

<特集「個体発生と細胞分化の医学」>

消化管上皮細胞の発生・分化異常と発癌：  
TGF- $\beta$ /Wnt シグナル伝達系と RUNX3 は  
消化器癌にどのようにかかわっているのか？

阪倉 長平\*, 大辻 英吾

京都府立医科大学大学院医学研究科消化器外科学

Relationship Between Abnormal Differentiation of  
Gastrointestinal Tract Epithelial Cells and Cancers:  
How are TGF- $\beta$ /Wnt Signaling  
and RUNX3 Involved in Digestive Cancers?

Chouhei Sakakura and Eigo Otsuji

Department of Digestive Surgery,  
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

発癌とは、組織幹細胞が前駆細胞を経て分化するいずれかの段階で遺伝子レベルでの変化が加わることに  
により、悪性形質を獲得する現象である。しかし消化器癌におけるその詳細は未だ明らかではない。  
RUNX3 は TGF- $\beta$ /Wnt シグナル伝達系の構成因子の一つであり、胃癌の新しい癌抑制遺伝子として注  
目されている転写因子である。RUNX3 は染色体の 1p36 にコードされ、tumor suppressor pathway と呼  
ばれる TGF- $\beta$  シグナル伝達系の下流で転写因子として機能し、細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導  
する。また胃上皮細胞の正常分化にも必須な因子であり、約 65% の胃癌臨床検体において RUNX3 の不  
活化が高頻度のコピー数減少、主にメチル化による発現低下、機能喪失型変異などで生じている。また  
最近、RUNX3 遺伝子の発現減弱が、細胞不死化や上皮-間葉移行に重要であることが明らかとなった。  
RUNX3 発現低下の癌化への関与は胃癌だけでなく、大腸癌、肺癌、肝細胞癌、食道癌、膵癌、膀胱癌、  
胆管癌などの悪性腫瘍で報告されている。今後、RUNX3 の異常を指標とした診断や発現誘導による癌  
治療や予防に応用されるものと考えられる。RUNX3 の幹細胞性 (ステムネス) 防御への関与や Wnt シ  
グナル伝達系と Runx シグナル伝達系の関連も報告されており、今後更なる研究進展が期待される。

キーワード：RUNX3, 胃癌, TGF- $\beta$ /Wnt シグナリング, EMT (上皮間葉移行)。

Abstract

Carcinogenesis is induced by several genetic changes on tissue stem cell, however, their details in

平成25年 5 月 8 日受付

\*連絡先 阪倉長平 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地  
sakakura@koto.kpu-m.ac.jp

digestive cancers are still unclear. Transcription factor RUNX3 is one of the configuration factors of TGF- $\beta$ /Wnt signaling pathway, is focused as a novel tumor suppressor of gastric cancers. RUNX3 also controls cell growth and apoptosis, and plays as a tumor suppressor in the gastric cancers as well as many types of cancers, such as colorectal cancers, hepatocellular carcinomas, and pancreas cancers and so on.

RUNX3, encoded on 1p36, functions as a transcription factor downstream from a TGF- $\beta$  signal transfer system called tumor suppressor pathway, controls cell growth and differentiation of gastric epithelial cells, it is an indispensable factor for normal differentiation of gastric epithelium and the inactivation of RUNX3 has been observed in about 65% of gastric cancers, mainly through promoter hypermethylation.

Recently, we have reported that the loss of Runx3 in gastric epithelial cells results in spontaneous epithelial-mesenchymal transition (EMT), leading carcinogenesis and induction of cancer stem cells. These data demonstrate a protective role for RUNX3 in safeguarding gastric epithelial cells against aberrant growth factor signaling and the resultant cellular plasticity and stemness.

It is thought that it would be applicable for the cancer diagnosis and treatment by the monitoring the abnormalities of RUNX3 and induction of RUNX3 expression in the near future.

**Key Words:** RUNX3, Gastric cancer, TGF- $\beta$ /Wnt signaling, EMT (epithelial mesenchymal transition).

## はじめに

個体発生の過程を制御するシグナル伝達系として、これまでにWnt, Receptor tyrosine kinase, TGF- $\beta$ /BMPなどが知られ、それぞれの系で詳細な解析が進んでいるが、これらの伝達系は独立したものではなく複雑なネットワークを形成して制御されている。このうちTGF- $\beta$ シグナル伝達系は、しばしばtumor suppressor pathwayと呼ばれ、このシグナル伝達系における構成因子の異常が、消化器癌をはじめとする様々な癌の発症に関与することが報告されている<sup>1-3</sup> (図1)。TGF- $\beta$ スーパーファミリーの因子はserine/threonine kinase receptorに結合し、細胞内のSmadを介してシグナルを伝達することが知られているが、Hanaiらは3種類のRUNX遺伝子ファミリーがそれぞれ、リガンド刺激を受けたレセプターによって活性化されるR-Smad (receptor-regulated Smad)に結合することを報告した<sup>4</sup>。RUNX3はTGF- $\beta$ 刺激に応じてSmad2, 3と結合し、さらにSmad4と転写因子複合体を形成し、特異的な遺伝子発現をつかさどるとされている。さらにRUNX3-TGF- $\beta$ シグナル伝達系の役割が以下に示すRUNX3ノックアウトマウスの解析結果より明らかになった。

