日消外会誌　33（4）：529～532，2000年

特集 4

癌転移に関与する新しい食道癌分子標的のクローニング

九州大学医学部第 2 外科，九州大学生体防御医学研究所腫瘍外科*
田中　真二　　佐藤　浩一*　　森　　正樹*　　杉町　圭蔵

癌転移には細胞接着の機能低下が重要な因子として関与する．近年，細胞接着の裏打ち分子βカテニンが Wnt シグナルにより細胞膜下から核内へ移行することが報告されている．我々はヒト食道癌で特異的に発現する新規 Wnt レセプター FzE3を同定し，その cDNA をクローニングした．FzE3を食道癌培養細胞に導入すると癌抑制遺伝子 APC 産物とβカテニンの結合が増加し，βカテニンは細胞膜下から核内へ移行した．一方，膜貫通ドメインを欠損させた FzE3ΔC を遺伝子導入すると APC とβカテニンの結合が阻害され，βカテニンの核内移行が抑制された．我々が同定した新規癌特異的分子 FzE3 はβカテニン・シグナル伝達系に作用し，さらにその抑制分子は癌転移に対する遺伝子治療の新たな分子標的として応用できる可能性が示された．

はじめに

癌細胞では細胞間の接着の異常がしばしば認められ，浸潤や転移といった癌の進展に関与していると考えられている．カドヘリンは細胞間接着の重要な因子の一つであり，近年，胃癌多発家系における E-カドヘリンの遺伝子異常が報告され，その重要性がますます注目されている[1]．αカテニン，βカテニンは，カドヘリンの細胞内領域と結合し細胞骨格を連結して安定化させる裏打ち蛋白質として同定された．βカテニンはカドヘリンとαカテニンを連結し，さらに細胞骨格アクチンと連結し細胞接着を安定化する機能を持つため，βカテニンは正常細胞では細胞膜下を縁取るように存在している．ところが，癌細胞ではβカテニンがしばしば核内に存在することが報告されている．最近，このような核内βカテニンが実は転写因子 Lef/Tcf と結合しており，転写促進因子として c-myc や cyclin D1などの癌関連遺伝子の発現を高めていることが明らかとなっている[2]．即ち，βカテニンは細胞接着の安定化という癌抑制遺伝子的な機能と，転写促進という癌遺伝子的な機能の二面性をもち，細胞膜下から核内へダイナミックに移動する特異な分子なのである．

さらに最近になって，このようなβカテニンの二面的機能のオン，オフをコントロールするメカニズムが明らかになってきた[3]．正常細胞では細胞質内のβカテニンは癌抑制遺伝子産物 APC と結合すると glycogen synthase kinase 3β（GSK-3β）という酵素によってリン酸化され，ユビキチン系により次々と破壊されていくのだが，カドヘリンと結合した場合その破壊システムから逃れるため，通常βカテニンは細胞接着のメンバーとして機能することになる．一方，Wnt という分泌蛋白質のシグナル伝達によって GSK-3β酵素が抑制されると，APC を介した破壊システムは止まって，安定化したβカテニンは転写因子 Lef/Tcf と結合して核内へ移動し，転写促進因子として機能するようになるとされている．つまり，この Wnt シグナルによって「細胞接着」から「転写促進」というβカテニンの二つの機能のスイッチが切り替わっていると考えられている．ショウジョウバエ Wnt（Wingless）のレセプターとして Frizzled という分子がクローニングされているが[4]，ヒト癌での Wnt レセプターの発現は不明である．そこで，本研究ではショウジョウバエの相同性から，食道癌で特異的に発現するヒト Wnt レセプターの同定を試みた．さらにそのシグナル抑制分子を設計し，βカテニンの機能制御の可能性について解析したので報告する[5]．

