

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08696

研究課題名(和文) 癌微小環境におけるWnt関連蛋白LRRFIP1の発現調節と浸潤転移促進機構の解明

研究課題名(英文) The functional analysis of LRRFIP1 in cancer infiltration, metastasis, and chemoresistance.

研究代表者

大塚 英郎 (Ohtsuka, Hideo)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50451563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt signalのactivatorとして膵癌細胞の上皮間葉移行に機能するLRRFIP1の機能解析、特に抗癌剤の感受性、殺細胞効果への関与について検討を行なった。膵癌細胞のLRRFIP1の発現を抑制させることで、ゲムシタピン投与時のJNKのリン酸化が亢進、アポトーシスが強く促進され、感受性が増強した。LRRFIP1の発現が膵癌のゲムシタピン感受性に関与することを示した報告はなく、新たな知見が得られた。また、JNKのリン酸化亢進には、JNK/SAPKシグナルの活性化が深く関与していることが示され、上皮間葉移行による抗癌剤耐性獲得メカニズムとしても重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、膵癌細胞においてLRRFIP1の発現を抑制することによりゲムシタピン抗癌剤感受性が増強することを解明した。LRRFIP1発現抑制膵癌細胞ではJNK/SAPKシグナルの活性化が亢進していたことから、そのシグナルを制御することでゲムシタピン感受性に深く関与していると考えられた。LRRFIP1の発現、機能亢進はEMTの制御に深く関与することから、癌微小環境下におけるその発現量の変化が、抗癌剤感受性に影響している可能性が示唆される。癌微小環境下におけるLRRFIP1の発現制御、EMTの制御と抗癌剤感受性についてさらに詳細に解明することで、新たな分子標的治療開発など臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Wnt signal activator LRRFIP1 is important in regulation of EMT in pancreatic cancer cells. LRRFIP1 has been suggested to implicate in gemcitabine sensitivity by regulating EMT. In this project, we revealed LRRFIP1 silencing accelerates gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer cells. It was also revealed that gemcitabine-induced phosphorylation of JNK and c-Jun were increased in LRRFIP1 knockdown cells. The activation of JNK/c-Jun in LRRFIP1-knockdown cells was significantly diminished by the inhibition of Rac activity. It was confirmed that the acquisition of gemcitabine sensitivity by LRRFIP1 silencing largely depends on the stimulation of JNK/SAPK signaling. Our findings suggest that reversing EMT and transient activation of JNK might be essential for the gemcitabine sensitivity in LRRFIP1 knockdown pancreatic cancer cells. Our discoveries highlight the potential role of LRRFIP1 in the chemosensitivity related to the regulation of EMT signaling.

研究分野：消化器外科学

キーワード：LRRFIP1 膵癌 Wnt signal EMT gemcitabine JNK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

LRRFIP1/GCF2 (以下 LRRFIP1) は、actin 関連蛋白質 Flightless-1 の Leucine Rich Repeat (LRR) 領域に結合する蛋白質としてクローニングされた蛋白質であり、actin を中心とした細胞骨格の調節に関与することが示唆された (Fong, K.S. and H.G. de Couet, Genomics, 1999)。また、LRRFIP1 と同源性を有する LRRFIP2 は Wnt signal 系の Dishevelled との相互作用から Wnt の activator として機能し、胎生期体軸形成に関与することが報告された (Liu J et al, PNAS 2005)。申請者はこれまで、とくに癌細胞における LRRFIP1 の発現とその機能解析に従事、細胞骨格、運動調節機構に関して、以下のような興味深い知見が得られている。

- (1) LRRFIP1 は、癌の浸潤先進部 (invasion front) で高く発現し、その浸潤能に深く関与する。
- (2) LRRFIP1 は Dishevelled(Dvl) を介して Wnt signal の activator として機能する。
- (3) LRRFIP1 は、small-GTPase 蛋白 RhoA の活性化を介して細胞骨格調節に深く関与する。
- (4) LRRFIP1 は癌細胞の上皮間葉転換 (EMT) を強く促進する。
- (5) LRRFIP1 発現抑制膀胱癌細胞では、ゲムシタピン投与時のアポトーシス誘導が促進され、その薬剤感受性が増強する。

これらの知見より、LRRFIP1 の発現は、Wnt signal を介した癌細胞の上皮系から間葉系への形質転換に深く関与し、癌の移動・浸潤能の獲得にきわめて重要であることが明らかになるとともに、その形質転換は抗がん剤感受性にも深く関与し、その抑制は感受性を著明に亢進させることが示唆されている。