RUNX3は近年、胃癌の新しい癌抑制遺伝子

として注目されている転写因子である。これまで胃癌関連遺伝子に関してさまざまな遺伝子の解析が行われてきたがその異常の頻度は低く、別の原因遺伝子の存在が推測されていた。Itoらは、世界に先駆けてRunx3ノックアウトマウスを作製し、その解析よりRUNX3遺伝子が胃粘膜の発生や分化に重要な役割をはたしており、この異常が胃粘膜の脱分化や異常増殖や癌化に関連することを示した。さらに胃癌細胞株及び臨床検体におけるRUNX3の高頻度のコピー数減少、主にメチル化による発現低下、機能喪失型変異を確認しており、RUNX3が胃癌の新規癌抑制遺伝子であることを報告した<sup>5</sup>。RUNX3はSmad2, 3と結合して複合体を形成し、TGF- $\beta$ 依存性アポトーシスに重要な役割を果たしている<sup>2</sup>。さらに胃癌のみならず、食道癌、肝細胞癌、膵臓癌、胆管癌、大腸癌など様々な消化器癌における関与がTGF- $\beta$ シグナル伝達系との関連を通して明らかとなりつつある<sup>5-15</sup>。

Wntシグナル伝達系はショウジョウバエからヒトに至るまで広く保存されており、形態形成をはじめとした様々な生命現象に重要な役割を果たしている。最近になって分子レベルでの研究が急速に進展し、Wntが受容体に結合すると $\beta$ -cateninが安定化して核に移動し、標的遺伝

# TGF-β/RUNX3シグナル伝達系の異常と癌

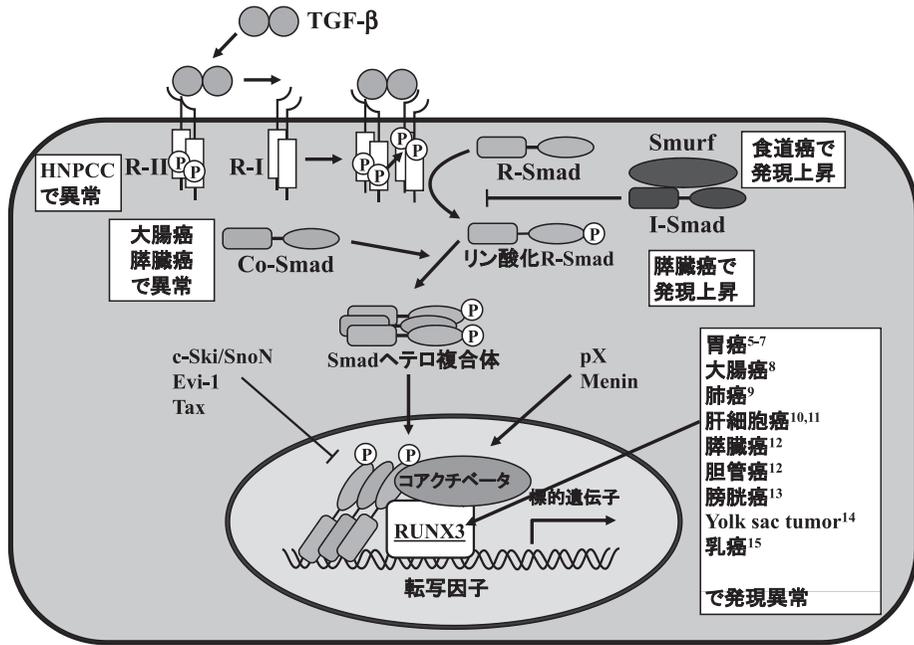


図1 TGF-β/RUNX3シグナル伝達系の異常と癌

Tumor suppressor pathway と呼ばれる TGF-βシグナル伝達系の構成因子の遺伝子異常が、消化器癌をはじめとする様々な癌に関与する。それぞれ異常の報告されている分子と癌種を示す。RUNX3は、その下流で転写複合体を形成して機能する癌抑制遺伝子である。

子の転写活性化を引き起こす分子機構の詳細が明らかになってきた。同時に大腸癌の癌抑制遺伝子として有名な APC が β-catenin の分解を誘導することにより Wntシグナル系を負に制御する活性を持つことや β-catenin が大腸癌、乳癌、皮膚癌、肝臓癌など様々な腫瘍で変異を起こして活性化していることも明らかになってきた。このように Wntシグナル伝達経路の制御異常はヒト腫瘍発生の重要な原因の一つと考えられている。Wntシグナル伝達系の活性化は大腸癌をはじめ様々な癌に見られる現象であり、そのメカニズムの一つとして APC 変異による β-catenin 蛋白の安定化がよく知られている。最近になって TGF-β/Wntシグナリングが Runx3 や TCF4 を介して interaction していることが明らかとなった。

本稿では、これまで明らかとなった各種消化

器癌における RUNX3 の異常を概説し、TGF-β/Wntシグナリングと RUNX3 の消化器癌への関与、RUNX3 ノックアウトマウスを用いた胃癌発癌モデル、さらに上皮間葉移行 (EMT) と癌化との関連について概説する。

## TGF-β-Smadシグナル伝達系の機構と消化器癌における異常

TGF-βは元来、軟寒天培地中で正常な繊維芽細胞の増殖を促進する物質として同定され、細胞の形質転換因子と命名された。しかしその後の研究で TGF-βは多くの細胞、特に上皮性の細胞の増殖抑制することが明らかとなり、細胞増殖抑制因子として注目を浴びた。さらに大腸癌や膵臓癌を含む種々の癌で TGF-βのレセプターや細胞内シグナル伝達因子 Smad の異常が報告され、TGF-βのシグナル伝達分子の癌抑制

