

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15078

研究課題名(和文) 子宮体部類内膜癌におけるMELF patternの分子メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) The molecular mechanism of MELF pattern invasion in endometrioid carcinoma

研究代表者

田原 紳一郎 (Tahara, Shinichiro)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20792584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SDPR (serum deprivation-response protein, cavin-2)は細胞内輸送やシグナル伝達に重要な働きをするcaveolaeを構成する分子の1つである。Crispr/Cas9システムを用いて子宮体部類内膜癌培養細胞株のSDPRをノックアウトし、類内膜癌におけるSDPRの役割を解析した。ノックアウト細胞ではALDH1発現及びILK signalingが低下しており、ILKの蛍光免疫染色では細胞内での分布の異常が見られた。以上より、子宮体部類内膜癌において、SDPRがILKのシグナル伝達を介してALDH発現を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、子宮体部類内膜癌培養細胞においてSDPRがILKのシグナル伝達を介してALDH発現を制御していることが示唆された。また病理組織標本を用いた免疫染色においてもSDPRはMELF patternを含む高い浸潤能と関連していた。SDPRはcaveolaeを媒介する多数のシグナルに関連していると考えられ、正常細胞への影響に伴う副作用という観点からは、SDPR自体を治療標的とすることは難しいが、ILKシグナルは治療標的として有望である。ILKシグナルの上流、下流に存在する因子を同定し、ALDH発現を制御することは、通常の治療に抵抗性の類内膜癌に対する新たな薬物の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Endometrioid carcinoma (EC) is one of the most common malignancies of the female genital system. We reported previously that aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is related to the tumorigenic potential of EC. We compared the levels of various proteins in human EC cells with high and low ALDH1 expression and found that serum deprivation-response protein (SDPR) was preferentially expressed in cells with high ALDH1 expression. Using SDPR knockout EC cells generated using the CRISPR/Cas9 system, we revealed that SDPR was correlated with invasion, migration, the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colony formation, as well as the expression of ALDH1. RNA-sequencing showed that integrin-linked kinase (ILK) signaling is involved in the effect of SDPR on ALDH1. Immunocytochemical analysis revealed that the localization of ILK at the cell cortex was disrupted by SDPR knockout, potentially interfering with ILK signaling.

研究分野：子宮体癌

キーワード：MELF SDPR ALDH1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮体部の類内膜癌の一部に浸潤性の高い MELF (microcystic, elongated, and fragmented) pattern を有するものが存在する。MELF pattern に関連するものを検索する過程で、これまで見出した S100A4 (Tahara et al., Cancer Sci. 2016; 107: 1345-52)に加え、SDPR (serum deprivation-response protein, cavin-2)も MELF pattern に関連していることが分かった。SDPR は細胞内輸送やシグナル伝達に重要な働きをする caveolae を構成する分子の1つである。

また以前我々は類内膜癌において、ALDH (aldehyde dehydrogenase)は未熟な癌細胞のマーカーであり、ALDH の発現の高い腫瘍は低い腫瘍に比較して、リンパ節転移や再発率が高く、予後不良因子であること、また類内膜癌培養細胞において、ALDH を高発現する癌細胞は造腫瘍能、浸潤能、抗癌剤耐性能が高いことを明らかにした。しかし類内膜癌培養細胞を ALDEFLUOR という試薬を用い、フローサイトメトリーで ALDH の発現が高い細胞群と低い細胞群に soating し培養したところ、高い細胞群の多くから低い細胞が、低い細胞群の一部から高い細胞が現れた。すなわち ALDH の発現の高い細胞と低い細胞の間には可塑性があることが分かった。また過去に類内膜癌培養細胞において ALDH のノックアウトを行ったことがあるが、期待するような変化は得られなかった。そのため治療標的としては ALDH そのものよりも ALDH を制御する上流の因子が望ましいと考えた。

