

## 論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 張明奎

### 【序論】

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する傾向である。大腸がんは、他の各種臓器がんの中でも罹患数や死亡数が上位に位置している。大腸がんの治療方法としては手術が主流であるが、治癒切除不能な進行がんおよび再発がんに対しては薬物療法は必要である。大腸がんにおける薬物療法は 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併用) や FOLFIRI (レボホリナート・フルオロウラシル・イリノテカンの併用) 療法に加え、ベバシズマブ、レゴラフェニブなどの分子標的薬が使用されている。しかしながら、これらの薬物療法ではその効果が十分とは言えず、より効果的な治療薬が求められている。一方、多くのがんでは高い造腫瘍性や治療抵抗性を備えたがん幹細胞が存在し、薬物抵抗性や再発に関与していることが知られている。私は当専攻修士課程の学位研究 (Jang

Myung Kyu, Screening of the compounds that preferentially target colorectal cancer stem cells, 2017) において、多くのがんで代表的がん幹細胞マーカーとして使われている CD44陽性細胞をヒト大腸がん COLO-320DM 細胞より分離し、CD44陽性細胞により強い増殖抑制効果を示す化合物としてタンキラーゼ阻害剤 (IWR-1や G007-LK) を同定した (図1)。さらに、タンキラーゼ阻害剤と従来型の細胞傷害性抗がん剤であるイリノテカンとの併用がマウスゼノグラフトモデルにおいて顕著な制がん効果を示すことを明らかにしてきた (図2)。

タンキラーゼはポリ(ADP-リボシル)化酵素 (PARP) ファミリーの1つであり、核内でテロメラーゼによるテロメア伸長を促進する因子として発見されたものである。近年、タンキラーゼは Wnt/ $\beta$ -catenin 経路という複数のがん種の増殖に関与する因子を正に制御することが明らかになってきた。タンキラーゼは Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の  $\beta$ -catenin を負に制御する AXIN をポリ(ADP-リボシル)化 (PAR 化) することで同タンパク質をユビキチン分解に導くことから  $\beta$ -catenin が安定化される。修士課程に同定したタンキラーゼ阻害剤は、AXIN の PAR 化を抑制し、同タンパク質を蓄積させることで  $\beta$ -catenin の分解を促進する。すなわち、タンキラーゼ阻害剤は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路のシグナル伝達を阻害することで、同シグナルに依存する大腸がん細胞の増殖を抑制する。しかしながら、修士課程における私の検討結果によれば、タンキラーゼ阻害剤による  $\beta$ -catenin の分解は CD44陽性・陰性細胞で同等であり、CD44陽性大腸がん幹細胞に対するタンキラーゼ阻害剤の選択的増殖抑制効果は、 $\beta$ -catenin の分解のみでは説明できない未知の分子経路が関与することが示唆されていた。そこで本研究は、CD44陽性大腸がん幹細胞に対するタンキラーゼ阻害剤の選択的増殖抑制作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

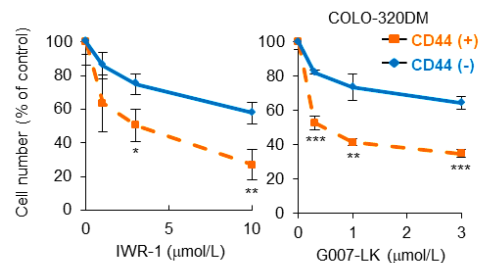


図1: タンキラーゼ阻害剤のがん幹細胞選択的増殖抑制効果  
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