遺伝子としての働きが明らかとなった。しかし一方では TGF- $\beta$  は細胞外マトリックスの産生や血管新生などの作用を持つことから、*in vivo* では癌化や癌転移を促進する物質として注目されている<sup>16-18</sup>。

TGF- $\beta$  によって活性化した TGF $\beta$ RI のセリンスレオニンキナーゼは Smad 2, 3 と結合し、その C 端にある Ser-Ser-X-Ser モチーフを特異的にリン酸化する。するとリン酸化 Smad 2, 3 が Smad 4 とヘテロ三量体を形成し、細胞質から核内へと移行する。この Smad 複合体は核内で Runx などのさまざまな転写因子、p300, CREB 結合タンパク質などの転写コアクチベーター、c-Ski, SnoN などの転写コリプレッサーなどと結合して最終的に標的遺伝子の転写を調節するのである (図 1)。

TGF- $\beta$  は上皮系や血球系の細胞において強力な増殖抑制因子として働く。ところが TGF- $\beta$  のシグナル伝達系の構成分子に何らかの異常が生じ、シグナルが正常に伝達されなくなると、細胞は増殖抑制をまぬがれることになり、それが癌化に関与しているのではないかと考えられている。実際に臨床的もしくは実験的に種々の癌においてこのシグナル伝達系の様々な異常が報告されており、したがってこれらの分子をコードする遺伝子はがん抑制遺伝子と考えられている。これまでに報告されている TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系分子の様々な異常が報告されている。詳細は他稿に譲るが、代表的なものとしては、

- (1) TGF- $\beta$ II 型受容体 (T $\beta$ RII) の異常
- (2) Smad 4 の異常 (欠失や変異)
- (3) 他の Smad ファミリーの異常

などがあげられる<sup>19-23</sup>。

消化器癌の大部分は TGF- $\beta$  に不応性であり、TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系分子のいずれかに異常を有するものと考えられる。しかし、上記の如く、従来の TGF- $\beta$ -Smad のシグナル伝達系構成分子の異常はすべてを説明しうるほど高い頻度ではなく、他の関連分子の異常が予想されていた。そこで TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系分子のひとつである RUNX3 の異常が注目され

ている。

## 消化器癌における RUNX3 の異常

### 1. RUNX 遺伝子ファミリーとは

Runx 遺伝子ファミリー (Runx1, Runx2, Runx3) は、遺伝子発現調節をつかさどる転写因子として機能することが知られており、ショウジョウバエの体節形成に重要とされる segmentation gene RUNT と高いホモロジーを有しており、ショウジョウバエからヒトまで進化の過程で高度に保存されてきた遺伝子群である。急性骨髄性白血病 FAB-M2 亜群における 8;21 転座の切断点からクローニングされた Runx1 遺伝子は、この遺伝子ファミリーの一つであり、ノックアウトマウスの解析結果から血球分化に極めて重要な役割をはたしており、現在ではヒト急性白血病に関連する最も頻度の高い標的であることが明らかにされている<sup>23</sup>。また Runx2 遺伝子はノックアウトマウスの解析結果から骨形成に重要な役割をはたしており、ヒトの常染色体優性の骨疾患で鎖骨頭蓋異形成症 (cleinocranial dysplasia: CCD) の原因遺伝子であると考えられている<sup>24</sup>。このように RUNX 遺伝子ファミリーは、ヒトの疾患に深く関わる重要な遺伝子群であることが明らかとなってきている。残る RUNX3 の生理機能および発現様式については、これまで不明であったが、Ito らの Runx3<sup>-/-</sup> マウスを用いた研究から、この遺伝子の胃上皮細胞の分化制御ならびに胃発癌における重要性が明らかとなってきた<sup>5</sup>。

### 2. TGF- $\beta$ シグナル伝達系と RUNX3

個体発生の過程でそれを制御するシグナル伝達系として現在、Wnt, Receptor tyrosine kinase, TGF- $\beta$ /BMP などが知られ、それぞれの系で詳細な解析が進んでいるが、これらの伝達系は独立したものではなく複雑なネットワークを形成して制御されている。これらの中で TGF- $\beta$  シグナル伝達系は、しばしば tumor suppressor pathway と呼ばれ、このシグナル伝達系における構成因子の異常が、消化器癌をはじめとする様々な癌の発症に関与することが報告されている<sup>16-18</sup> (図 1)。TGF- $\beta$  スーパーファミリーの因

子は serine/threonine kinase receptor に結合し、細胞内の Smad を介してシグナルを伝達することが知られているが、Hanai らは3種類の RUNX 遺伝子ファミリーがそれぞれ、リガンド刺激を受けたレセプターによって活性化される R-Smad (receptor-regulated Smad) に結合することを報告した<sup>4)</sup>。RUNX3 は TGF- $\beta$  刺激に応じて Smad2, 3 と結合し、さらに Smad4 と転写因子複合体を形成し、特異的な遺伝子発現をつかさどるとされている。さらに RUNX3-TGF- $\beta$  の役割が以下に示す RUNX3 ノックアウトマウスの解析結果より明らかになった。

