

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 22 年 4 月 28 日提出

対象研究テーマ：胃がんマウスモデルを用いたがん幹細胞の探索・維持機構、新規薬物の薬効評価に関する研究

研究期間：2009 年 8 月 17 日～2010 年 3 月 31 日

研究題目：胃がん細胞の Wnt シグナル伝達における Smoothened の役割

研究代表者：京都大学医学研究科 准教授 青木正博

研究成果の概要：

複数のヒト胃癌細胞株において Smoothened をノックダウンしたところ、活性型 β -catenin の減少を伴って Wnt シグナルが強く抑制された。胃癌細胞において Smoothened が Hedgehog 経路のみならず Wnt 経路の制御にも関与していることが示唆された。

研究分野：

キーワード：胃癌、Hedgehog 経路、Wnt 経路、Smoothened、

1. 研究開始当初の背景

Hedgehog(Hh)経路は、消化管を含む多くの臓器において、細胞の増殖や分化に関与する重要なシグナル伝達経路である。この経路は、Hh リガンドが受容体 Patched(Ptch) に結合することにより、7 回膜貫通型受容体 Smoothened (SMO)への抑制が解除され、転写因子 Gli の核内移行が促進し、その標的遺伝子の転写が誘導されるシグナル伝達経路として理解されている。近年、様々な癌種において Hh 経路の活性化の関与が示唆されている一方で、Hh 経路が働いているのは主に間質細胞であるという報告がされるなど、癌化における Hh 経路諸分子の役割には未知の部分が多い。我々は最近、Wnt 経路の亢進により腸管腺腫を自然発症する *Apc* 変異マウスの腫瘍、及び一部のヒト大腸癌細胞株において、Hh 経路の活性化は認められないものの Hh の重要なシグナル伝達分子である SMO が高発現しており、その発現が腸管腫瘍の増殖・拡大に寄与していることを見出した。また、その分子機序として、SMO が活性型 β -catenin の核移行を制御することにより、Hh 経路ではなく β -catenin 依存的な Wnt 経路を正に制御することを示した。これらの結果は、Hh 経路の活性化の有無に関わらず、SMO の発現抑制が、大腸腺腫症又は大腸癌に対する新たな治療戦略となる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究計画では、胃癌における SMO の役割について、胃癌マウスモデル Wnt1/C2mE トランスジェニックマウス、及びヒト胃癌細胞株を用いて明らかにすることを目的と

した。胃癌においては大腸癌とは異なる機序で Wnt 経路の活性化が見られるため、SMO による活性型 β -catenin の核移行制御機構について大きな洞察を得られると考えられる。また、SMO の胃癌治療の分子標的としての評価にも繋がることを期待される。

3. 研究の方法

ヒト胃癌細胞株における SMO をはじめとする Hh 経路シグナル分子の発現を定量的 RT-PCR によって解析した。SMO を発現している胃癌細胞株において、siRNA を用いて SMO の発現をノックダウンし、Wnt 経路に対する影響をレポーター遺伝子アッセイ、及び Wnt 標的遺伝子の発現解析、活性型 β -catenin の発現によって評価した。

4. 研究成果

ヒト胃癌細胞株 MKN74、AGS、KATOIII のいずれにおいても SMO の発現が確認され、これらの細胞で SMO を siRNA によってノックダウンしたところ、細胞増殖が抑制された。その際、活性型 β -catenin の発現レベルが顕著に減少し、Hh 経路の標的遺伝子 Patched の mRNA レベルに加えて、Wnt シグナルの標的遺伝子 Cyclin D1 の mRNA レベルも減少していた。更に、TOPFLASH レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより、MKN74 細胞、AGS 細胞における SMO のノックダウンは、Wnt シグナルを強く抑制することが分かった。これらの結果は、大腸癌細胞のみならず胃癌細胞においても、SMO は Wnt シグナル経路を正に制御していることを示している。大腸癌細胞と異なり胃癌細胞では Hh 経路も活性化されてい

ることが知られており、SMO が同じ細胞で Hh 経路と Wnt 経路の両者に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

Arimura, S., Matsunaga, A., Kitamura, T., Aoki, K., Aoki, M., Taketo, M.M.

Reduced Level of Smoothened Suppresses Intestinal Tumorigenesis by Down-Regulation of Wnt Signaling. *Gastroenterology*, 137,629-638 (2009)

Kakizaki, F., Aoki, K., Miyoshi, H., Carrasco, N., Aoki, M., Taketo, M.M.

CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of Solute Carrier Family 5, Member 8 in the Colonic Epithelium *Gastroenterology*, 138, 627-635 (2010)

〔学会発表〕 (計 1 件)

青木正博、有村純暢、藤下晃章、武藤 誠
「消化管腫瘍形成における Smoothened 及び mTORC1 の役割」

第 68 回日本癌学会学術総会シンポジウム
2009 年 10 月 2 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都大学大学院医学研究科
生体制御医学講座遺伝薬理学教室
青木正博 准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学 大島正伸 教授