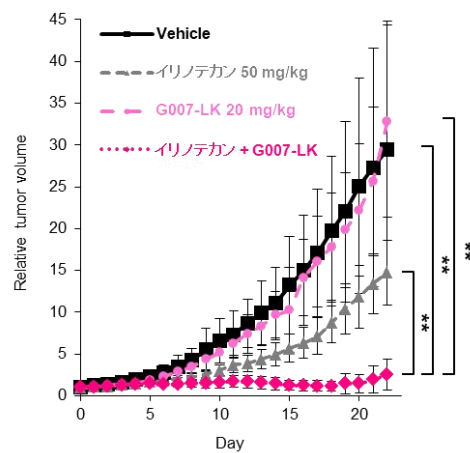


図2: COLO-320DMゼノグラフトモデルにおけるタンキラーゼ阻害剤とイリノテカンの併用効果  
\*\*:  $p < 0.01$

## 【方法と結果】

### 1. 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

タンキラーゼ阻害剤による CD44陽性大腸がん幹細胞選択的な増殖抑制の分子メカニズムを明らかにするため、大腸がん COLO-320DM 細胞においてがん幹細胞性を示す CD44陽性細胞とがん幹細胞性を示さない CD44陰性細胞をフローサイトメトリーによりソーティングし、GeneChip マイクロアレイ解析を行った。得られた網羅的遺伝子発現データを用い、gene set enrichment analysis を行った結果、CD44陽性細胞で胚性幹細胞が発現している遺伝子群の発現亢進が認められた。これらの遺伝子群のうち、タンキラーゼ阻害剤処理によって発現変動をきたすがん関連遺伝子を選別した。その結果、c-KIT チロシンキナーゼを同定した。c-KIT は大腸がんの造腫瘍性や増殖に関与することが知られている。c-KIT は CD44陽性 COLO-320DM 細胞において CD44陰性細胞よりも高発現していることがタンパク質レベルでも確認された (図3)。また、c-KIT 阻害剤であるイマチニブは、CD44陽性細胞に対してより強い増殖抑制能を示した (図4)。タンキラーゼ阻害剤は、c-KIT の RNA およびタンパク質のレベルを濃度依存的に低下させた (図5)。この現象は、COLO-320DM の他に DLD-1などの複数のヒト大腸がん細胞株で観察された。

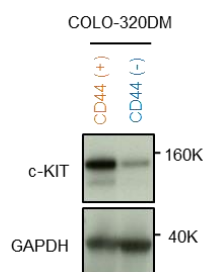


図3: COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞におけるc-KITタンパク質の発現

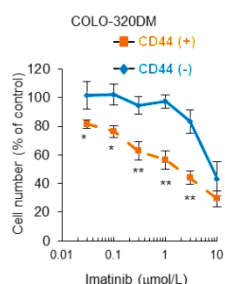


図4: イマチニブによるCD44陽性COLO-320DM細胞の増殖抑制\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01

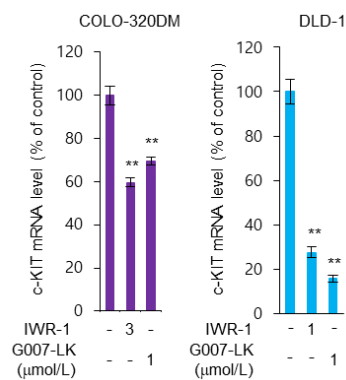


図5: タンキラーゼ阻害剤によるc-KITの発現変動 \*\*: p < 0.01

### 2. c-KIT は COLO-320DM 由来大腸がん幹細胞のステムネスを支持する

CD44陽性 COLO-320DM 細胞に対する c-KIT の役割を明らかにするため、COLO-320DM CD44陽性細胞分画に対して CRISPR-Cas9法によるゲノム編集を実施し、CD44陽性 c-KIT ノックアウト COLO-320DM 細胞を樹立した。同ノックアウト細胞では、c-KIT を発現する mock 細胞と比較して CD44陽性細胞の比率が1/3くらいになっていることが確認された (図6)。この結果から、c-KIT はがん幹細胞性を示す CD44陽性細胞の維持に寄与している可能性が示唆

された。一方、CD44陽性 COLO-320DM 細胞集団内には、c-KIT を発現する CD44/c-KIT 二重陽性細胞分画と、c-KIT を発現していない CD44陽性/c-KIT 陰性細胞分画が存在する。これら二つの分画をセルソーターでソーティングし、それぞれを NOD-SCID マウスの皮下に1,000細胞/マウス、500細胞/マウス、250細胞/マウスで移植し、c-KIT 陽性・陰性間における腫瘍形成および腫瘍増殖の差異を検討した。

