

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08665

研究課題名(和文) 4インテグリンによる薬剤耐性機構の解明とその克服

研究課題名(英文) Molecular mechanism of chemoresistance induced by beta4 integrin and its overcoming

研究代表者

苅谷 慶喜 (Kariya, Yoshinobu)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00458217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では 4インテグリンというタンパク質ががんの抗がん薬耐性化に関わっていることを明らかにしました。4インテグリンをもつ癌細胞では、持たない細胞に比べて抗がん薬に対して耐性を示しました。そうした耐性には 4インテグリンの出すシグナルが関与していました。また、4インテグリンの量が増えている抗がん薬耐性のがん細胞では浸潤や腫瘍形成の能力が高まっていることがわかりました。これらの結果は 4インテグリンが抗がん薬耐性化を防ぐ薬を作る上で重要なタンパク質であることを示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは国民の2人に1人は一生のうちにかかるといわれており、長い間日本における死因第一位となっています。そうしたがんを克服するためには転移を抑えることに加え、抗がん薬の耐性化を防ぐことが重要です。本研究では 4インテグリンというタンパク質ががんの薬剤耐性化に関わっていることを明らかにしました。将来、4インテグリンを抑えるような薬を作ればがんの薬剤耐性を防ぐことが可能になるかもしれません。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that one of the protein, beta4 integrin, is associated with chemoresistance of cancer cells. The cancer cells expressing beta4 integrin showed more resistant against anti-cancer drug compared to the cancer cells without beta4 integrin expression. We also demonstrated that beta4 integrin signaling is participated in beta4 integrin-inducing anti-cancer drug resistance. Moreover, anti-cancer drug resistant cancer cells with high beta4 integrin expression promoted cancer cell invasion, and tumorigenesis. These results suggest that beta4 integrin is an important protein for preparing the drug against the cancer cells with chemoresistance.

研究分野：がん

キーワード：がん 接着分子 インテグリン 抗がん薬耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha 6\beta 4$  インテグリン (以下、 $\beta 4$  インテグリン) は膜貫通型の細胞表面受容体であり、そのリガンドとして細胞外マトリックスであるラミニン 332 が知られている。両者の結合はヘミデスモソームと呼ばれる皮膚の接着構造維持に重要である。そのため  $\beta 4$  インテグリンは接着構造の単なる構成因子と捉えられてきた。しかしながら近年、皮膚癌や乳癌を初めとする様々な癌における  $\beta 4$  インテグリンの過剰発現と患者の予後不良との相関性が多数報告されるようになった。申請者はこれまで、 $\beta 4$  インテグリンが癌細胞の浸潤・転移や増殖促進に寄与することを明らかにしてきた (Kariya ら, *Mini Rev Med Chem*, 2009)。 $\beta 4$  インテグリンはラミニン 332 や増殖因子受容体 EGFR、ErbB2、Met と相互作用することで、PI3K や ERK などの活性化を引き起こす。申請者はそれら  $\beta 4$  インテグリンシグナルの活性化が、細胞運動や増殖の促進、アポトーシス抑制を誘導することを明らかにした (Kariya ら, *ECR*, 2004; *JBC*, 2010)。 $\beta 4$  インテグリンの機能に關与する上記シグナルの活性化は、特異的 Tyr 残基のリン酸化や N 型糖鎖修飾といった  $\beta 4$  インテグリンの翻訳後修飾を介して制御される (Kariya ら, *PLoS One*, 2011)。

薬剤耐性の克服は、現在の癌治療における重要な課題になっている。しかしながら、癌の薬剤耐性の発症機序や治療ターゲットはいまだ不明な点が多く、その解明による新たな治療薬の開発が求められている。近年、PI3K や ERK シグナルの活性化が薬剤耐性に寄与している、との報告がなされている。 $\beta 4$  インテグリンはそれらシグナルを活性化するため、薬剤耐性に關与しているのではないかと、いう考えに至った。そこで申請者は、 $\beta 4$  インテグリン未発現の MDA-MB435S メラノーマ細胞に  $\beta 4$  インテグリンを強制発現させた際の薬剤耐性について調べた。その結果、 $\beta 4$  インテグリンの発現により、抗がん剤であるドキソルビシンや TRAIL に対する抵抗性が高まることを見いだした。この結果は、 $\beta 4$  インテグリンが癌の薬剤耐性に關与しており、治療標的分子になる可能性を示唆する。

