102:15545-50
 45. Park M, Kim WK, Song M, Park M, Kim H, Nam HJ, Baek S. H, Kim H. Protein kinase C-delta-mediated recycling of active KIT in colon cancer. *Clin Cancer Res* **2013**;19:4961-71
 46. Bellone G, Smirne C, Carbone A, Buffolino A, Scirelli T, Prati A, Solerio D, Pirisi M, Valente G, Nano M, Emanuelli G. KIT/stem cell factor expression in premalignant and malignant lesions of the colon mucosa in relationship to disease progression and outcomes. *Int J Oncol* **2006**;29:851-9
 47. Todd JR, Scurr LL, Becker TM, Kefford RF, Rizos H. The MAPK pathway functions as a redundant survival signal that reinforces the PI3K cascade in c-Kit mutant melanoma. *Oncogene* **2014**;33:236-45
 48. Lee Y, Jung J, Cho KJ, Lee SK, Park JW, Oh IH, Kim G. J. Increased SCF/c-kit by hypoxia promotes autophagy of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells via regulating the phosphorylation of mTOR. *J Cell Biochem* **2013**;114:79-88
 49. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* **1999**;59:4297-300
 50. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin J. D. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* **1991**;78:2962-8
 51. Lahm H, Amstad P, Yilmaz A, Borbenyi Z, Wyniger J, Fischer JR, Suardet L, Givel J. C, Odartchenko N. Interleukin 4 down-regulates expression of c-kit and autocrine stem cell factor in human colorectal carcinoma cells. *Cell Growth Differ* **1995**;6:1111-8
 52. Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M. Loss of AP-2 results in downregulation of

- c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* **1998**;17:4358-69
53. Chen EC, Karl TA, Kalisky T, Gupta SK, O'Brien CA, Longacre TA, van de Rijn M, Quake S. R, Clarke M. F, Rothenberg M. E. KIT Signaling Promotes Growth of Colon Xenograft Tumors in Mice and Is Up-Regulated in a Subset of Human Colon Cancers. *Gastroenterology* **2015**;149:705-17.e2
 54. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **2000**;96:925-32
 55. Floris G, Debiec-Rychter M, Sciot R, Stefan C, Fieuws S, Machiels K, Atadja P, Wozniak A, Faa G, Schoffski P. High efficacy of panobinostat towards human gastrointestinal stromal tumors in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* **2009**;15:4066-76
 56. Wang CM, Huang K, Zhou Y, Du CY, Ye YW, Fu H, Zhou X. Y, Shi Y. Q. Molecular mechanisms of secondary imatinib resistance in patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **2010**;136:1065-71
 57. Na YJ, Baek HS, Ahn SM, Shin HJ, Chang IS, Hwang JS. [4-t-butylphenyl]-N-(4-imidazol-1-yl phenyl)sulfonamide (ISCK03) inhibits SCF/c-kit signaling in 501mel human melanoma cells and abolishes melanin production in mice and brownish guinea pigs. *Biochem Pharmacol* **2007**;74:780-6
 58. Yamamoto K, Tojo A, Aoki N, Shibuya M. Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* **1993**;84:1136-44
 59. Li X, Han H, Zhou MT, Yang B, Ta AP, Li N, Chen J, Wang W. Proteomic Analysis of the Human Tankyrase Protein Interaction Network Reveals Its Role in Pexophagy. *Cell Rep* **2017**;20:737-49
 60. Liu S, Wu LC, Pang J, Santhanam R, Schwind S, Wu YZ, Hickey C. J, Yu J, Becker H, Maharry K, Radmacher M. D, Li C, Whitman S. P, Mishra A, Stauffer N, Eiring A. M, Briesewitz R, Baiocchi R. A, Chan K. K, Paschka P, Caligiuri M. A, Byrd J. C, Croce C. M, Bloomfield C. D, Perrotti D, Garzon R, Marcucci G. Sp1/NFkappaB/HDAC/miR-29b regulatory network in KIT-driven myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2010**;17:333-47
 61. Kingsley C, Winoto A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* **1992**;12:4251-61
 62. Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* **1992**;20:5519-25
 63. Takahashi M, Nakamura Y, Obama K, Furukawa Y. Identification of SP5 as a downstream gene of the beta-catenin/Tcf pathway and its enhanced expression in human colon cancer. *Int J Oncol* **2005**;27:1483-7
 64. Maeda K, Nishiyama C, Ogawa H, Okumura K. GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J Immunol* **2010**;185:4252-60

65. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor M. J, Ashworth A, Carmichael J, Kaye S. B, Schellens J. H, de Bono J. S. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* **2009**;361:123-34
66. Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Penning TD, Bauch JL, Bouska JJ, Bontcheva-Diaz V. D, Cox B. F, DeWeese T. L, Dillehay L. E, Ferguson D. C, Ghoreishi-Haack N. S, Grimm D. R, Guan R, Han E. K, Holley-Shanks R. R, Hristov B, Idler K. B, Jarvis K, Johnson E. F, Kleinberg L. R, Klinghofer V, Lasko L. M, Liu X, Marsh K. C, McGonigal T. P, Meulbroek J. A, Olson A. M, Palma J. P, Rodriguez L. E, Shi Y, Stavropoulos J. A, Tsurutani A. C, Zhu G. D, Rosenberg S. H, Giranda V. L, Frost D. J. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* **2007**;13:2728-37
67. Park GH, Plummer HK, 3rd, Krystal GW. Selective Sp1 binding is critical for maximal activity of the human c-kit promoter. *Blood* **1998**;92:4138-49
68. Sakaguchi M, Miyazaki M, Takaishi M, Sakaguchi Y, Makino E, Kataoka N, Yamada H, Namba M, Huh N. H. S100C/A11 is a key mediator of Ca(2+)-induced growth inhibition of human epidermal keratinocytes. *J Cell Biol* **2003**;163:825-35
69. Lui TT, Lacroix C, Ahmed SM, Goldenberg SJ, Leach CA, Daulat AM, Angers S. The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **2011**;31:2053-65
70. Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals S. T. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* **1999**;154:515-23
71. Zhang Y, Neo SY, Wang X, Han J, Lin SC. Axin forms a complex with MEKK1 and activates c-Jun NH(2)-terminal kinase/stress-activated protein kinase through domains distinct from Wnt signaling. *J Biol Chem* **1999**;274:35247-54
72. Luo W, Ng WW, Jin LH, Ye Z, Han J, Lin SC. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. *J Biol Chem* **2003**;278:37451-8
73. Benasciutti E, Pages G, Kenzior O, Folk W, Blasi F, Crippa MP. MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. *Blood* **2004**;104:256-62
74. Higuchi H, Grambihler A, Canbay A, Bronk SF, Gores GJ. Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1. *J Biol Chem* **2004**;279:51-60
75. Wang H, Boussouar A, Mazelin L, Tauszig-Delamasure S, Sun Y, Goldschneider D, Paradisi A, Mehlen P. The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Mol Cell* **2018**;72:413-25.e5
76. Gavert N, Shvab A, Sheffer M, Ben-Shmuel A, Haase G, Bakos E, Domany E, Ben-Ze'ev A.

- c-Kit is suppressed in human colon cancer tissue and contributes to L1-mediated metastasis. *Cancer Res* **2013**;73:5754-63
77. Fatrai S, van Schelven SJ, Ubink I, Govaert KM, Raats D, Koster J, Verheem A, Borel Rinkes I. H, Kranenburg O. Maintenance of Clonogenic KIT(+) Human Colon Tumor Cells Requires Secretion of Stem Cell Factor by Differentiated Tumor Cells. *Gastroenterology* **2015**;149:692-704
78. Okamoto K, Ohishi T, Kuroiwa M, Iemura SI, Natsume T, Seimiya H. MERIT40-dependent recruitment of tankyrase to damaged DNA and its implication for cell sensitivity to DNA-damaging anticancer drugs. *Oncotarget* **2018**;9:35844-55

謝辞

本博士論文は、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻がん分子標的治療学分野において、公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部で行った研究をまとめました。

本研究をまとめにあたり、研究室内外の多くの方々に助けを受けましてこのような博士論文というものをまとめることも皆様の助けをもとでできたと思います。改めて深く感謝申し上げます。修士課程より5年間、所属しております公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部におきまして、清宮啓之部長には研究面ならびに生活面での温かいご指導を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。修士課程と博士課程の5年間、このような貴重な機会をいただき、本当にありがとうございました。

公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部にて馬島哲夫主任研究員には、研究の進め方や実験に関するご助言をいただきまして心より感謝申し上げます。同研究部の岡本啓治客員研究員には、研究に対する疑問点などの相談をしていただき、実験をより効率よく進めることになりました。心より感謝申し上げます。同研究部の岡部幸子特任研究助手には、研究生活面に対する貴重なご助言を頂きました。またその他の実験手技につきましても多くをご指導いただき、お知恵もいただきました。心より御礼申し上げます。同研究部の川田直美特任研究助手には、実験の技術ならびにご助言と日々の研究の合間に励ましをいただきました。心より感謝申し上げます。また、患者腫瘍由来の組織をご提供してくださいました、公益財団法人がん研究会がん化学療法センター基礎研究部片山量平部長、がん研有明病院消化器外科長山聡先生に深く感謝申し上げます。

公益財団法人がん研究会がん化学療法センターにおいて、研究面や生活面においてご助言、ご指導をいただきました多くの先生方に、心より感謝申し上げます。本当にありがとうございました。化学療法センター分子生物治療研究部にて一緒に時間を過ごしました学生の方々におきまして、深く感謝申し上げます。また、研究室卒業性の先輩方、後輩方々に心より御礼申し上げます。

最後になりますが、韓国より日本への留学を応援してくれた両親と研究生活を隣で応援してくれたタティウハにも心より感謝申し上げます。皆様本当にありがとうございました。