

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19091

研究課題名（和文）ヘッジホッグ関連因子STILによる浸潤突起を介した膵臓癌浸潤機構の解明

研究課題名（英文）The role of STIL in invadopodia formation of pancreatic cancer

研究代表者

伊藤 秀明 (Ito, Hideaki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：90711276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は膵臓癌におけるSTIL (SCL/TAL1 interrupting locus)による浸潤突起形成分子機構の解明を目標として遂行した。膵臓癌培養細胞では、STILは形成初期の浸潤突起に集積しており、STILノックダウンにより浸潤突起が減少した。STILと浸潤突起形成関連因子との関連を解析したところ、STILはCortactinと複合体を形成しており、Cortactinのリン酸化を介して、浸潤突起のアクチン骨格形成に関与していると考えられた。本研究の成果は、STIL-Cortactinが膵臓癌浸潤治療の標的となり得ること及び病理診断へ応用できる可能性があることを示すものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌は、高度な浸潤能を伴う予後不良な癌種であるが、その浸潤能を生み出す分子メカニズムは殆ど明らかになっておらず、その解明が急務である。本研究では、ヘッジホッグ関連因子、中心小体複製関連因子であり膵臓癌で発現が上昇しているSTILが浸潤突起形成を介して膵臓癌浸潤に関与していることを示した。本研究により得られたSTIL-Cortactinが浸潤突起形成を介して膵臓癌浸潤に関与しているという知見は、STILが膵臓癌の新規治療標的になり得ることを示し、また病理組織上でのSTIL-Cortactinの検出が膵臓癌病理診断に応用できる可能性があることを示すものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Invadopodia are protrusions with the matrix-degrading capability. We found out that knockdown of STIL (SCL/TAL1 interrupting locus) reduced invadopodia formation. In this study, we investigated the function of STIL in invadopodia formation. In our results, STIL localized at the core of the early invadopodia. Knockdown of STIL decreased phosphorylated Cortactin (Y421) that is necessary for remodeling of invadopodial actin cores. In immunoprecipitation and proximity ligation assay, STIL formed complexes with Cortactin at invadopodia. In our results, STIL regulates invadopodia formation through phosphorylation of Cortactin.

研究分野：人体病理学

キーワード：STIL 浸潤突起 膵臓癌 浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は未だ難治性の癌であり予後は極めて不良である。特に膵臓癌の高度な浸潤能は、周囲臓器への高度な浸潤や転移を引き起こし、治療を困難なものにしている。すなわち、膵臓癌克服には、膵臓癌浸潤に対する治療法の開発が必要である。

膵臓癌をはじめとする悪性腫瘍細胞では浸潤突起 (invadopodia) と呼ばれるアクチン骨格を持ち細胞外マトリックス分解能を有する構造体を形成する。しかし、その形成機構の全容は未だ明らかになっていない。膵臓癌の浸潤に対する治療法の開発には、この浸潤突起形成のメカニズムを解明することが必要である。

## 2. 研究の目的

ヘッジホッグ関連因子、中心小体複製関連因子である STIL (SIL, SCL/TAL1 interrupting locus) は膵臓癌をはじめとする癌細胞で発現が上昇していることが知られている。我々は、STIL ノックダウン細胞では浸潤突起形成能が低下し、癌細胞の浸潤能が低下することを見出した。本研究では、STIL の浸潤突起形成機序を、分子生物学的手法を用いて明らかにし、STIL が膵臓癌の浸潤転移抑制の治療標的となり得ることを示すことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) STIL と浸潤突起関連因子の発現・局在解析

STIL ノックダウン細胞で gelatin invadopodia assay により浸潤突起形成能を評価し、これらの細胞で浸潤突起関連因子の細胞内局在が変化するかどうかを蛍光免疫染色により評価する。この実験により、STIL がこれら浸潤突起関連因子の細胞内局在に関係しているかどうか評価を行う。さらに PLA (proximity ligation assay) 法を用いて STIL や浸潤突起関連因子の複合体形成・複合体の局在を *in situ* で評価する。

### (2) STIL と浸潤突起関連因子の *in vitro* における結合性解析

STIL と浸潤突起関連因子のタグ付き蛋白質を作製し、免疫沈降法で STIL と浸潤突起関連因子の結合を生化学的に検証・確認する。

### (3) 病理組織切片における STIL と浸潤突起関連因子の発現・複合体局在解析

病理組織切片における STIL 及び浸潤突起関連因子の発現・複合体の局在を検討する。正常膵臓組織、前癌病変、膵管内乳頭粘液性腫瘍や膵癌 (浸潤性膵管癌等) 組織を蛍光免疫染色あるいは PLA 法により検討する。

