

研究報告書
令和3年度：A課題

令和5年 4月 18日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 近畿大学農学部

住 所 奈良県奈良市中町 3327-204

研究者氏名 佐久間 圭一朗

(研究課題)

新規同定大腸がん浸潤制御因子 CTNND1 アイソフォーム 3A の治療標的としての有効性の
検証

令和4年3月10日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたので
ご報告いたします。

【1】研究の背景および目的

被助成者は、独自の生体内スクリーニング法を用いて、大腸癌の新規転移抑制因子としてHNRNPLL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like)を同定した¹⁾。HNRNPLLは、mRNA前駆体(pre-mRNA)の選択的スプライシング制御因子として知られるタンパクである。申請者はこれまでに、①大腸癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)に伴ってHNRNPLLの発現が減少することでCD44のアイソフォームv6 (CD44v6)が増加して浸潤が促進すること、②CD44v6の中和抗体によって大腸癌細胞のマトリゲル浸潤を抑制できること、③HNRNPLLは間葉上皮転換(mesenchymal-epithelial transition: MET)に伴う癌細胞の増殖再開をDNA複製段階で促進すること²⁾、④EMTに伴うHNRNPLLの発現減少は転写因子MYBによって制御されること³⁾を報告した。

CD44v6は過去に別の切り口から治療標的分子として同定され、創薬がおこなわれた経緯がある。その薬剤は皮膚への副作用により実用化に至らなかったものの、一定の抗腫瘍効果を発揮した点において申請者の実験系の正当性を担保するものである。そこで、被助成者はHNRNPLLの選択的スプライシング標的遺伝子の網羅的同定をおこない、新たな薬剤標的候補分子として*CTNND1*遺伝子によってコードされるp120-cateninタンパクのアイソフォーム3A (以下p120ctn-3A)を同定した。本研究課題は、p120ctn-3Aの治療標的分子としての有効性を検証する目的で実施した。

【2】研究結果および考察

p120ctnには理論上は32種類のアイソフォームが存在するが、10種類のヒト大腸癌細胞株を用いた予備検討により、主たる発現アイソフォームはp120ctn-3ABとp120ctn-3Aであり、それぞれのアイソフォームが細胞株によって異なる比率を占有することが判った。p120ctn-3ABとp120ctn-3Aは*CTNND1*の通称エクソンBが保持されるかスキップされるかで区別される。本研究では、p120ctn-3Aの特異的な機能を解明するため、DLD-1細胞を用いてCrispr-Cas9により*CTNND1*のノックアウト(KO)株を作成した。同株にp120ctn-3ABあるいはp120ctn-3Aをコードし、Crispr-Cas9による認識を理論上回避できるサイレント変異を持つcDNAを強制発現することで、どちらかのアイソフォームのみを発現する亜株(3AB-only、3A-only)を樹立した。

これら3つの株(KO、3AB-only、3A-only)を用いてマトリゲル浸潤能を測定したところ、KO株と3AB-only株は浸潤能の著明かつ有意な低下を認めた(図1、次頁)。このことから、p120ctn-3Aは大腸癌細胞の浸潤抑制において有効な治療標的となり得る可能性が示唆された。

次に、大腸癌細胞の浸潤におけるp120ctn-3Aの役割について手掛かりを得るため、p120ctn-3Aの細胞内局在を検討した。相異なる蛍光タンパクで標識したp120ctn-3Aと-3ABの強制発現細胞の観察により、集塊を形成し遊走していない細胞では両者共に細胞膜に沿って局在した一方で、遊走中の細胞ではp120ctn-3Aのみが細胞の辺縁部に強く局在した(図2、次頁)。タイムラプス観察によって、同部位が遊走先端(leading edge)であることを確認した。

以上の結果から、p120ctn-3Aは大腸癌細胞の遊走先端において浸潤促進に関わる何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。その詳細なメカニズムの解明は今後の課題である。