近年、乳癌細胞株と血管内皮細胞との共培養系で mRNA 発現をマイクロアレイにて検討したところ、癌細胞で LRRFIP1 mRNA 発現が著明に上昇することが報告された (Buess M, et al. Neoplasia 2009)。また、LRRFIP1 が血小板の血栓形成能に深く関与するとの報告 (Goodall AH, et al. Blood 2010) もあり、血管内皮あるいは細胞外基質との相互作用など癌微小環境において、LRRFIP1 が細胞接着能、骨格調節等の機能を有し、その形質転換を制御することで浸潤促進・転移形成能、あるいは抗がん剤感受性に深く関与することが示唆される。さらに LRRFIP1 遺伝子の癌組織における発現に関して、2006 年に Sjöblom らは乳癌および大腸癌で高率に変異を認める遺伝子として 189 の遺伝子を同定したが、GLRRFIP1 も Cancer associated gene の 1 つとして報告されている (Sjöblom T, et al. Science 2006)。前述のように LRRFIP1 は多くの消化器癌で高発現が認められており、癌細胞における LRRFIP1 の機能解析は重要な意味を持つものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、癌の微小環境下、細胞外基質との相互作用における LRRFIP1 の発現調節機構を解析し、その悪性化、特に浸潤・転移能への関与を解明するとともに、その Wnt を介した EMT 促進機構より、抗がん剤投与時の薬剤感受性メカニズムにどのように関与するか、明らかにすることを目的とする。

上述のように、SiRNA をもちいて LRRFIP1 の発現を低下させることで、癌細胞の上皮系への形質転換が起こり、細胞の移動・浸潤能が抑制される。また、その発現は癌微小環境下、周囲間質組織や血管内皮などとの相互作用の中で制御されていることが強く示唆されており、癌細胞の転移浸潤に、極めて重要な役割を果たしていることが予想される。これらの点について LRRFIP1 の機能を解析することは、癌の浸潤転移機の新たな解明へ結びつくきわめて重要な研究と考える。さらに、我々は、LRRFIP1 が抗がん剤の薬剤感受性に関与するという新たな知見について、その可能性を示唆するデータが得られている。LRRFIP1 はその発現を抑えることで、抗がん剤添加時のアポトーシスを誘導、その感受性を促進すること可能性があることから、そのシグナル伝達メカニズムの解明は、あたらしい癌の分子標的治療の標的となる可能性を秘めているとかんがえられる。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株における LRRFIP1 発現量及びゲムシタピン感受性

4 種類の膀胱癌細胞株 (PANC-1, MIA-PaCa2, AsPC-1, BxPC-3) を用いて、その LRRFIP1 発現量をウエスタンブロット法により半定量解析するとともに、それぞれの細胞株のゲムシタピン感受性を MTT アッセイにより解析した。

(2) LRRFIP1 発現抑制によるゲムシタピン感受性の変化の検証

LRRFIP1 発現量の多い細胞株で、SiRNA の手法により、その発現を抑制し、ゲムシタピン感受性の変化について検証する。ゲムシタピン感受性の変化は、細胞障害性試験 (MTT アッセイ) により生存細胞の変化を検証するとともに、カスパーゼアッセイにより、ゲムシタピン添加時に誘導されるアポトーシスの変化について検証する。

(3) ゲムシタピン添加時の JNK/SAPK signal 活性化における LRRFIP1 の関与に関する検証。

ゲムシタピン添加時のアポトーシス誘導における JNK/SAPK signal の活性化に LRRFIP1 がどのように関与するか、JNK 及び c-Jun のリン酸化を、リン酸化特異的抗体を用いて検証する。さらに、JNK/SAPK signal の初期段階で活性化する small GTPase、Rac の阻害薬を用いるこ

とで、その signal 伝達経路が JNK/SAPK signal であることを検証する。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株における LRRFIP1 発現量及びゲムシタピン感受性

ウェスタンブロット法を用い、4種類の膵癌細胞株 (PANC-1, MIA-PaCa2, AsPC-1, BxPC-3) の LRRFIP1 発現量を比較した。PANC-1 は最も LRRFIP1 発現量が高く BxPC-3 は最も発現量が低い細胞株であった。MIA-PaCa2 及び AsPC-1 の LRRFIP1 発現量は PANC-1 と BxPC-3 の中間程度であった。次いで各細胞株におけるゲムシタピン感受性を明らかにするために細胞障害性試験を行った。PANC-1 は 1000 μ M のゲムシタピンを投与しても 50%以上の細胞が生存しており、ゲムシタピン感受性が最も低い細胞株であった。一方、BxPC-3 は IC50 値が最も低値であり、ゲムシタピン感受性が最も高い細胞株であった。以上の結果より、これら 4種の膵癌細胞株において LRRFIP1 の発現量とゲムシタピン感受性との間に負の相関関係の存在が示唆された。

PANC-1 及び MIA-PaCa2 は間葉系マーカーであるビメンチンの発現量が高く、上皮系マーカーである E-カドヘリンの発現量が低い細胞株であることが文献的に示されており、特に PANC-1 では LRRFIP1 の発現抑制によって “Reverse EMT” を起こすことが以前の検討で明らかにされていることから、SiRNA による LRRFIP1 の発現抑制実験には、これらの 2種の細胞株を用いる方針とした。