### 3. 胃癌と RUNX3

#### 1) 胃癌における RUNX3 の異常

Ito らは世界に先駆けて Runx3 ノックアウトマウスを作製し、その解析より RUNX3 遺伝子が胃粘膜の発生や分化に重要な役割をはたしており、この異常が胃粘膜の脱分化や異常増殖に関連することを示した。TGF- $\beta$  は上皮細胞においてその増殖やアポトーシスを制御することが知られているが、Runx3<sup>-/-</sup> マウスの胃上皮細胞は、正常マウスの胃上皮細胞に見られるような TGF- $\beta$  による増殖抑制や TGF- $\beta$  によって誘導されるアポトーシスに対して耐性となることが報告された<sup>5)</sup>。

RUNX3 は胃癌の共通欠失領域の一つである 1p36 にマップされる。ノックアウトマウスでのデータと併せて、胃癌発生との関連が推測されたため、胃癌細胞株及び臨床検体の RUNX3 遺伝子のコピー数、発現異常の解析を行った。約 25% にコピー数の減少、約 65% に発現低下を認めた。さらに RUNX3 のプロモーター領域を同定し、塩基配列を調べたところ CpG アイランドが多数存在することが明らかとなった。そこで胃癌細胞株及び臨床検体で methylation specific PCR を行ってメチル化の有無を調べたところ、RUNX3 発現低下とプロモーター領域のメチル化に正の相関が認められた。これより発現低下の機序はプロモーター領域のメチル化による可能性が高いと考えられた。

癌細胞においてプロモーター領域のメチル化が遺伝子発現に関連し、癌抑制遺伝子の遺伝子

変異による不活化と同様の作用をもたらすことが注目されている<sup>25)</sup>。RUNX3 のプロモーター領域には CpG アイランドを多く有していることから、同部のメチル化の有無を methylation specific PCR (MSP) にて検索したところ、細胞株および臨床検体の RUNX3 の発現の有無は、すべてプロモーター領域のメチル化と相関していた。さらに、このメチル化によるサイレンシングは DNA メチル化酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などにより回復することが明らかとなった。胃癌において RUNX3 の変異はきわめてまれで、ほとんどがこのメチル化によるエピジェネティックな変化と考えられるため、サイレンシングを受けた RUNX3 を活性化すれば、変異のない遺伝子を発現させ、腫瘍抑制効果をもたらすことが期待できる。

これを裏付けるように、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理や RUNX3 遺伝子導入により胃癌細胞に細胞株で増殖抑制効果が認められ、ヌードマウスでの造腫瘍性が消失した。さらに胃癌臨床検体で同定された Runt ドメイン内の機能消失型変異 Arg122Cys (R122C) を胃癌細胞株に導入したところ増殖促進効果を認めた。以上の結果より RUNX3 遺伝子は、胃癌発生に重要な働きをしており、新しい胃癌の癌抑制遺伝子であると考えられた<sup>5)</sup>。

さらに Ito らは Runx3<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup> マウスからいくつかの腺胃上皮細胞株を樹立し、その造腫瘍性をヌードマウスアッセイで検討した。すると Runx3<sup>+/+</sup>, p53<sup>-/-</sup> 細胞からは全く腫瘍が形成されないのに対し、Runx3<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup> 細胞は典型的な腺癌を形成した。またこれに Runx3 を導入するとその造腫瘍性は著明に減少した。これらの結果は RUNX3 がヒト胃癌において癌抑制遺伝子として機能していることを動物実験レベルで強く示唆している<sup>26)</sup>。

また最近、RUNX3 遺伝子産物の細胞質内局在が、その機能喪失に重要であることが明らかとなった<sup>27)</sup>。転写因子としての機能は核内への局在が重要であることを示しており、これまで知られていた以上の高い頻度で RUNX3 の機能喪失が胃癌に関与していることが明らかとなっ

た。細胞質局在の原因に関しては現在解析が進みつつある。この他に前癌病変とされる腸上皮化生や腺腫での発現低下、発癌リスクが高いとされる残胃粘膜での RUNX3 発現低下が報告されている<sup>6)</sup>。

これらの研究結果は、これまで知られていた胃癌における TGF $\beta$  シグナル伝達系の異常や 1p36 領域の LOH 解析など、これまで個別に行われてきた研究結果を統合的に説明しうる。本研究の最も重要な点は、胃粘膜の発生や分化に関連する遺伝子の異常が胃粘膜上皮細胞の癌化に関連することを初めて示した点である。これらの研究結果は、胃癌の発生においてこれまでにない全く新しい概念を提示している。

## 2) 各種消化器癌における RUNX3 の異常

RUNX3 は、TGF $\beta$  シグナル伝達系の重要な分子の一つであり、TGF $\beta$  レセプターや Smad などの TGF $\beta$  シグナル伝達系の異常の認められる癌において、RUNX3 は癌抑制遺伝子として作用している可能性がある。近年、RUNX3 の発現低下による癌化への関与は、胃癌だけでなく大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胆管癌、食道癌、膀胱癌など多くの悪性腫瘍で報告されている。これらにおいては胃癌と同様のメチル化による発現低下が報告されている。またこれらの癌においては 1p36 領域の高頻度の欠失が知られている。たとえば、大腸癌では未分化癌、もしくは micrisatellite instability (+) の症例にて RUNX3 発現低下の頻度が高い。肝臓癌、膵臓癌で 90% 以上の発現低下が報告されている。我々も肝細胞癌における RUNX3 のメチル化に伴う発現低下を確認している。またこれらの癌において遺伝子変異の頻度は非常に低いが、膀胱癌で 1 例に RUNTdomain でのミスセンス変異が報告されている。各種消化器癌における RUNX3 の役割は未だ明らかではないが、胃癌における関与と同様の機序にて発癌、あるいは進展に関与しているものと考えられる。