そこで ALDH を高発現する細胞がどのようにして生み出されるかを調べるため、soating により得られた ALDH の発現が高い細胞群と低い細胞群でショットガンプロテオミクスを行い、ALDH を高発現する細胞に特徴的に発現するタンパクを検討した。S100A4 も SDPR もいずれも ALDH を高発現する細胞に特徴的に発現するタンパクであるが、類内膜癌培養細胞で Crispr/Cas9 システムを用いて S100A4 を消失させても ALDH の発現には変化が見られなかったのに対し、SDPR ノックアウト細胞では ALDH の発現の著明な低下が見られた。すなわち SDPR は ALDH の発現を直接制御するものと考えられた。

2. 研究の目的

類内膜癌において ALDH の発現を制御する SDPR の役割を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SDPR ノックアウト細胞の作製及び機能解析

各種類内膜癌培養細胞 (HEC-1B、HEC-108、HEC-116、SNG-M) のうち、HEC-1B と HEC-108 が SDPR の発現が高いことを immunoblotting で確認した。実際にこの2種の細胞を ALDH の発現が高い細胞群と低い細胞群に soating したところ、ALDH の発現が高い細胞群では SDPR の発現も高かった。そこで HEC-1B と HEC-108 で、市販の CRISPR-Cas9 ノックアウトプラスミドを使用し、抗生剤による選択を行い、安定細胞株を樹立した。作製した SDPR ノックアウト細胞とコントロール細胞で以下の項目に関して比較を行った。

①ALDH 発現：ALDEFLUOR による ALDH 酵素活性、及び ALDH1 抗体を用いた immunoblotting により ALDH の発現を比較した。

②細胞形態：光学顕微鏡による細胞形態の観察を行った。

③増殖能、運動能：細胞数の計測により増殖能を比較した。またディッシュを scratch することにより運動能を調べた (scratch assay)。

④浸潤能：Matrigel invasion chamber を用いてマトリゲル基底膜マトリックスに引っかかる細胞を計測し浸潤能を調べた。

⑤走化性：化学誘引物質である TGF- β 1 を使用し、F-actin の蛍光染色により lamellipodia の形成を比較した。

⑥幹細胞性：がん幹細胞増殖培地に細胞を撒き、形成された colony の数を計測した。

⑦上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)：Immunoblotting により EMT 関連タンパク (Vimentin, N-Cadherin, Claudin-1, β -Catenin, ZO-1, Snail, Slug, TCF8/ZEB1, E-Cadherin)の発現を見た。

(2) 類内膜癌の手術症例における免疫染色

当院で手術を施行した類内膜癌の 126 例の手術検体 (G1 54 例、G2 38 例、G3 34 例)において、SDPR の免疫染色を施行した。SDPR の陽性率と組織グレード、筋層浸潤、脈管侵襲、MELF pattern との関連を評価した。腫瘍細胞の細胞質及び細胞膜に染色性があるものを陽性と評価した。

(3) SDPR を介した、ALDH 発現に関与する ILK (integrin-linked kinase)シグナルの検討
HEC-108 の SDPR ノックアウト細胞とコントロール細胞で RNA sequence を行い、ingenuity pathway analysis (IPA)によるパスウェイ解析を行った。siRNA による ILK のノックダウン、及び ILK-inhibitor (OSU-315)の投与を行い、ALDH の発現の変化を見た。また SDPR ノックアウト細胞とコントロール細胞で ILK 抗体による細胞蛍光免疫染色を行い、細胞内における ILK の分布を検討した。

4. 研究成果

(1) SDPR ノックアウト細胞の作製及び機能解析

上述のように類内膜癌培養細胞 HEC-1B 及び HEC-108 の SDPR ノックアウト細胞を作製したところ、ALDH の発現の著明な低下が見られた (図 1)。SDPR ノックアウト細胞ではコロニー形成能、浸潤能の低下が見られたが、これは ALDH を高発現する細胞ではこれらの能力が高いことと一致した結果である (増殖能に変化は見られなかった)。その他にも SDPR ノックアウト細胞では遊走能の低下、lamellipodia の形成不全、EMT 関連タンパクである N-cadherin、vimentin、snail の発現の低下を認めた。細胞形態ではノックアウト細胞で円形の細胞が増加したが、これは EMT の低下を反映しているものと考えた。