対象と方法

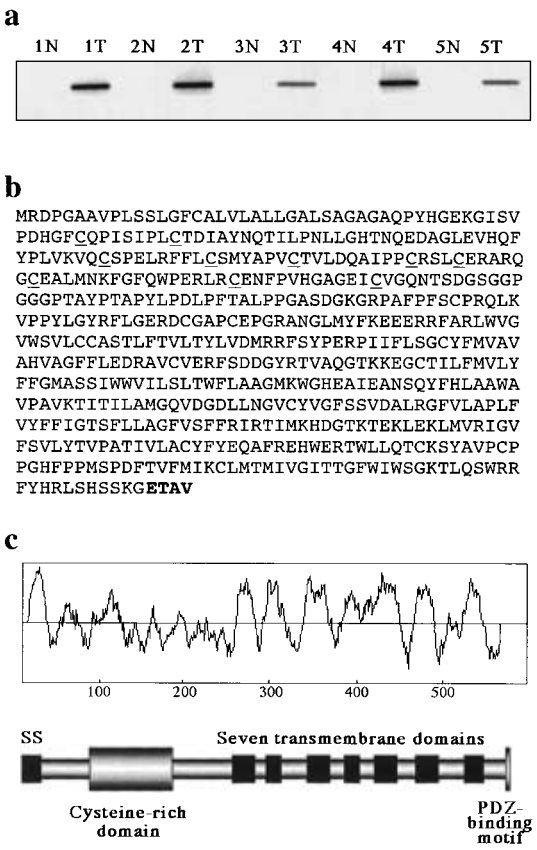
1．食道癌特異的 Wnt レセプターの同定

ショウジョウバエ Wnt/Wingless レセプターとして報告された Frizzled のアミノ酸コンセンサス配列を

＊第54回日消外会総会シンポ 4・消化器癌転移能の分子生物学的側面（消化管）

＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：田中　真二
〒812-8582　福岡市馬出3―1―1　九州大学医学部第 2 外科

Fig. 1　Isolation of a cancer-specific frizzled gene, FzE3, from human esophageal carcinoma.
a：Expression pattern of FzE3 in tissue samples of esophageal carcinoma（T）compared to adjacent normal mucosa（N）. The number indicates the clinical sample. b：Deduced amino acid sequence encoded by FzE3 gene. The conserved cysteine residues are present in the N-terminus（underlined）and the XTXV motif known to bind to PDZ domains is present in the C-terminal tail（bold）. c：Hydropathy profile of FzE3 protein as predicted by the Kyte-Doolittle algorithm, and its predicted structure.



用いて，ヒト cDNA ライブラリーに対し degenerate PCR を施行した. PCR 産物をクローニングし塩基配列を決定した．次に各クローンに特異的な PCR primer を設定し，ヒト食道癌組織の臨床検体に対し RT-PCR を行い癌特異的遺伝子を同定した. その cDNA 全長を degenerate PCR 及び RACE 法によりクローニングした.

2．食道癌培養細胞での機能解析

癌特異的 Wnt レセプターを発現ベクターに組み込み，食道癌培養細胞へ遺伝子導入した．導入細胞におけるβカテニンの局在および APC とβカテニンの結合性を免疫蛍光法および免疫沈降法により解析した．さらにその抑制変異体を設計し，食道癌でのβカテニンシグナル伝達系への作用を検討した.

結　果

ショウジョウバエ Wnt レセプターの相同遺伝子としてヒト cDNA ライブラリーより7クローンを分離した．次にそれぞれのクローンに対し，特異的な PCR primer を設定しヒト食道癌組織の臨床検体に対し RT-PCR を行った. その結果, クローン FzE3は食道癌の47例中28例（60%）の癌部でのみ強く発現していることが明らかとなった（**Fig. 1a**）．Degenerate PCR および RACE 法によりその cDNA 全長をクローニングすると, FzE3遺伝子の蛋白質コード領域は1722塩基対であり, その蛋白質は574アミノ酸から成立していることが予想された（**Fig. 1b**）.

FzE3蛋白質のアミノ酸配列から Kyte & Doolittle の方法により疎水性解析を行った（**Fig. 1c**）．その結果, N 末端の30アミノ酸までに強い疎水性領域を認め, 270アミノ酸～550アミノ酸までに 7 つの疎水性領域を持つことが明らかとなった．N 末端疎水性領域は分泌蛋白などにみられるシグナル配列であり，N 末部分は細胞外領域と予想された．続いて 7 回膜貫通ドメインが存在し，C 末端は細胞内領域と考えられた．FzE3 蛋白質の細胞外領域には10個のシステイン（C）の集団が認められ，Wnt 結合部位であるシステイン・リッチ・ドメインを形成している．また，細胞内領域の C 末端にはグルタミン酸-スレオニン-アラニン-バリン（ETAV）という特徴的な配列があり，細胞内シグナル伝達分子 PDZ ファミリーの結合モチーフに完全に一致した. つまり, FzE3分子は Wnt と結合して刺激を受ける細胞外領域，細胞膜を貫通する部分，細胞内 PDZ 分子へ刺激を伝える細胞内領域から構成されている（**Fig. 1c**）．その細胞内 PDZ 分子として PDZ ドメインを持つ蛋白質 Dishevelled（Dvl）が考えられている．同様の構造はショウジョウバエの Wnt/Wingless レセプターにもみられ，FzE3がヒト Wnt レセプターとして機能している可能性が示唆された.