## 3) RUNX3 の標的遺伝子群の解析

RUNX 遺伝子ファミリーは転写因子であり、様々な遺伝子の発現を転写レベルで調節していると考えられている。これまで RUNX ファミ

リーの標的遺伝子の解析が様々な組織でなされてきたが、RUNX1 が白血病の原因遺伝子として最初に単離され、次いで骨形成に必須の因子として RUNX2 が単離されたことより、多くの報告は血球系、リンパ系組織、もしくは骨組織においてである。これまでの血球系、骨組織における標的遺伝子の解析結果は文献 25 を参照されたい。

RUNX3 に関しては、最近我々は、これが細胞周期調節因子 p21、アポトーシス誘導因子 Bim、接着分子である claudin-1 を制御していること、またマイクロアレイ解析により癌転移に関連する各種遺伝子発現が変化すると知見を得ている<sup>7)29-30)</sup>。RUNX3 の標的遺伝子群の解析は未だ途中であるが、今後更に多くの標的遺伝子群が同定されると考えられる。またプロテオーム解析などにより RUNX3 転写複合体の解析が進むことにより、より詳細なシグナル伝達系の機構が解明されると考えられる。

## 4) Wnt シグナル伝達系と RUNX シグナル伝達系の相互作用

RUNX3 は胃上皮のみならず、小腸/大腸上皮でも強く発現している。胃上皮における RUNX3 の働きはある程度明らかになったが、腸上皮における機能は全く不明である。RUNX3 は線虫の消化管形成に重要な働きを果たすことが示されており、その機能は進化的に保存されている。消化管上皮の幹細胞の維持と癌化に Wnt/TCF4/ $\beta$ -catenin シグナル系の重要性が知られているが、我々は RUNX3/TGF $\beta$  シグナルがこの系を負に制御しているとの知見を得ている<sup>32)</sup>。よって RUNX3 が腸上皮細胞の増殖と分化の制御に何らかの役割を果たしている可能性は非常に高く、今後早急に胃癌同様の研究進展が期待される (図 2)。

## 5) Runx3 ノックアウトマウス胃上皮における前癌病変と発癌

C57BL6 マウスラインで作製した Runx3 ホモ欠失マウスは生後すぐに死亡するので、これまで生体マウスの胃における胃癌の発ガン過程を観察することができなかった。そこで BALB/c マウスラインでマウスを作製したところ生存期

## TGFβ/ Wntシグナル伝達系のinteraction

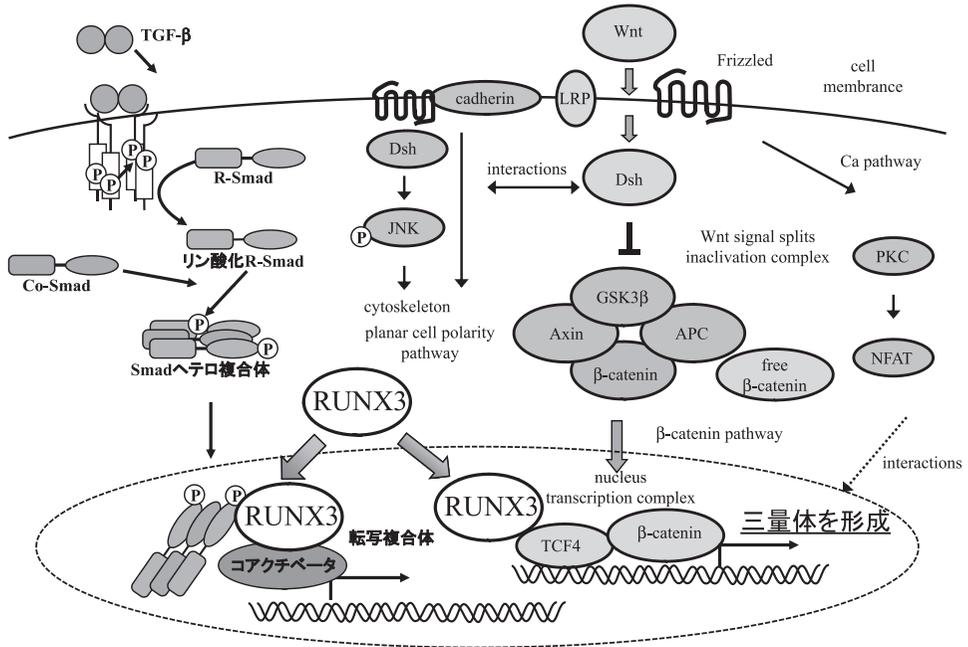


図2 TGF-β/Wnt シグナル伝達系の異常と癌  
 RUNX3 はそれぞれ Smad4/TCF4 や β-catenin/TCF4 と複合体を形成する。  
 このように Tumor suppressor pathway と呼ばれる TGF-β シグナル伝達系と Wnt シグナル伝達系は TCF4 を介して interact している。