(2) 類内膜癌の手術症例における免疫染色

類内膜癌の手術症例の免疫組織化学染色では、分化度の低い組織学的グレード G3 で陽性症例が有意に増加しており、分化度の高いグレード G1 ではその中で浸潤能が高く上皮間葉転換を示唆する MELF パターンを有する症例で陽性が有意に多かった (図 2)。またリンパ管侵襲の見られる症例でも陽性が多かった。これらは SDPR ノックアウト細胞の機能解析の結果を支持するものであった。

(3) SDPR を介した、ALDH 発現に関与する ILK (integrin-linked kinase)シグナルの検討

SDPR は caveolae の安定化に重要であることが報告されている。Caveolae は多くのシグナル伝達過程で重要な役割を果たす。SDPR が欠損することで caveolae が不安定化し、ALDH 発現を促進するシグナル伝達が阻害され、その結果 ALDH 発現が低下した可能性が考えられた。

そこでさらに ALDH 発現に関与するシグナルを検討する目的で、HEC-108 の SDPR ノックアウト細胞とコントロール細胞で RNA sequence を行い、IPA でパスウェイ解析を行った結果、SDPR ノックアウト細胞では ILK signaling が阻害されていることが示唆された。実際、ILK が制御しているとされる AKT のリン酸化がノックアウト細胞では低下していた。

また HEC-108 において、ILK のノックダウン及び ILK-inhibitor の投与のいずれにおいても、ALDH 陽性細胞は減少した (図 3)。この時、SDPR の発現は変化しなかった。ILK は細胞膜直下で機能することが知られているが、SDPR ノックアウト細胞では ILK の発現量は変わらないものの、ILK は細胞膜直下に存在できず細胞質にびまん性に存在していた (図 4)。このことより、SDPR は ILK のシグナル伝達を介して ALDH 発現を制御していることが示唆された。