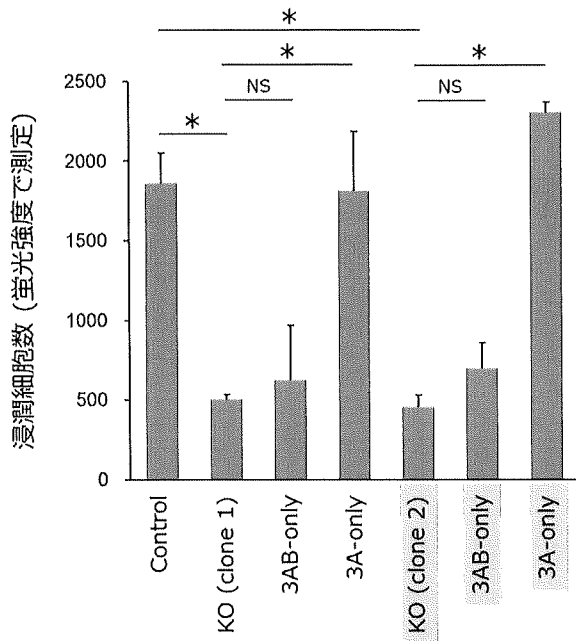


図1. マトリゲル浸潤能アッセイ
DLD-1細胞から樹立した3つの株(KO、3AB-only、3A-only)を使用した。
* $P < 0.05$
NS (not significant): $P > 0.05$

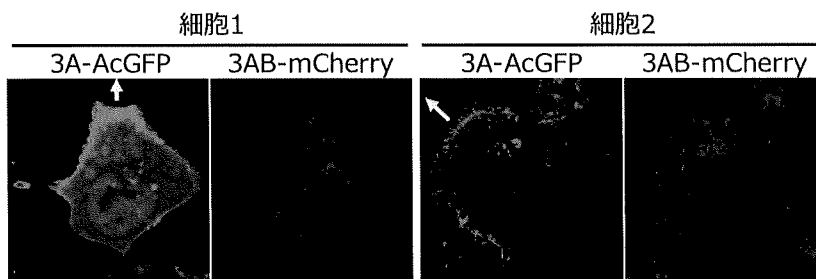


図2. 遊走中のDLD-1細胞におけるp120ctn-3ABと3Aの局在検討
相異なる2つの細胞のデータを示す。矢印は細胞の遊走方向であり、遊走先端(leading edge)にp120ctn-3Aのみ強い集積を認める。

【3】今後の予定

被助成者の異動に伴う研究環境の変化による制約の中、p120ctn-3Aが大腸癌細胞の浸潤に重要な役割を果たすことを示唆する成果を得た。今後はその役割を分子レベルで解明する必要がある。また、p120ctn-3Aそのものを治療標的とすることはアミノ酸配列の特異性の面で困難な可能性があるため、p120ctn-3Aの協調分子を同定し、その中から治療標的候補を探索する必要があると思われる。一定の成果が出揃った段階で学術誌に論文発表する予定である。

【4】参考文献

1. Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Aoki M: HNRNPLL, a newly identified colorectal cancer metastasis suppressor, modulates alternative splicing of *CD44* during epithelial-mesenchymal transition. *Gut* 67(6):1103-1111, 2018.
2. Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Aoki M: HNRNPLL stabilizes mRNAs for DNA replication proteins and promotes cell cycle progression in colorectal cancer cells. *Cancer Science* 109(8):2458-2468, 2018.
3. Sakuma K, Sasaki E, Hosoda W, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Aoki M: MYB mediates downregulation of the colorectal cancer metastasis suppressor HNRNPLL during epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Science* 112(9):3846-3855, 2021.

【5】謝辞

本研究の遂行にあたり多大な援助を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝致します。また、本研究は被助成者の前所属である愛知県がんセンター研究所がん病態生理学分野に於いて開始されたものであり、青木正博分野長に対し心より感謝を申し上げます。