(2) LRRFIP1 発現抑制によるゲムシタピン感受性の変化の検証

LRRFIP1 を発現抑制させた膵癌細胞において、ゲムシタピンによる細胞死の評価を行うべく、Propidium Iodide (PI)での展開により、生細胞と死細胞の割合を検討した。PANC-1 及び MIA-PaCa2 において、配列の異なる 2種類の LRRFIP1 特異的 SiRNA を用いて、LRRFIP1 を発現抑制させた。次いで、これらの細胞にゲムシタピンを投与し、フローサイトメーターを用いて生細胞及び死細胞の割合を検討した。PANC-1、MIA-PaCa2 共に LRRFIP1 発現抑制細胞で、PI 陽性の死細胞の割合が増加しており、膵癌細胞において LRRFIP1 の発現抑制がゲムシタピンによる細胞死をより多く誘導することが確認された。

LRRFIP1 の発現抑制によるゲムシタピン感受性の変化を比較するため、細胞障害性試験を行った。ゲムシタピン投与から 72 時間後、LRRFIP1 発現抑制細胞の IC50 値は、PANC-1, MIA-PaCa2 共にネガティブコントロールの細胞よりも低値となり、LRRFIP1 の発現抑制により PANC-1 のゲムシタピン感受性が上昇することが示唆された。

LRRFIP1 を発現抑制させた膵癌細胞において、ゲムシタピン投与によって誘導された細胞死がアポトーシスによるものであることを示すため、カスパーゼアッセイを行った。ゲムシタピン非投与細胞を基準とした際のゲムシタピン投与によるカスパーゼ活性の増加度は、LRRFIP1 を発現抑制させた PANC-1 ではネガティブコントロールと比較して約 2 倍、MIA-PaCa2 では約 1.4 倍と、いずれの細胞株においても有意に上昇していた。以上より、LRRFIP1 を発現抑制させた膵癌細胞ではゲムシタピン投与時にカスパーゼ活性が上昇しており、細胞死はアポトーシスが誘導されて起こることが明らかとなった。

(3) ゲムシタピン添加時の JNK/SAPK signal 活性化における LRRFIP1 の関与に関する検証。

LRRFIP1 の発現抑制が JNK/c-Jun 経路に及ぼす影響を明らかにするため、リン酸化 JNK 及び c-Jun を、特異的抗体を用いて評価した。LRRFIP1 を発現抑制させた細胞では、ゲムシタピン投与時に JNK 及び c-Jun のリン酸化がコントロールと比較し有意に亢進していた。ゲムシタピン投与の有無によって JNK 及び c-Jun の発現量に明らかな変化を認めなかったことから、LRRFIP1 の発現抑制によりゲムシタピン投与時の JNK/c-Jun 経路の活性化が亢進し、アポトーシスの誘導が促進されていると考えられた。JNK/c-Jun 経路の活性化が亢進していることを確認するため、その target となる Bim の発現量の変化について RT-qPCR を用いて検証した。Bim の増加度をコントロール細胞と比較したところ、LRRFIP1 発現抑制細胞で約 1.6~1.8 倍と有意に上昇していることが確認された。

さらに、ゲムシタピン添加時のアポトーシス誘導における LRRFIP1 の関与が、JNK/SAPK signal を介して行われていることを確認するため、JNK/SAPK signal の初期段階で機能する small GTPase Rac を阻害する実験を行った。LRRFIP1 発現抑制細胞にゲムシタピン及び Rac 阻害剤を投与したところ、JNK 及び c-Jun のリン酸化が、Rac 阻害薬の濃度依存性に抑制されることが示された。即ち、LRRFIP1 発現抑制によるゲムシタピン感受性獲得には JNK/SAPK シグナルが深く関与していることが示唆された。

本研究は、膵癌細胞の LRRFIP1 の発現を抑制させることでゲムシタピン投与時の JNK のリン酸化が亢進し、ゲムシタピン感受性が上昇することを示した。そのメカニズムとして、LRRFIP1 の発現抑制による JNK/SAPK シグナルの活性化亢進が重要であると考えられた。LRRFIP1 による JNK の機能制御が EMT とゲムシタピン感受性に深く関与していることが示唆され、EMT による薬剤耐性獲得メカニズムを解明する一助となることが期待される。また、LRRFIP1 が膵癌のゲムシタピン感受性に関与することを示した報告はなく、新規の知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kawasaki Shuhei, Ohtsuka Hideo, Sato Yoshihiro, Douchi Daisuke, Sato Masaki, Ariake Kyohei, Masuda Kunihiro, Fukase Koji, Mizuma Masamichi, Nakagawa Kei, Hayashi Hiroki, Morikawa Takanori, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Silencing of LRRFIP1 enhances the sensitivity of gemcitabine in pancreatic cancer cells by activating JNK/c-Jun signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 771 ~ 778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2021.02.018	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚英郎
2. 発表標題 膵癌細胞におけるWnt関連蛋白LRRFIP1によるEMT制御と、抗がん剤感受性メカニズムの解析
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	深瀬 耕二 (Koji Fukase) (00578677)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	元井 冬彦 (Fuyuhiko Motoi) (30343057)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

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
---------	---------