図1. 類内膜癌培養細胞（HEC-1B, HEC-108）の SDPR ノックアウトによる ALDH 発現の変化

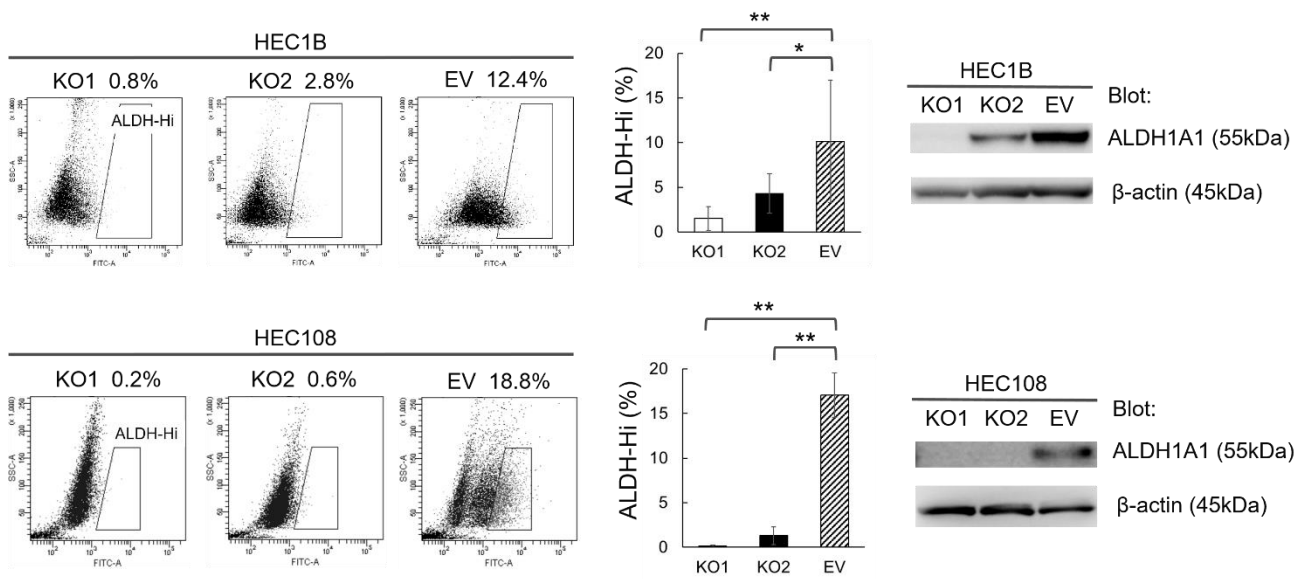