間が1年まで延長して、その生体マウスの胃上皮での発癌過程を観察することが可能となった。

Runx3<sup>-/-</sup>マウスの胃を経過的に観察すると、主に胃上皮腺下部の変化が著明であった。6ヶ月を超えた個体に於いて SPEM (Spasmolytic Polypeptide/TFF2-Expressing Metaplasia) と呼ばれる特徴的な前がん病変が出現した。これはピロリ菌に感染した胃上皮や炎症を生じた胃上皮に特徴的に観察される病変である。しかし化学発癌剤である N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を低濃度で投与したところ、野生型マウスでは癌は発生しなかったが、Runx3<sup>-/-</sup>マウスでは腺底部の一部の細胞が癌化して粘膜筋板を超えて粘膜下層に浸潤した。さらにその浸潤性の胃癌から分化型腺癌および印環細胞癌が出現し、マウスの胃において忠実に再現することができた。これらの所見より、Runx3<sup>-/-</sup>マウスが貴重な胃

発癌モデルであると考えられた<sup>33)</sup> (図3)。

### 6) EMT (上皮間葉移行) と発癌

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) は1980年代初めに Elizabeth Hayらが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程、特に心臓や腎臓また口蓋形成での重要性がこれまでに明らかとなっている。一方、EMTの獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている<sup>34)</sup>。上皮細胞が、間葉細胞様に形質を変化させることによって、浸潤や転移を可能にするだけでなく、がん幹細胞発生を促すとされる。EMTには、①発生の過程、②がん化過程、そして③炎症に伴う上皮細胞の間葉系細胞への変換、すなわち線維芽細胞・筋線維芽細胞

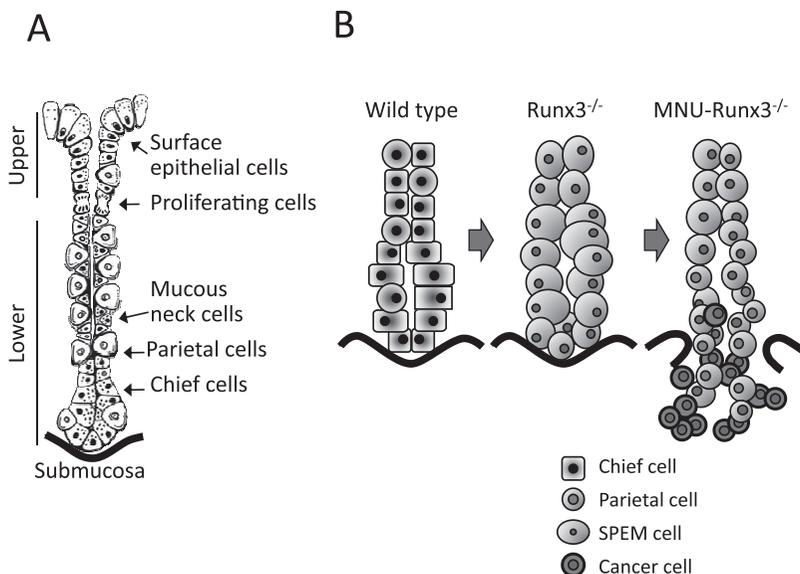


図3 Runx3<sup>-/-</sup> マウス胃上皮腺管における発癌

(A) 胃上皮の腺構造を示す。細胞増殖帯を境にして上部と下部に分けることができる。上部には主に表層粘液細胞が存在し、下部には壁細胞と主細胞と主細胞の前駆細胞とされる副細胞が存在する。RUNX3の発現はほとんどすべての胃上皮細胞で観察されるが、壁細胞において強く、主細胞において弱い。

(B) 化学発癌剤であるN-methyl-N-nitrosourea (MNU)を投与したところ、Runx3<sup>-/-</sup>マウスでは腺底部の一部の細胞が癌化して粘膜筋板を超えて粘膜下層に浸潤した(文献38の図を改変)。

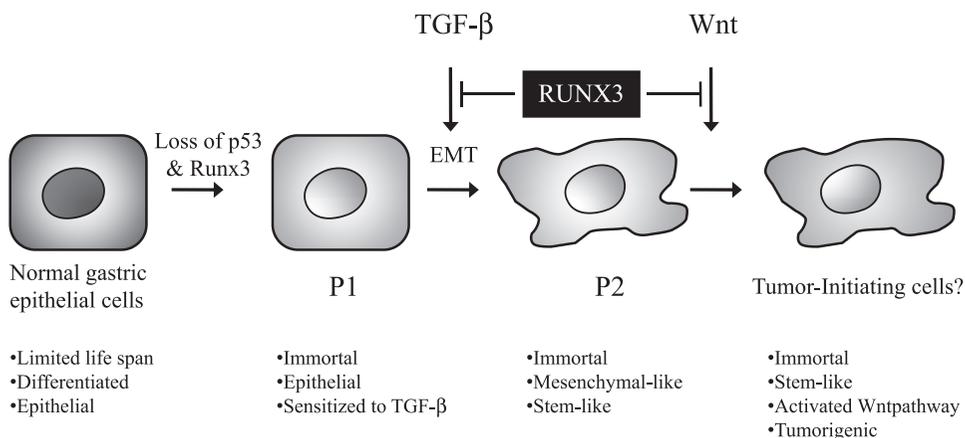


図4 胃上皮における EMT と腫瘍化に対する RUNX3 の防御機構の模式図

胃上皮細胞は初期に Runx3 と p53 の機能喪失により細胞の可塑性や TGF $\beta$  への感受性変化が生じる。さらに TGF $\beta$  シグナル伝達系や Wnt シグナル伝達系の異常により、細胞不死化や間葉系細胞への変化と幹細胞マーカー Lgr5 の発現上昇を生じて癌幹細胞様に変化すると考えられる(文献35の図を改変)。

