

大腸発癌に関わる Wnt シグナル関連タンパク質発現の 臨床病理学的解析

学位論文内容の要旨

(背景・目的)大腸発癌は癌遺伝子や癌抑制遺伝子の遺伝子異常蓄積の多段階過程であり、いくつかのシグナル伝達経路の deregulation を誘導する。重要な遺伝子異常の一つは adenomatous polyposis coli (*Apc*) の変異であり、それは Wnt シグナル伝達経路の deregulation をもたらす。 β -Catenin は Wnt シグナル伝達に重要な役割を果たしており、*Apc* 遺伝子あるいは β -Catenin 遺伝子自身に変異が発生し Wnt シグナル伝達経路が活性化された時、 β -Catenin は TCF4 などの TCF/LEF HMG box 転写因子ファミリーと複合体を形成することによって転写を活性化し、最終的に *c-myc*、*cyclin D1* および *c-jun* を含む標的遺伝子の活性化をもたらす。

癌原遺伝子である *c-Jun* は二量体 AP-1 転写因子の主な構成因子である。AP-1 機能の刺激で重要なメカニズムは *c-Jun* N-terminal kinases (JNKs) による *c-Jun* のアミノ基末端のリン酸化である。リン酸化された *c-Jun* (p-*c-Jun*) はストレス誘導性アポトーシス、細胞の増殖および腫瘍形成に関与している。最近、p-*c-Jun* が TCF4 と相互作用し複合体を形成して、 β -Catenin の存在でその転写活性を協同的に高めることが示され、こうした *c-Jun* リン酸化に依存した相互作用はマウス腸管発癌に必須であることが報告された。

さらに近年、Wnt 標的遺伝子として同定された leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (*Lgr5*) は小腸と大腸の組織幹細胞の候補とされる陰窩基底部分にある columnar 細胞 (CBC 細胞) で独占的に発現していることが knock-in マウスを利用した実験で示された。*Lgr5* 陽性 CBC 細胞の系統追跡実験では、この細胞が全ての上皮細胞を産生していることが立証され、*Lgr5* 陽性細胞が小腸や大腸の幹細胞であることが示唆された。さらに、この *Lgr5* 陽性幹細胞で APC を欠損させたマウスは急速に増殖する腺腫を形成し、APC が変異した *Lgr5* 陽性大腸幹細胞が大腸腫瘍の信頼できる起源細胞であることが示唆された。

本研究は、大腸腫瘍形成に関わる Wnt シグナル関連因子の発現とその臨床病理学的意義を検討するために、第1章ではヒト大腸腫瘍における p-*c-Jun*、TCF4 および β -Catenin の核発現とその転写標的である MMP7 の発現を、第2章では大腸幹細胞マーカー *Lgr5* の発現を解析した。

(方法)北海道大学病院にて2000年から2003年の間に外科的または内視鏡的に切除され、ホルマリン固定・パラフィン包埋された原発性大腸腫瘍検体(第1章では Low-grade intraepithelial neoplasia (LGINs) 19例、High-grade intraepithelial neoplasia (HGINs) 14例および浸潤癌 35例の計 68検体、第2章では同検体で腫瘍の残存していた LGINs 17例、HGINs 13例および浸潤癌 30例の計 60検体)を材料とした。p-*c-Jun*、 β -Catenin、MMP7、*Lgr5* および *c-Myc* の発現は免疫組織化学法によって解析した。p-*c-Jun*、

TCF4、 β -Catenin、MMP7 および c-Myc の発現は免疫組織化学スコア [(IHC スコア) = (陽性細胞の割合 (%)) \times (染色強度 0~3)] として評価した。Lgr5 の発現はいずれの陽性細胞も染色強度が同程度であったため、陽性細胞の割合として評価した。