図2. 類内膜癌の手術症例における SDPR 免疫染色

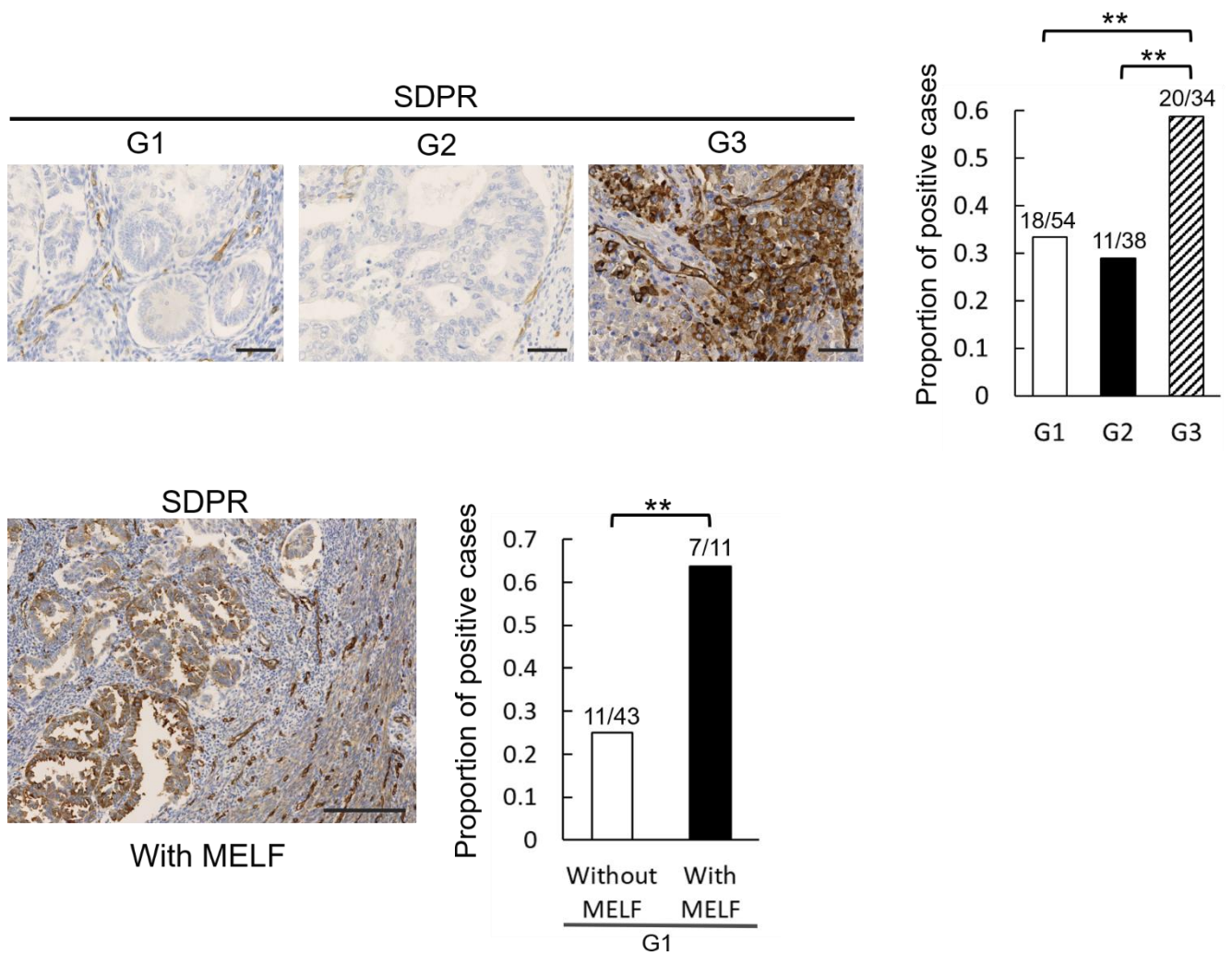
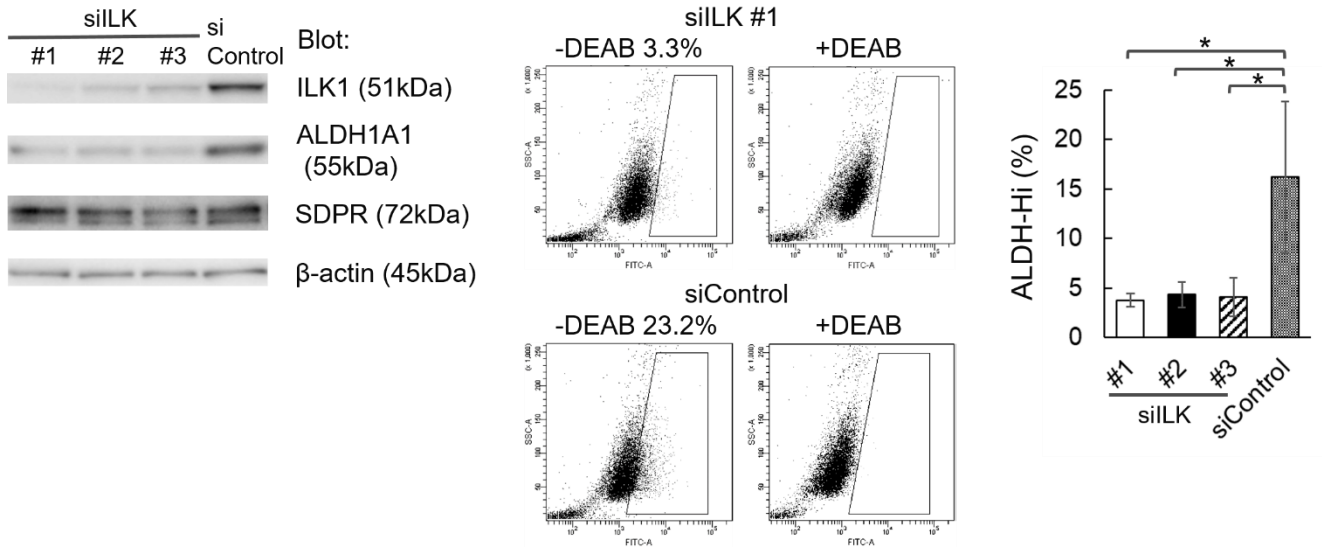