最近、EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブへの治療抵抗性に  $\beta 4$  インテグリンの Tyr 残基リン酸化が關与していることが示唆された (Guo, *Cell*, 2006)。また、治療抵抗性や再発に深く関わるエクソソームの機能や microRNA (miRNA) の発現に、 $\beta 4$  インテグリンが關与しているとの報告がなされた (Gerson, *Biol Open*, 2012; Kawakami, *Int J Oncol*, 2015)。しかしながら、それらの結果は  $\beta 4$  インテグリンと薬剤耐性との相関関係を示すのみで、直接的な關与や分子メカニズムは明らかにしていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\beta 4$  インテグリンがどのようにして薬剤耐性を獲得するのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1)  $\beta 4$  インテグリンを発現していないメラノーマ細胞株 MDA-MB435S および膵癌細胞株 Panc-1 に野生型および接着欠損型、細胞内シグナルドメイン欠損型、糖鎖欠損型  $\beta 4$  インテグリン遺伝子を導入し、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリン発現細胞を樹立した。各細胞の  $\beta 4$  インテグリン発現はウェスタンブロットおよび FACS にて確認した。それら樹立した細胞における TRAIL およびドキソルビシンに対する薬剤抵抗性を調べた。
- (2) 膵癌細胞株 Panc-1 に対して抗がん薬であるドキソルビシン、パクリタキセル、ゲムシタピンを処理し薬剤耐性株を得た。樹立した細胞のインテグリン発現をウェスタンブロットおよび FACS を用いて調べた。
- (3) 2 種類の  $\beta 4$  インテグリン shRNA を用いて  $\beta 4$  KD ゲムシタピン耐性膵癌細胞株を樹立した。
- (4) ゲムシタピン耐性膵癌細胞株および  $\beta 4$  インテグリン KD ゲムシタピン耐性膵癌細胞株の細胞運動、浸潤、増殖、スフィア形成、腫瘍形成能を調べた。
- (5) ゲムシタピン耐性化に伴い  $\beta 4$  インテグリンが発現上昇するメカニズムを調べるために、ゲムシタピン耐性膵癌細胞株 Panc-1 にヒストンアセチルトランスフェラーゼの阻害剤である C646 を処理し、エピジェネティクスによる  $\beta 4$  インテグリン発現制御の可能性を調べた。

### 4. 研究成果

本研究は、 $\beta 4$  インテグリンによる癌細胞の薬剤耐性への影響を調べるために、以下の検討をおこなった。

- (1) 野生型および接着欠損型、細胞内シグナルドメイン欠損型、糖鎖欠損型  $\beta 4$  インテグリンを発現させた MDA-MB435S および Panc-1 を樹立した。 $\beta 4$  インテグリンの発現はウェスタンブロットおよび FACS により確認した。樹立した細胞の TRAIL およびドキソルビシンに対する薬剤抵抗性の解析より、 $\beta 4$  インテグリンのシグナルがそれら薬剤に

対する抵抗性を亢進することが明らかとなった。

- (2) 膵癌細胞株 Panc-1 に対して抗がん薬であるドキソルビシン、パクリタキセル、ゲムシタピンを処理し 6 ヶ月後に薬剤耐性株を得た。樹立した細胞の各種インテグリン発現をウェスタンブロットおよび FACS を用いて調べたところ、ゲムシタピン耐性株において  $\beta 4$  インテグリンの発現が亢進していることが明らかとなった。
- (3) 2 種類の  $\beta 4$  インテグリン shRNA を用いて  $\beta 4$  KD ゲムシタピン耐性膵癌細胞株を樹立した。shRNA による  $\beta 4$  インテグリンの発現減少はウェスタンブロットにより確認できた。
- (4) ゲムシタピン耐性膵癌細胞株および  $\beta 4$  インテグリン KD ゲムシタピン耐性膵癌株を用いた解析により、ゲムシタピン耐性化による細胞運動、浸潤、増殖、スフィア形成、腫瘍形成能の亢進に  $\beta 4$  インテグリン発現が関与することが明らかとなった。
- (5) ヒストンアセチルトランスフェラーゼの阻害剤 C646 を用いた解析より、ゲムシタピン耐性化に伴う  $\beta 4$  インテグリン発現亢進にはエピジェネティクスによる発現制御が関わっている可能性が明らかとなった。