(結果) 第 1 章において、LGIN では p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin が、HGIN および浸潤癌では p-c-Jun と β -Catenin が、隣接する正常上皮に比べて有意に高い IHC スコアをいずれも示した ($p < 0.05$)。これら 3 つのタンパク質の IHC スコアを LGIN、HGIN および浸潤癌の間でそれぞれ比較すると、p-c-Jun のみ有意な違いがあり、LGIN と HGIN で浸潤癌に比べて高い値を示した ($p = 0.02$)。さらに、浸潤癌において p-c-Jun 発現と pT 因子との間に負の関係性が観察された ($p = 0.0006$)。p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の核発現と MMP7 の細胞質発現の有意な相関関係は、p-c-Jun と TCF4 ($r = 0.25$, $p = 0.04$)、TCF4 と β -Catenin ($r = 0.30$, $p = 0.01$)、p-c-Jun と MMP7 ($r = 0.26$, $p = 0.03$)、そして TCF4 と MMP7 ($r = 0.39$, $p = 0.0008$) の間にそれぞれ認められた。

第 2 章において、隣接正常大腸上皮における Lgr5 の発現は陰窩基底部分にある極少数の細胞の細胞膜と細胞質にまばらに検出されるだけであったが、殆どの大腸腫瘍では Lgr5 陽性細胞の増加を認めた。Lgr5 陽性細胞は通常、クラスターを形成し、陰窩基底部分に限局せず、同じ様な染色強度でまだら状の分布を示した。全腫瘍領域における Lgr5 の発現率は各腫瘍グレード (LGIN、HGIN および浸潤癌) で違いは認められなかったが、明らかな Lgr5 陽性細胞の分布の違いがそれらの間で観察された。そのため、各腫瘍グレードでの内腔表面、陰窩上部および陰窩下部の 3 つの腫瘍領域に分けて Lgr5 の発現を評価すると、内腔表面における Lgr5 の発現は腫瘍グレードの進行と有意な負の関係性を ($p = 0.0004$)、陰窩下部では有意な正の関係性を示した ($p = 0.0001$)。浸潤癌においては、内腔表面における Lgr5 の発現は pStage と負の関係性を示し ($p = 0.02$)、進行した pStage ではほぼ全例で陰窩下部での高発現を認めた。Lgr5 の発現と Wnt シグナル因子の TCF4、 β -Catenin および c-Myc の発現との間には有意な関係性はなかったが、Lgr5 と TCF4 ($p = 0.1$) あるいは β -Catenin ($p = 0.2$) との間には僅かに正の係に傾く傾向が認められた。また、Lgr5 陽性細胞は、典型的にクラスターを形成し、まだら状の分布を示したが、TCF4、 β -Catenin および c-Myc は Lgr5 陽性領域を超えて広く発現していた。

(考察) 第 1 章では p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin が腫瘍で隣接正常上皮と比較して高頻度に過剰発現していることが明らかとなり、これら 3 つのタンパク質がヒト大腸腫瘍発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。浸潤癌に比べて LGINs と HGINs での p-c-Jun の高発現、および浸潤癌における p-c-Jun と pT 因子進行との負の関係性は、p-c-Jun が腫瘍発生より早期の段階で重要な役割を果たしている可能性を示唆している。さらに、これら 3 つのタンパク質発現とそれらの下流遺伝子産物の一つである MMP7 発現の間に認められた複数の相関は、*in vitro* で立証された p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の相互作用がヒト大腸腫瘍発生においても重要であることを示唆するものである。

第 2 章では、腫瘍の進行過程と Lgr5 の内腔表面での発現の間の有意な負の関係性、および腫瘍進行の過程と Lgr5 の陰窩下部での発現の間の有意な正の関係性が観察された。これらの結果は Lgr5 陽性細胞の分布は大腸癌の発生過程で内腔表面から陰窩基底部分へ移行する可能性を示唆している。また、浸潤癌においては内腔表面での Lgr5 の発現と pStage との間に負の関係性を認め、pStage の進行例ではほとんど全ての腫瘍で陰窩下部に Lgr5 の高発現を認めたことから、癌浸潤先進部への Lgr5 陽性細胞の分布移行が大腸癌の進行にも重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