## 4. 研究成果

### (1) STIL と浸潤突起関連因子の発現・局在解析

浸潤突起の形成過程における STIL の局在について検討するため、膵臓癌培養細胞 BXP3 細胞を用い、gelatin invadopodia assay と蛍光免疫染色を組み合わせて解析した。BXP3 細胞では、Phalloidin 陽性のアクチン線維を伴い、ゼラチン分解を認める浸潤突起部に STIL の集積を認めた (Figure 1. )。BXP3 細胞では播種後、約 4-6 時間後にゼラチン分解部が出現し始め、浸潤突起形成を確認できた。この時 STIL は、ほとんどの浸潤突起部に集積が見られた。播種後 8 時間以上を経過すると、ゼラチン分解部が明瞭になるが、この時期では、アクチン線維を伴わないゼラチン分解部位を認めた。これは、浸潤突起が退縮した部位と考えられる。さらにこの時期では、アクチン線維を認める浸潤突起部でも、STIL の集積は明らかではないものも見られた。以上の結果より、STIL は浸潤突起形成の初期段階に関与していると考えられる。



Figure 1. 浸潤突起部(Phalloidin陽性、ゼラチン分解部)におけるSTILの集積。

次に STIL をノックダウンした細胞とコントロール細胞で比較を行った。STIL をノックダウンすると浸潤突起が減少し、ゼラチン分解面積が著減した。さらに STIL ノックダウン細胞を詳細に観察するため、細胞骨格染色を行うと、浸潤突起形成部付近のアクチン線維が減少していた。この結果を受けて、既知の浸潤突起関連因子及びそのリン酸化物のうち、STIL ノックダウンにより増減するものを、細胞骨格関連因子中心に検索した。蛍光免疫染色により検索したところ、STIL ノックダウン膵臓癌培養細胞では、浸潤突起形成に関連するとされるリン酸化型 Cortactin (Y421) が減少することを見出した。そのため STIL ノックダウン細胞とコントロール細胞で、細胞溶解物を用いたウエスタンブロッティングを行い比較したところ、STIL ノックダウン細胞

でリン酸化型 Cortactin (Y421) の減少を認めた (Figure 2.)。検索した限りでは他の因子については、ウエスタンブロットティングでは STIL ノックダウンによる減少は明らかではなかった。本研究開始時には、Fascin と STIL の共局在が示唆される結果を得たため検討したが、STIL ノックダウンによる Fascin の発現量、リン酸化物の減少は明らかではなかった。

さらに、in situ で STIL と Cortactin の局在を明らかにするために、膵臓癌培養細胞を用いて、STIL と Cortactin 複合体の局在を PLA 法により検証した。その結果、STIL - Cortactin の結合を示すシグナルを、浸潤突起部 (Phalloidin 陽性でかつゼラチン分解部位) で確認した (Figure 3.)。

以上の結果より、STIL は浸潤突起部で Cortactin と複合体を形成、Cortactin の Y421 リン酸化に関与し、浸潤突起形成を制御していると予想された。

また、STIL は ARHGEF7 と結合能を有しており、ARHGEF7 を介して浸潤突起における MT1-MMP の局在制御を行い、細胞外マトリックス分解酵素群の分泌制御に関与している可能性があることも蛍光免疫染色により見出しており、今後より詳細なメカニズムの検討を続ける予定としている。

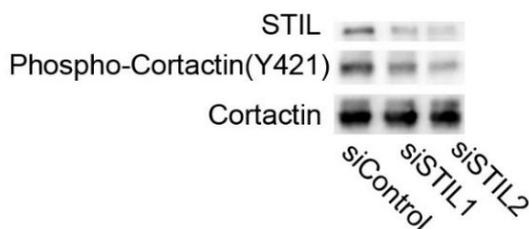


Figure 2.  
膵臓癌培養細胞における STIL ノックダウンによるリン酸化型 Cortactin (Y421) の減少。

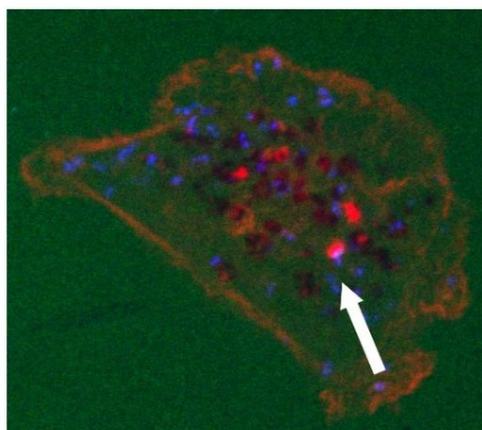


Figure 3.  
浸潤突起部に STIL-Cortactin 複合体形成を示すシグナル (青色) を認めた。(赤: Phalloidin, 緑: ゼラチン)

## (2) STIL と浸潤突起関連因子の in vitro における結合性解析

上記 (1) の実験の結果を受けて、STIL と結合するタンパク質を Cortactin 中心に検索した。STIL と Cortactin のタグ付きタンパク質 (STIL-FLAG、Cortactin-V5) を作製し、免疫沈降実験を行った。STIL-FLAG と Cortactin-V5 を共に HEK293T 細胞に強制発現し、タグに対する抗体を用いて免疫沈降実験を行った。その結果、STIL は Cortactin と共沈した (Figure 4.)。以上の結果より STIL は Cortactin と結合している可能性があると考えられる。更に、この STIL-Cortactin が、直接結合しているのか、あるいは他の因子が介在しているのか、それぞれのドメインを介し結合しているのかについて追加検討中である。