次に，この FzE3分子の機能を認べるため FzE3 cDNA を発現ベクターに組み込み, FzE3の発現が低い食道癌細胞 KYSE150に遺伝子導入し, βカテニンの変化を解析した.

Fig. 2　Schematic illustration of the FzE3 protein and its dominant negative mutant FzE3ΔC protein. CRD：cysteine-rich domain. TM：transmembrane.

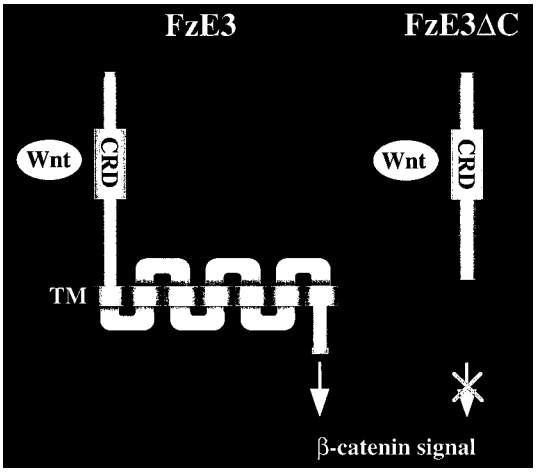
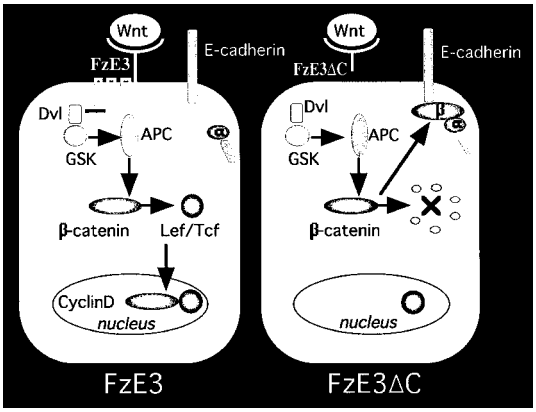


Fig. 3　Diagram illustrating the potential function of FzE3（right）and FzE3ΔC to regulate β-catenin signaling in esophageal carcinoma cells.



KYSE150細胞ではβカテニンは細胞膜下に存在しているが，FzE3遺伝子導入によりβカテニンが細胞質，核内へと移動し，FzE3がβカテニンシグナル伝達系に作用することが明らかとなった[5]．さらに，FzE3シグナルを抑制するための分子設計を試みた(**Fig. 2**)．FzE3分子はN末端の細胞外領域のシステイン・リッチ・ドメインの部分でWntと結合し，C末端の細胞内領域のPDZドメインで細胞内へ刺激を伝達する．そこで，この膜貫通ドメイン以下を欠損させたFzE3ΔCを作製した．FzE3ΔCはシグナル配列により細胞外へ分泌されWnt分子をトラップするが，細胞内には刺激を伝達できないため内因性FzE3のアンタゴニストとして機能すると考えられる．FzE3ΔC発現ベクターを作製し，細胞への導入を行った．FzE3によってβカテニンは核内移行するが，同様の所見はβカテニンのカウンターパートである転写因子Lef-1の導入によっても認められる．FzE3とLef-1の共発現ではβカテニンの核内移行はさらに進むが，FzE3ΔCによってこれらの核内移行は完全にブロックされた．さらにFzE3はAPCと結合したβカテニンの安定化を促すが，FzE3ΔCによって完全に抑制されることを免疫沈降法により証明した．また，FzE3によって誘導されたβカテニンのターゲットとしてCyclin D1の発現を調べると，βカテニンが核内移行した細胞の約85%にCyclin D1蛋白質の強い発現を認めるが，FzE3ΔCでは殆ど発現を認めなかった．