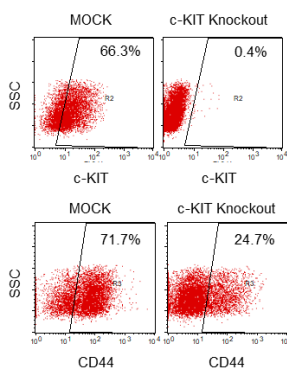


図6: COLO-320DM CD44陽性細胞のc-KITノックアウトによるCD44陽性率の変化

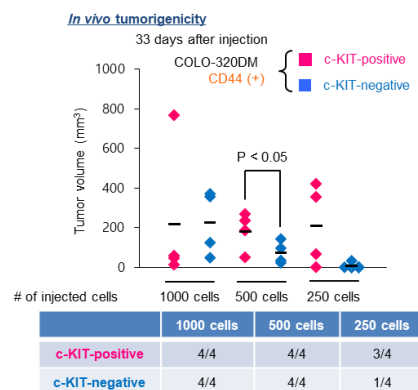


図7: COLO-320DM CD44陽性細胞よりソーティングしたc-KIT陽性・陰性細胞の腫瘍形成能と腫瘍増殖能

その結果、1,000細胞を移植したマウス群では、c-KIT 陽性・陰性間で特に差異が認められなかった。一方、500細胞を移植したマウス群では、造腫瘍性には差異が認められなかったが、生着した腫瘍の増殖は c-KIT 陽性細胞の方が統計的に有意に高かった。さらに、250細胞を移植したマウス群では、c-KIT 陽性細胞でのみ造腫瘍性が観察され、c-KIT 陰性細胞では腫瘍が形成されなかった (図7)。以上より、CD44陽性 COLO-320DM 細胞集団の中でも、CD44/c-KIT 二重陽性細胞分画ががん幹細胞としての性質を保持し、c-KIT がその形質を機能的に支持している可能性が示唆された。

### 3. 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

序論よりタンキラーゼ阻害剤は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の AXIN2 の蓄積を介して細胞増殖抑制が生じる。そこで、小分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) を用いて COLO-320DM CD44陽性・陰性細胞内の AXIN2をノックダウンすることで、タンキラーゼ阻害剤のがん幹細胞選択的な増殖抑制作用に対する AXIN2の寄与を検討した。その結果、CD44陽性・陰性細胞のいずれにおいても、AXIN2のノックダウンによりタンキラーゼ阻害剤感受性が低下した。重要なことに、同阻害剤感受性の低下は、CD44陰性細胞よりも陽性細胞でより顕著であった。このことから、タンキラーゼ阻害剤が CD44陽性細胞に対してより強い増殖抑制効果を発揮するには AXIN2の蓄積が必要であると考えられた。さらに、AXIN2をノックダウンした COLO-320DM および DLD-1細胞では、タンキラーゼ阻害剤処理後の c-KIT の発現低下が緩和されることがタンパク質 (図8) および RNA の両レベルで見出された。以上より、タンキラーゼ阻害剤による c-KIT の減少は AXIN2依存的であり、また、c-KIT 遺伝子の転写レベルでの制御によって引き起こされている可能性が考えられた。

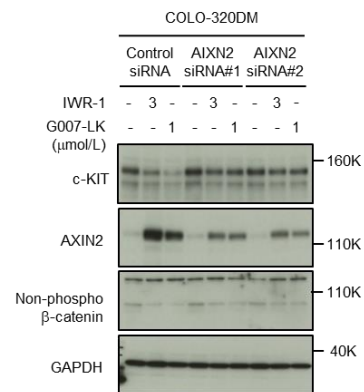


図8: タンキラーゼ阻害剤によるc-KIT減少に対するAXIN2ノックダウンの抑制的効果

### 4. 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

タンキラーゼ阻害剤による c-KIT 発現の低下は同遺伝子の転写のレベルで生じていることより c-KIT 遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、COLO-320DM 細胞にタンキラーゼ阻害剤を処理することで、c-KIT 遺伝子プロモーター由来のレポーター活性が減少することが明らかとなった。このとき、AXIN2の発現をノックダウンするとタンキラーゼ阻害剤による同活性の低下が消失ないし減弱する傾向が認められた (図9)。これらの結果より、タンキラーゼ阻害剤処理による c-KIT の発現低下は、c-KIT 遺伝子プロモーター活性の AXIN2依存的な抑制に起因するものと考えられた。そこでさらに、c-KIT 遺伝子プロモーター領域に結合する主要な転写因子である SP1に着目し、タンキラーゼ阻害剤処理前後における SP1の同領域結合の変化をクロマチン免疫沈降法で検討した。その結果、COLO-320DM および DLD-1細胞において SP1が c-KIT 遺伝子プロモーター領域に結合していること、また、この結合はタンキラーゼ阻害剤により顕著に低下するこ

