The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Full-length LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in colorectal cancer
Author(s)	大澤, 日出樹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59543
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	大澤　日出樹
論文題名 Title	Full-length LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in colorectal cancer （大腸癌において完全長のLGR5陽性細胞は化学療法抵抗性を持つ）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

LGR5は当初、腸管の幹細胞マーカーとして同定され、さらに発癌に関連するWNTシグナルを制御する癌幹細胞マーカーとしても報告され、現在大きく脚光を浴びている。しかし、LGR5のmRNAの発現レベルや免疫染色を用いた予後に関する報告ではその有用性は議論が分かれる。LGR5が属するLGRファミリーには完全長とは異なる機能を持つスプライスバリアントが存在することが報告されている。LGR5に関しても軟部組織腫瘍においてスプライスバリアントの存在が報告されているが、大腸癌とスプライスバリアントを考慮したLGR5の関連については報告がない。本研究では大腸に対するLGR5のスプライスバリアントの関与ならびに大腸癌における各アイソフォームの発現の生理学的影響を検討することを目的とする。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

小腸、大腸、直腸のヒト臨床検体よりmRNAを抽出しRTを行いcDNAを合成した。合成したcDNAに対してLGR5のexon1からexon13をPCR産物とするプライマーを用いてPCRを行いPCR産物に対して電気泳動を行ったところ、複数のバンドを認めた。ゲル上のバンドよりPCR産物を抽出し塩基配列を解析したところ、完全長のLGR5（LGR5FL）の他にexon5を欠損したもの（LGR5Δ5）とexon5からexon8が欠損したもの（LGR5Δ5-8）の2種類のスプライスバリアントが同定された。腸管上皮細胞を絨毛の部位別に採取してmRNAを抽出し、RT-PCRを行ったところ、LGR5FLのみが陰窩の部分で発現しており、スプライスバリアントは絨毛の中間部位から先端で発現が見られた。これらのスプライスバリアントが蛋白に翻訳されているかどうかを検討するためHEK293細胞株にLGR5FL、LGR5Δ5、LGR5Δ5-8を強制発現させウェスタンブロッティングを行いそれぞれの分子量に相当する部位にバンドを認めた。臨床検体においてもウェスタンブロッティングにより各アイソフォームの内在性タンパク発現が確認できた。次に各アイソフォームの機能の違いについて解析を行った。LGR5の発現が最も大きい大腸癌細胞株であるLoVoを無血清下で36時間培養した後に血清を添加し経時的に細胞を採取しmRNAを抽出した。RT-PCRにより細胞周期が止まっている間はLGR5FLのみの発現を認めたが、血清添加後12時間後では複数のバンドを認め、細胞周期が進むとLGR5のスプライスバリアントが発現することが示唆された。また、LGR5の各アイソフォームを強制発現させたHEK293細胞株にWnt3AとRspondin-1（RSPO1）による刺激を加えた後に抽出したタンパクに対してウェスタンブロッティングを行ったところ、Wntシグナルの活性化に重要な因子であるLRP6のリン酸化がLGR5FLを強制発現させた細胞で抑制されていた。次に大腸癌細胞株（HT29）にLGR5の各アイソフォームを強制発現させたものを用いて、TOP-flash assay, cell cycle assayを行ったところ、LGR5FLを強制発現させたものはスプライスバリアントを強制発現させたものに比し、Wnt活性が有意に低くG2/G1比も有意に低かった。以上のことから、LGR5FLを強制発現させたものは細胞増殖能が低く、逆にスプライスバリアントを強制発現させたものは細胞増殖能が高いことが示唆された。さらに、LGR5FLのみexon5が存在することに着目し、LGR5exon5を認識する抗体を作製し、LGR5FL陽性細胞を免疫染色で同定することに成功した。化学療法を施行した後に原発巣切除を行った大腸癌症例を対象に、化学療法前後の腫瘍組織に対してこの新規抗体を用いて免疫染色を行ったところ、LGR5FL陽性細胞は化学療法後に有意に増加していた。in vitroにおいてもLGR5FLを強制発現させた大腸癌細胞株（HT29）は5-FUに対して抵抗性を示した。また、新規抗体を加えるとこの抵抗性が減弱することが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究では大腸においてLGR5のスプライスバリアントが存在することを初めて明らかにした。また、完全長のLGR5が発現した細胞は細胞増殖能が低く、抗がん剤耐性を持つことが示唆された。さらに今回我々が作成した抗LGR5exon5抗体を加えることで抗癌剤耐性が減弱することが示唆されたことから抗LGR5exon5抗体は新規治療開発の一助となる可能性がある。完全長のLGR5陽性細胞は大腸癌治療戦略において検討すべき標的の一つと考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）大澤　日出樹

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	森　正樹
	副　査	大阪大学教授	奥山宏臣
	副　査	大阪大学教授	竹原徹郎

論文審査の結果の要旨

LGR5は腸管幹細胞、癌幹細胞のマーカーとして大腸癌において非常に注目されている分子の一つである。軟部組織腫瘍においてLGR5にはスプライスバリアントがあることが報告されているが、大腸においてもスプライスバリアントがあるかは不明である。本研究は大腸におけるLGR5のスプライスバリアントを検証し、完全長のLGR5の生理学的意義を解明することを目的としている。大腸においてLGR5のスプライスバリアントはexon5を欠損したものとexon5-8が欠損したものが存在することが示された。各アイソフォームの機能解析では完全長のLGR5陽性細胞はスプライスバリアントに比し、Wnt活性が低く細胞増殖が抑制されている可能性が示唆された。完全長のLGR5のみを同定できる抗体を作成し、臨床検体に対して免疫染色を行うことで、化学療法施行後には完全長のLGR5陽性細胞が増加することが示された。本研究の成果は大腸においてLGR5のスプライスバリアントが存在することを初めて明らかにし、大腸癌において完全長のLGR5陽性細胞が化学療法耐性を持つことを示唆するものであり、学位に値すると考える。