図3. ILK のノックダウン(A)及び ILK-inhibitor の投与(B)による ALDH 発現の変化

(A)



(B)

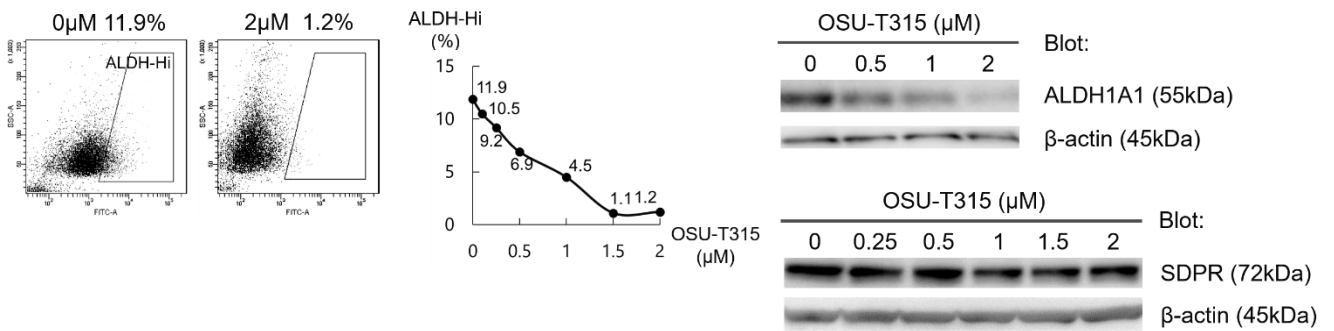
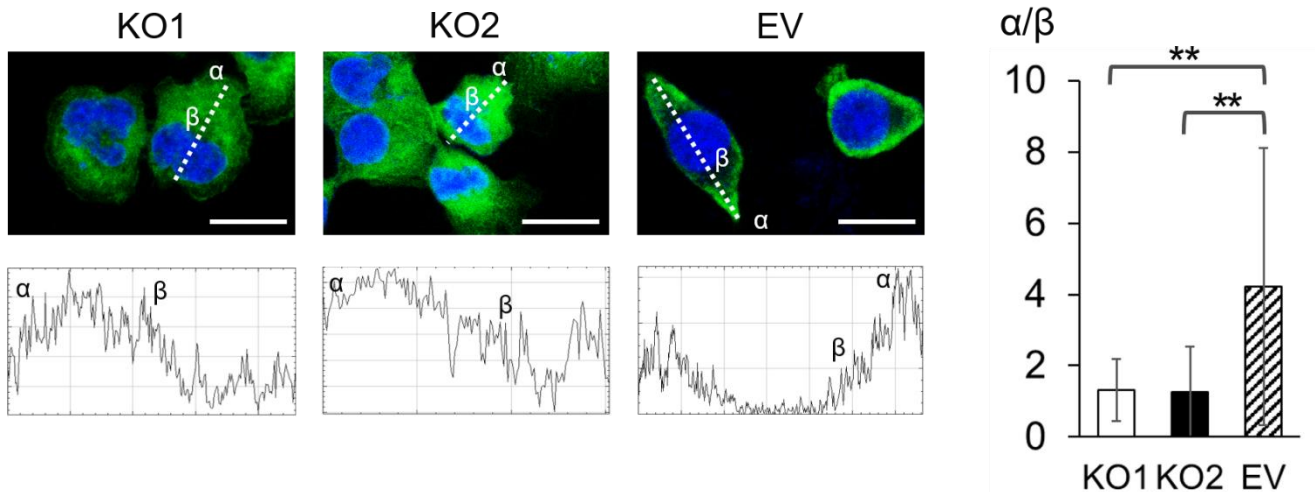


図4. SDPR ノックアウト細胞とコントロール細胞の細胞内における ILK の分布



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 Tahara Shinichiro, Nojima Satoshi, Ohshima Kenji, Hori Yumiko, Kurashige Masako, Wada Naoki, Motoyama Yuichi, Okuzaki Daisuke, Ikeda Jun ichiro, Morii Eiichi	4. 巻 110
2. 論文標題 Serum deprivation response protein regulates aldehyde dehydrogenase 1 through integrin linked kinase signaling in endometrioid carcinoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1804 ~ 1813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14007	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 Luo W*, Tahara S*, Kawasaki K, Kobayashi A, Nojima S, and Morii E *co-first author	4. 巻 -
2. 論文標題 The expression of trefoil factor 3 is related to histologic subtypes and invasiveness in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田原紳一郎
2. 発表標題 SDPRIは子宮体部類内膜癌の幹細胞性に関わり、上皮間葉転換を促進する
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田原紳一郎
2. 発表標題 SDPRIはILKを介して子宮体部類内膜癌の上皮間葉転換を促進する
3. 学会等名 第15回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田原紳一郎
2. 発表標題 HTR3Aは肺腺癌の予後不良な組織型と関連し、増殖を促進する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原紳一郎
2. 発表標題 SDPR regulates ALDH1 activity via ILK signaling in endometrioid carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020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