(結語) p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の細胞核発現はヒト大腸腫瘍発生に重要な役割があり、特に p-c-Jun は腫瘍発生早期の段階で中心的な役割を果たしていることが示唆された。また、Lgr5 幹細胞マーカー発現陽性細胞の増加は大腸腫瘍形成の早期に発生し、

それらの分布が癌浸潤先進部に移行することが大腸癌の発生や進行に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。大腸腫瘍形成に関わるこれらのタンパクの機能やその調節のメカニズムの解明は大腸発癌のさらなる理解を深め、最終的に大腸癌に対する新しい予防や治療戦略の進歩につながる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	秋田弘俊
副査	教授	今村雅寛
副査	教授	松野吉宏
副査	准教授	平野聡

学位論文題名

大腸発癌に関わる Wnt シグナル関連タンパク質発現の 臨床病理学的解析

大腸発癌は癌遺伝子や癌抑制遺伝子の遺伝子異常蓄積の多段階過程であり、いくつかのシグナル伝達経路の deregulation を誘導する。Apc 遺伝子あるいは β -Catenin 遺伝子自身に変異が発生し Wnt シグナル伝達経路が活性化された時、 β -Catenin は TCF4 などの TCF/LEF HMG box 転写因子ファミリーと複合体を形成することによって転写を活性化し、最終的に *c-myc*、*cyclin D1* および *c-jun* を含む標的遺伝子の活性化をもたらす。癌原遺伝子産物である c-Jun は二量体 AP-1 転写因子の主な構成因子である。AP-1 機能の刺激で重要なメカニズムは c-Jun N-terminal kinases (JNKs) による c-Jun のアミノ基末端のリン酸化である。リン酸化された c-Jun (p-c-Jun) はストレス誘導性アポトーシス、細胞の増殖および腫瘍形成に関与している。最近、p-c-Jun が TCF4 と相互作用し複合体を形成して、 β -Catenin の存在でその転写活性を協同的に高めることが示され、こうした c-Jun リン酸化に依存した相互作用はマウス腸管発癌に必須であることが報告された。さらに近年、Wnt 標的遺伝子として同定された leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5) は小腸と大腸の組織幹細胞の候補とされる陰窩基底部分にある columnar 細胞 (CBC 細胞) で独占的に発現していることが knock-in マウスを利用した実験で示された。Lgr5 陽性 CBC 細胞の系統追跡実験では、この細胞が全ての上皮細胞を産生していることが立証され、Lgr5 陽性細胞が小腸や大腸の幹細胞であることが示唆された。さらに、この Lgr5 陽性幹細胞で APC を欠損させたマウスは急速に増殖する腺腫を形成し、APC が変異した Lgr5 陽性大腸幹細胞が大腸腫瘍の信頼できる起源細胞であることが示唆された。本研究では、大腸腫瘍形成に関わる Wnt シグナル関連因子の発現とその臨床病理学的意義を検討するために、ヒト大腸腫瘍における p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の細胞核発現とその転写標的である MMP7 の発現を解析した。さらに、Wnt 標的分子で大腸幹細胞マーカーの Lgr5 の発現を解析した。ヒト大腸腫瘍における p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の核発現とその転写標的である MMP7 の発現の解析において、LGIN では p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin が、HGIN および浸潤癌では p-c-Jun と β -Catenin が、隣接する正常上皮に比べて有意に高い IHC スコアをいずれも示した。これら 3 つのタンパク質の IHC スコアを LGIN、HGIN および浸潤癌の間でそれぞれ比較すると、p-c-Jun のみ有意な違いがあり、LGIN と HGIN