これまでの癌細胞の薬剤耐性の研究は主に薬剤トランスポーターの発現に関するものが主であった。本研究では接着分子である  $\beta 4$  インテグリンによる薬剤耐性の分子メカニズムを初めて明らかにした。 $\beta 4$  インテグリンによる薬剤耐性シグナルについて今後さらに詳細に検討することで薬剤耐性を打破する治療薬の開発へと結びつけていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshinobu Kariya*, Midori Oyama, Yukiko Kariya, Yasuhiro Hashimoto (*corresponding author)	4. 巻 11
2. 論文標題 Phosphorylated osteopontin secreted from cancer cells induces cancer cell motility.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11091323.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yoshinobu Kariya*#, Midori Oyama#, Takato Suzuki, Yukiko Kariya (*corresponding author) (#equal contribution)	4. 巻 4
2. 論文標題 v 3 integrin induces partial EMT independent of TGF- signaling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02003-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yoshinobu Kariya*, Midori Oyama, Mikio Otsuka, Nobuyuki Kikuchi, Yasuhiro Hashimoto, Toshiyuki Yamamoto (*corresponding author)	4. 巻 66
2. 論文標題 Quantitative analysis of 1,6GlcNAc-branched N-glycans on 4 integrin in cutaneous squamous cell carcinoma tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fukushima Journal of Medical Science	6. 最初と最後の頁 119-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5387/fms.2020-12	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yukiko Kariya, Midori Oyama, Yasuhiro Hashimoto, Jianguo Gu, Yoshinobu Kariya* (*corresponding author)	4. 巻 16
2. 論文標題 4-Integrin/PI3K Signaling Promotes Tumor Progression through the Galectin-3/N-Glycan Complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1024 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-17-0365	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yukiko Kariya, Midori Oyama, Yasuhiro Hashimoto, Jianguo Gu, Yoshinobu Kariya* (*corresponding author)	4. 巻 16
2. 論文標題 N-glycosylation of 4-Integrin Promotes Tumor Progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yoshinobu Kariya*, Yukiko Kariya, Jianguo Gu* (*corresponding author)	4. 巻 9
2. 論文標題 Roles of Integrin 6 4 Glycosylation in Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 E79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers9070079.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 苅谷 慶喜
2. 発表標題 細胞接着分子による癌の悪性化機構の解明
3. 学会等名 令和元年度福島医学会学術奨励賞受賞記念講演 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 苅谷 慶喜, 苅谷 由貴子, 大山 翠, 橋本 康弘, 顧 建国, 大塚幹夫, 菊池信之, 山本俊幸
2. 発表標題 癌悪性化における 4インテグリン上N型糖鎖の役割
3. 学会等名 第14回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 苅谷 慶喜, 大山 翠
2. 発表標題 v 3 integrin induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) through TGF- $\beta$ -independent pathway.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 苅谷慶喜、大山翠、西田満、苅谷由貴子
2. 発表標題 リン酸化オステオポンチンによる癌細胞の浸潤・転移への影響
3. 学会等名 第7回マトリセルフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山翠、苅谷慶喜
2. 発表標題 インテグリン v 3は上皮・間葉転換を促進する
3. 学会等名 第6回マトリセルフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今野翠、苅谷慶喜、橋本康弘
2. 発表標題 インテグリン v 3は強力なEMT促進因子である
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshinobu Kariya
2. 発表標題 4 integrin Signaling through Glycosylation Promotes Tumor Progression
3. 学会等名 International Conference on Glycobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Midori Oyama, Yoshinobu Kariya
2. 発表標題 Integrin v 3 drives epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Midori Oyama, Yoshinobu Kariya, Yukiko Kariya, Kana Matsumoto, Mayumi Kanno, Yoshiki Yamaguchi, Yasuhiro Hashimoto
2. 発表標題 Effect of Site-specific O-glycosylation in Osteopontin on its Cell Adhesion Activity and Phosphorylation.
3. 学会等名 International Osteopontin Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshinobu Kariya, Midori Oyama, Yukiko Kariya, Kana Matsumoto, Mayumi Kanno, Yoshiki Yamaguchi, Yasuhiro Hashimoto
2. 発表標題 Contribution of O-glycosylation and phosphorylation in osteopontin to its functional activities.
3. 学会等名 International Osteopontin Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福島県立医科大学研究者データベース  
[http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1118\\_ja.html](http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1118_ja.html)  
癌の悪性化における糖鎖の役割を解明  
<https://www.fmu.ac.jp/univ/kenkyuseika/research/180615.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------