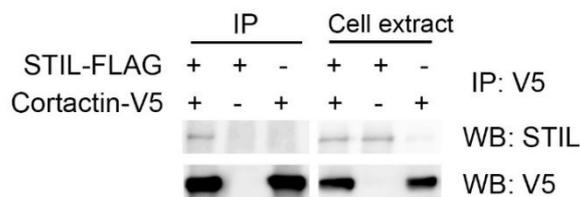


Figure 4.  
抗 V5 抗体を用いた免疫沈降実験にて STIL-Cortactin の共沈を認めた。

## (3) 病理組織切片における STIL と浸潤突起関連因子の発現・複合体局在解析

膵管内乳頭粘液性腫瘍や浸潤性膵管癌の病理組織切片上で、STIL-Cortactin あるいは STIL と他の浸潤突起関連因子との複合体の局在について非腫瘍部、非浸潤部、浸潤部で比較するため、PLA 法の施行を検討した。特に STIL-Cortactin 複合体の存在を示すシグナル検出を試みた。培養細胞では安定して確認することができたが、パラフィン包埋切片では、安定してシグナルを得ることが難しく、今後より安定した染色条件を検討し、症例解析を行う予定としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hideaki Ito, Takumi Tsunoda, Miho Riku, Shingo Inaguma, Akihito Inoko, Hideki Murakami, Hiroshi Ikeda, Michiyuki Matsuda, Kenji Kasai | 4. 巻<br>39              |
| 2. 論文標題<br>Indispensable role of STIL in the regulation of cancer cell motility through the lamellipodial accumulation of ARHGEF7-PAK1 complex. | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncogene  | 6. 最初と最後の頁<br>1931-1943 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41388-019-1115-9.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>伊藤 秀明, 古屋 智子, 池本 健三, 佐々木 功典, 小賀 厚徳                  | 4. 巻<br>29          |
| 2. 論文標題<br>イメージサイトメトリーによる染色体倍加細胞検出および増殖能の評価                   | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>CYTOMETRY RESEARCH                                  | 6. 最初と最後の頁<br>29-34 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.18947/cytometryresearch.29.2_29 | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                         | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明 稲熊真悟 角田拓実 陸美穂 村上秀樹 松田道行 笠井謙次                   |
| 2. 発表標題<br>STIL (SCL/TAL1 interrupting locus) の膵臓癌細胞遊走における機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明, 古屋智子, 小賀厚徳, 笠井謙次, 佐々木功典 |
| 2. 発表標題<br>細胞周期・DNA ploidy解析とイメージサイトメトリー |
| 3. 学会等名<br>第28回日本サイトメトリー学会学術集会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明, 稲熊真悟, 角田拓実, 村上秀樹, 池田洋, 笠井謙次                 |
| 2. 発表標題<br>STIL(SCL/TAL1 interrupting locus)の膵臓癌細胞遊走における機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第36回ヒト細胞学会学術集会                                    |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明, 稲熊真悟, 角田拓実, 村上秀樹, 池田洋, 笠井謙次                     |
| 2. 発表標題<br>STIL(SCL/TAL1 interrupting locus)の膵臓癌細胞遊走時先進部における機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本病理学会秋期特別総会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明, 稲熊真悟, 角田拓実, 池田洋, 笠井謙次                           |
| 2. 発表標題<br>膵臓癌細胞遊走におけるSTIL(SCL/TAL1 interrupting locus)の細胞骨格制御機構 |
| 3. 学会等名<br>第106回日本病理学会総会   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明, 稲熊真悟, 角田拓実, 池田洋, 笠井謙次                    |
| 2. 発表標題<br>細胞運動におけるSTIL(SCL/TAL1 interrupting locus)の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第27回日本サイトメトリー学会学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊藤秀明、角田拓実、陸美穂、池田洋、笠井謙次                           |
| 2. 発表標題<br>STIL(SCL/TAL1 interrupting locus)による膵臓癌細胞運動能制御機構 |
| 3. 学会等名<br>第105回日本病理学会総会                                    |
| 4. 発表年<br>2016年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 笠井 謙次<br><br>(Kenji Kasai)     |                       |    |
| 研究協力者 | 猪子 誠人<br><br>(Inoko Akihito)   |                       |    |
| 研究協力者 | 陸 美穂<br><br>(Riku Miho)        |                       |    |
| 研究協力者 | 稲熊 真悟<br><br>(Inaguma Shingo)  |                       |    |
| 研究協力者 | 村上 秀樹<br><br>(Murakami Hideki) |                       |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|           | 氏名<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-----------|----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究<br>協力者 | 松田 道行<br><br>(Matsuda Michiyuki) |                       |    |