考　察

癌特異的シグナル伝達は新しい癌治療の標的として注目されており，その標的分子の同定は急務である．特にレセプター型分子は細胞外からのアプローチという観点から，遺伝子治療の具体的なターゲットとして臨床応用の可能性が高い．我々がクローニングしたFzE3は食道癌特異的なWntレセプターであり，さらにβカテニンの制御という機能を持つ重要な分子である．そのメカニズムをシェーマとして**Fig. 3**に提示した．FzE3分子は食道癌細胞においてβカテニンの安定化を促し，「転写促進因子型」βカテニンへ変換，核内移行させてCyclin D1などの発現を促進すると考えられる．また，そのシグナル抑制分子FzE3ΔCによってβカテニンは不安定化し細胞膜下に移行，「接着制御因子型」βカテニンへと逆変換することが明らかとなった．

癌抑制遺伝子APCは大腸ポリポーシス（adenomatous polyposis coli）の原因遺伝子の１つとしてクローニングされ，一般に大腸癌では60～80%に遺伝子変異を認める．変異APCはβカテニンとの結合性を失っているため破壊システムは作動せず，Wntシグナルに依存しなくても「転写促進因子型」βカテニンへ変換することが知られている．また，一部の大腸癌ではβカテニンに変異がありGSK-3βのリン酸化作用を受けないことも報告されている．しかし，同じ消化管癌でも食道癌ではAPC変異は数%とされており，βカテニン変異の報告はない．本研究により，このような癌ではFzE3を介したシグナル伝達の異常亢進がβカテ

ニンの癌遺伝子的機能を制御することが明らかとなった．最近，転写促進因子型βカテニンの標的遺伝子としてマトリックス・メタロプロテアーゼ（MMP）の一種が同定されている[6]．MMPは間質や基底膜のコラーゲン，ラミニンなどを融解し，癌細胞浸潤を促すことが知られており，βカテニンが細胞接着のみならず細胞浸潤にも関連することを示唆している．

本研究は，癌におけるβカテニン・シグナル伝達異常の1機序を明らかにするとともに，癌遺伝子型βカテニンを癌抑制遺伝子型βカテニンに逆変換させ転移の抑制をはかる新しい癌治療の可能性を示すものと考えられる．今後，その臨床応用について更に検討を進めたい．

文　献

1) Guilford P, Hopkins J, Harraway J et al：E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature **392**：402―405, 1998
2) Peifer M：β-catenin as oncogene：the smoking gun. Science **275**：1752―1753, 1997
3) Polakis P：The oncogenic activation of β-catenin. Curr Opin Genet Dev **9**：15―21, 1999
4) Bhanot P, Brink M, Samos CH et al：A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. Nature **382**：225―230, 1996
5) Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M et al：A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/β-catenin signals. Proc Natl Acad Sci USA **95**：10164―10169, 1998
6) Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA et al：The metalloproteinase matrilysin is a target of β-catenin transactivation in intestinal tumors. Oncogene **18**：2883―2891, 1999

Identification of a Novel Molecular Target that Regulates Metastasis of Human Esophageal Carcinoma

Shinji Tanaka, Koichi Sato*, Masaki Mori* and Keizo Sugimachi
Department of Surgery II, Faculty of Medicine, Kyushu University
Department of Surgery, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University*

A novel member of the human frizzled (Fz) gene family was cloned and found to be specifically expressed compared to the adjacent uninvolved normal mucosa in 28 of 47 (60%) squamous cell esophageal carcinomas. The FzE3 cDNA encodes a protein of 574 amino acids and shares high sequence homology with other frizzled genes, particularly in the putative ligand-binding region of the cysteine-rich extracellular domain. Functional analysis revealed that transfection and expression of the FzE3 cDNA in esophageal carcinoma cells stimulates complex formation between APC and β-catenin followed by nuclear translocation of β-catenin, which mediataes cell-cell attachment with E-cadherin. Furthermore, cotransfection of a mutant construct encoding a FzE3 protein with a C-terminal truncation completely inhibited the interaction of APC with β-catenin in the cells. These observations suggest that FzE3 gene expression may downregulate APC function and enhance β-catenin mediated signals in human esophageal carcinomas.

Key words：β-catenin, Frizzled, esophageal carccinoma

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：529―532, 2000〕

Reprint requests：Shinji Tanaka　Department of Surgery II, Faculty of Medicine, Kyushu University
3-1-1 Maidashi, Fukuoka, 812-8582 JAPAN