で浸潤癌に比べて高い値を示した。さらに、浸潤癌において p-c-Jun 発現と pT 因子との間に負の関係性が観察された。p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の核発現と MMP7 の細胞質発現の有意な相関関係は、p-c-Jun と TCF4、TCF4 と β -Catenin、p-c-Jun と MMP7、そして TCF4 と MMP7 の間にそれぞれ認められた。本研究では p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin が腫瘍で隣接正常上皮と比較して高頻度に過剰発現していることが明らかとなり、これら 3 つのタンパク質がヒト大腸腫瘍発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。浸潤癌に比べて LGINs と HGINs での p-c-Jun の高発現、および浸潤癌における p-c-Jun と pT 因子進行との負の関係性は、p-c-Jun が腫瘍発生のより早期の段階で重要な役割を果たしている可能性を示唆している。さらに、これら 3 つのタンパク質発現とそれらの下流遺伝子産物の一つである MMP7 発現の間に認められた複数の相関は、*in vitro* で立証された p-c-Jun、TCF4 および β -Catenin の相互作用がヒト大腸腫瘍発生においても重要であることを示唆するものである。大腸幹細胞マーカー Lgr5 の発現解析において、隣接正常大腸上皮における Lgr5 の発現は陰窩基底部分にある極少数の細胞の細胞膜と細胞質にまばらに検出されるだけであったが、殆どの大腸腫瘍では Lgr5 陽性細胞の増加を認めた。Lgr5 陽性細胞は通常、クラスターを形成し、陰窩基底部分に限局せず、同じ様な染色強度でまだら状の分布を示した。全腫瘍領域における Lgr5 の発現率は各腫瘍グレード (LGIN、HGIN および浸潤癌) で違いは認められなかったが、明らかな Lgr5 陽性細胞の分布の違いがそれらの間で観察された。そのため、各腫瘍グレードでの内腔表面、陰窩上部および陰窩下部の 3 つの腫瘍領域に分けて Lgr5 の発現を評価すると、内腔表面における Lgr5 の発現は腫瘍グレードの進行と有意な負の関係性を、陰窩下部では有意な正の関係性を示した。浸潤癌においては、内腔表面における Lgr5 の発現は pStage と負の関係性を示し、進行した pStage ではほぼ全例で陰窩下部での高発現を認めた。本研究では、腫瘍の進行過程と Lgr5 の内腔表面での発現の間の有意な負の関係性、および腫瘍進行の過程と Lgr5 の陰窩下部での発現の間の有意な正の関係性が観察された。これらの結果は Lgr5 陽性細胞の分布は大腸癌の発生過程で内腔表面から陰窩基底部分へ移行する可能性を示唆している。また、浸潤癌においては内腔表面での Lgr5 の発現と pStage との間に負の関係性を認め、pStage の進行例ではほとんど全ての腫瘍で陰窩下部に Lgr5 の高発現を認めたことから、癌浸潤先進部への Lgr5 陽性細胞の分布移行が大腸癌の進行にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

発表終了後、副査の今村教授から、1) Lgr5 陽性細胞の分布の変化の生物学的意義について、2) 大腸癌における Niche との関係について、3) p-c-Jun 発現と多段階発癌の逆相関について、副査の松野教授からは、1) p-c-Jun ではなく、全 c-Jun の発現について、2) p-c-Jun と MMP7 の発現の関係について、3) 今後の展望について、質問があった。また、Lgr5 の発現が腺腫の表層部分と癌の浸潤部で発現していることは癌幹細胞の概念と一致するとのコメントがあった。副査の平野准教授からは、1) LGIN と HGIN の病理診断について、2) β -Catenin、TCF4、p-c-Jun の陽性コントロールについて、3) 免疫染色の 1 腫瘍検体当たりの評価細胞数や視野数、評価方法について、4) 相関関係の評価について、5) 癌幹細胞マーカー CD133、CD44 との関係について、質問があった。最後に、主査の秋田教授から、1) 今後の研究の展開について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究結果と文献情報をもとに概ね適切な回答を行った。

この論文は、大腸腫瘍形成に関わる Wnt シグナル関連タンパク質の発現を明らかにし、大腸癌の分子メカニズムのさらなる理解を示した点で高く評価され、今後、大腸癌に対する新しい予防や治療戦略の進歩につながる事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。