への移行という3種類が存在するとされている。

これまでに我々は、Runx3<sup>-/-</sup> p53<sup>-/-</sup> 胃上皮から樹立されたGIF細胞が腫瘍形成することを報告した<sup>33)</sup>。さらに数種類の亜株を樹立して解析したところ、RUNX3がスフェアー形成と幹細胞マーカーであるLgr5の発現を強く抑制すること、さらにTGFβ誘導性のEMTを阻害することが明らかとなった<sup>35)</sup>。これより、RUNX3が胃上皮細胞の異常増殖シグナル、可塑性とがん幹細胞への移行を防御する作用が示唆された。これより推測される発癌モデルを図4に示す。

#### 7) 腸管上皮幹細胞の腫瘍化におけるTGFβ/Wnt/RUNX3シグナル伝達系の異常

Lgr5陽性腸管上皮幹細胞の幹細胞性維持にはTGFβ/Wntシグナルの活性化が必須であると考えられている<sup>36,37)</sup>。そしてこれら幹細胞維持因子はVogelsteinの提唱するAdenoma-Carcinoma Sequenceと相関しており、Wntシグナル下流のAPC、EGFシグナル下流のKras、SMAD4はいずれもこの経路における重要な癌遺伝子、癌抑制遺伝子である。こうした細胞外の増殖シグナルや分化シグナルの抑制が幹細胞の維持に必須である。腫瘍化した腸管上皮幹細胞は幹細胞維

持因子の下流シグナル、すなわちTGFβ/Wnt/RUNX3シグナル伝達系に異常が生じることにより、ニッチに依存せずとも自己複製する能力を獲得していると考えられる。消化器癌の癌幹細胞に関しては未だ不明の点が多いが、消化器癌の薬剤耐性や転移再発など、がん治療の障壁を克服するための重要課題として国内外の複数施設において精力的な研究がなされている。

### 今後の展望

RUNX3の発現低下による癌化への関与は、胃癌だけでなく、乳癌、大腸癌、肺癌、肝臓癌、食道癌、膵臓癌、膀胱癌など多くの組織で報告されている。今後、RUNX3がいかなるシグナルの制御を受けて胃粘膜の発生・分化・癌化に寄与しているかを明らかにすることで、RUNX3の異常を指標とした診断や発現誘導による癌治療や予防に応用されるものと考えられる。前述のようにRUNX3のEMTへの関与やWntシグナル伝達系とRunxシグナル伝達系の関連や幹細胞維持への関連も報告されており、今後更なる研究進展が期待される。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

### 文 献

- 1) Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234.
- 2) Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234.
- 3) Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- 4) Hanai J, Chen LF, Kanno T, et al. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. *J Biol Chem* 1999; 274: 31577-31582.
- 5) Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124.
- 6) Nakase Y, Sakakura C, Miyagawa K, Kin S, Fukuda K, Yanagisawa A, Koide K, Morofuji N, Hosokawa Y, Shimomura K, Katsura K, Hagiwara A, Yamagishi H, Ito K, Ito Y. Frequent loss of RUNX3 gene expression in remnant stomach cancer and adjacent mucosa with special reference to topography. *Br J Cancer* 2005; 92: 562-569.
- 7) Sakakura C, Hasegawa K, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Yazumi S, Yamagishi H, Okanoue T, Chiba T, Hagiwara A. Possible involvement of RUNX3 silencing in the peritoneal metastases of gastric cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6479-6488.
- 8) Goel A, Arnold CN, Tassone P, Chang DK, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer* 2004; 112: 754-759.

- 9) Li QL, Kim HR, Kim WJ, Choi JK, Lee YH, Kim HM, Li LS, Kim H, Chang J, Ito Y, Youl Lee K, Bae SC. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 223-228.
- 10) Miyagawa K\*, Sakakura C\*, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Shimomura K, Oue N, Yasui W, Hayasizaki H, Okazaki Y, Yamagishi H, Hagiwara A, Otsuji E. (\*These authors are equally contributed) Overexpression of Reg IV in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis. *Anticancer Res* 2008; 28: 1169-1179.
- 11) Xiao WH, Liu WW. Hemizygous deletion and hypermethylation of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 376-380.
- 12) Wada M, Yazumi S, Takaishi S, Hasegawa K, Sawada M, Tanaka H, Ida H, Sakakura C, Ito K, Ito Y, Chiba T. Frequent loss of RUNX3 gene expression in human bile duct and pancreatic cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 2401-2407.
- 13) Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 9347-9354.
- 14) Kato N, Tamura G, Fukase M, Shibuya H, Motoyama T. Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of infants. *Am J Pathol* 2003; 163: 387-391.
- 15) Chen LF. Tumor suppressor function of RUNX3 in breast cancer. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1470-1477.
- 16) Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234.
- 17) Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234.
- 18) Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- 19) Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338.
- 20) Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 2001; 187: 265-276.
- 21) Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996 Jan 19; 271: 350-353.
- 22) Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Truong P, Buchler MW, Falb D, Korc M. The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 1999; 18: 5363-5372.
- 23) Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84: 321-330.
- 24) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764.
- 25) Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-692.
- 26) Fukamachi H, Ito K. Growth regulation of gastric epithelial cells by Runx3. *Oncogene* 2004; 23: 4330-4335.
- 27) Ito K, Liu Q, Salto-Tellez M, Yano T, Tada K, Ida H, Huang C, Shah N, Inoue M, Rajnakova A, Hiong KC, Peh BK, Han HC, Ito T, Teh M, Yeoh KG, Ito Y. RUNX3, a novel tumor suppressor, is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization. *Cancer Res* 2005; 65: 7743-7750.
- 28) Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003; 89: 9-18.
- 29) Chi XZ, Yang JO, Lee KY, Ito K, Sakakura C, Li QL, Kim HR, Cha EJ, Lee YH, Kaneda A, Ushijima T, Kim WJ, Ito Y, Bae SC. RUNX3 suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p21 (WAF1/Cip1) expression in cooperation with transforming growth factor beta-activated SMAD. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 8097-8107.
- 30) Chang TL, Ito K, Ko TK, Liu Q, Salto-Tellez M, Yeoh KG, Fukamachi H, Ito Y. Claudin-1 Has Tumor Suppressive Activity and Is a Direct Target of RUNX3