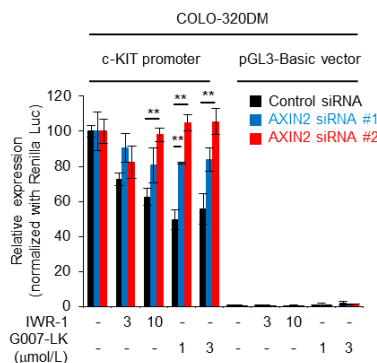


図9: タンキラーゼ阻害剤によるc-KIT遺伝子プロモーター活性の抑制に対するAXIN2ノックダウンの効果. \*\*: p < 0.01

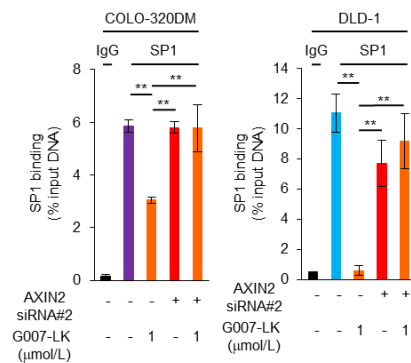


図10: タンキラーゼ阻害剤のSP1/c-KIT遺伝子プロモーター結合阻害効果に対するAXIN2ノックダウンの効果. \*\*: p < 0.01

とが明らかとなった。さらに AXIN2 のノックダウンは、タンキラーゼ阻害剤の SP1/c-KIT プロモーター結合抑制効果を消失ないし減弱させた (図11)。以上より、タンキラーゼ阻害剤による CD44陽性大腸がん幹細胞選択的な増殖抑制には、SP1の c-KIT 遺伝子プロモーター領域への結合の AXIN2依存的低下による、c-KIT の発現低下が寄与すると考えられた。

【考察】

私は、タンキラーゼ阻害剤が CD44陽性大腸がん幹細胞に対して CD44陰性細胞よりも強い増殖抑制作用を示す分子機序として、c-KIT 遺伝子発現の抑制を明らかにした。タンキラーゼ阻害剤による c-KIT の発現抑制は、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の抑制因子でありタンキラーゼの PAR 化の標的である AXIN2 の蓄積に依存して生じること、さらに、転写因子 SP1の c-KIT プロモーター領域への結合が阻害されることによって生じることを発見した (図11)。これらのことから、タンキラーゼ阻害剤は $\beta$ -catenin の分解を介して大腸がん細胞の増殖を抑制するばかりでなく、がん幹細胞性の維持因子としての c-KIT を標的とすることでがん幹細胞の生存増殖を抑制する作用を併せ持つ可能性が示された。c-KIT は消化管間質腫瘍の発生・造腫瘍性にも関与することが知られており、c-KIT の発現抑制効果を示すタンキラーゼ阻害剤はそのような c-KIT 依存性がんの治療薬として利用できる可能性も考えられる。さらに、タンキラーゼ阻害剤は従来型の細胞傷害性抗がん剤と併用することで、がんの根治療法となる可能性も期待される。修士課程の学位論文におけるタンキラーゼ阻害剤とイリノテカンの併用ゼノグラフト試験の顕著な治療成績は、この可能性を支持するものである。

今回実験に用いた COLO-320DM 細胞が発現する CD44は、シスチントランスポーターxCT と共役して酸化ストレス耐性を誘導することでがん幹細胞性に寄与するバリエーション型 CD44 (CD44v) とは異なり、標準型のアイソフォーム (CD44s) である。このようなタイプの大腸がん細胞において、xCT 非依存的にがん幹細胞性を担保する因子として c-KIT が機能しているのかも知れない。一方、AXIN2 の蓄積から SP1の c-KIT プロモーター結合低下に至る分子メカニズムは未だ不明である。さらなる分子機序の解明により、がん幹細胞を標的とした新たな治療法の構築が期待される。

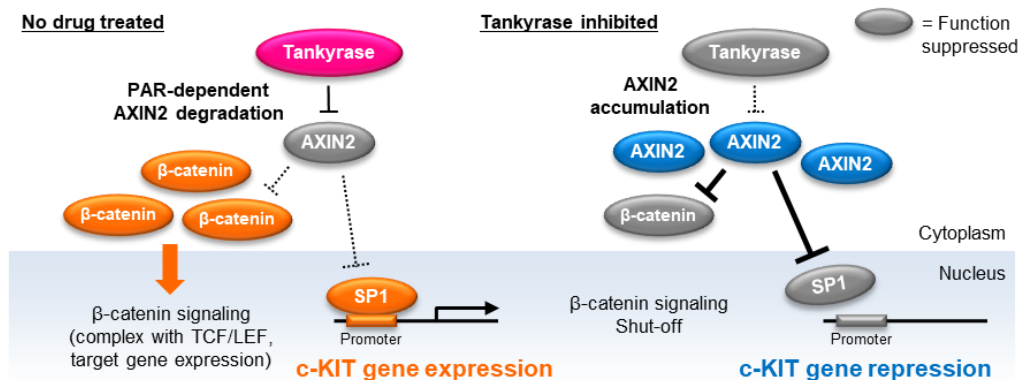


図11: Schematic models for the effect of tankyrase inhibitors

タンキラーゼ阻害剤を処理することでWnt/ $\beta$ -catenin経路のAXIN2が蓄積する。AXIN2の蓄積は、 $\beta$ -cateninの分解を引き起こすと共にc-KIT遺伝子に対する転写因子SP1の結合を減弱させることでc-KITの発現を抑制する。