- in Gastric Epithelial Cells. *Gastroenterology* 2009 Aug 23. [Epub ahead of print]
- 31) Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ida H, Yazumi S, Yamagishi H, Okanoue T, Chiba T, Ito K, Hagiwara A, Ito Y. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radio-resistance and poor prognosis. *Oncogene* 2007; 26: 5927-5938.
- 32) Ito K, Lim AC, Salto-Tellez M, Motoda L, Osato M, Chuang LS, Lee CW, Voon DC, Koo JK, Wang H, Fukamachi H, Ito Y. RUNX3 attenuates beta-catenin/T cell factors in intestinal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 14: 226-237.
- 33) Ito K, Chuang LS, Ito T, Chang TL, Fukamachi H, Salto-Tellez M, Ito Y. Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach. *Gastroenterology* 2011; 140: 1536-1546.
- 34) Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995; 154: 8-20.
- 35) Voon DC, Wang H, Koo JK, Nguyen TA, Hor YT, Chu YS, Ito K, Fukamachi H, Chan SL, Thiery JP, Ito Y. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity. *Stem Cells* 2012; 30: 2088-2099. doi: 10.1002/stem.1183.
- 36) Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, Yamaguchi TP, Stappenbeck TS. Wnt5a potentiates TGF- $\beta$  signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science* 2012; 338: 108-113.
- 37) Schuijers J, Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J* 2012; 31: 2685-2696.
- 38) 伊藤公成. 胃がん発がんにおけるがん抑制遺伝子 RUNX3 の働き. *生化学* 2012; 84: 278-282.

## 著者プロフィール



## 阪倉 長平 Chouhei Sakakura

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科消化器外科学・准教授

略 歴：昭和61年3月 京都府立医科大学医学部医学科卒業  
 平成4年4月 京都大学ウイルス研究所特別研究生（細胞制御部門）  
 平成6年3月 京都府立医科大学医学部医学科大学院卒業  
 平成6年8月 米国ワシントン大学病理学教室  
 米国NCI-日本学術振興会癌研究協力事業派遣研究員  
 平成8年1月 京都府立医科大学第一外科助手  
 平成18年4月 京都府立医科大学消化器外科講師  
 平成21年4月 京都府立医科大学消化器外科准教授  
 平成22年4月 社会保険神戸中央病院消化器外科部長  
 （京都府立医科大学特任教授 兼任）  
 平成25年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科消化器外科学准教授  
 （現在に至る）（同志社大学生命医科学部連携教授兼任）

専門領域：消化器外科学，内視鏡外科学，癌化学療法，分子生物学，再生医学，肥満外科

1. 新しい癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解明と診断・治療への応用
2. 直腸癌手術における神経再生デバイスを用いた膀胱機能・性機能・肛門機能温存術式の基礎的・臨床的研究（京都大学再生研との共同研究）
3. 腹腔鏡手術における安全で合理的な手術術式の確立などを行っています。

代表論文：1. Li QL\*, Ito K\*, Sakakura C\*, Fukamachi H\*, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itoharu S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y (These authors are equally contributed). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124.

2. Sakakura C, Yamaguchi-Iwai Y, Satake M, Bae SC, Takahashi A, Ogawa E, Hagiwara A, Takahashi T, Murakami A, Makino K, Ito Y Growth inhibition and induction of differentiation of t(8;21) acute myeloid leukemia cells by the DNA-binding domain of PEBP2 and the AML1/MTG8 (ETO)-specific antisense oligonucleotide. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11723-11727.

3. Sakakura C, Igarashi Y, Anand JK, Sadozai KK, Hakomori S. Plasmalopsychosine of human brain mimics the effect of nerve growth factor by activating its receptor kinase and mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. Induction of neurite outgrowth and prevention of apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 946-1952.

4. Sakakura C, Hasegawa K, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Yazumi S, Yamagishi H, Okanou T, Chiba T, Hagiwara A. Possible involvement of RUNX3 silencing in the peritoneal metastases of gastric cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6479-6488.

5. Hagiwara A, Takahashi T, Kojima O, Sawai K, Yamaguchi T, Yamane T, Taniguchi H, Kitamura K, Noguchi A, Seiki K, and Sakakura C. Prophylaxis with carbon-adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. *Lancet* 1992; 339(8794): 629-631.

6. Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ida H, Yazumi S, Yamagishi H, Okanou T, Chiba T, Ito K, Hagiwara A, Ito Y. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radioresistance and poor prognosis. *Oncogene* 2007; 26: 5927-5938.