

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16550

研究課題名（和文）胆管癌におけるインテグリン α 6 の発現機序解明と治療応用への展開研究課題名（英文）Elucidation of expression mechanisms of integrin α 6 in cholangiocarcinoma and development to therapeutic application

研究代表者

副島 友莉恵 (Soejima, Yurie)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師（キャリアアップ）

研究者番号：60596964

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）：胆管癌細胞株HuCCT1を用いてCRISPR/Cas9システムによりITGB6ノックアウト（ko）細胞株を作製した。ITGB6-ko胆管癌細胞では移動能、浸潤能、遊走能、コロニー形成能の低下を示し、インテグリン α 6が胆管癌の治療標的および悪性度評価の指標として有用となる可能性を明らかにした。またRNA-seq解析によりITGB6-koにおける発現変動遺伝子を調べた結果、PODXL2で最も強い発現低下をみとめた。肝内胆管癌組織を用いたPODXL2免疫組織化学的解析では、発生部位、発育様式、漿膜浸潤、胆管浸潤などの臨床病理学的所見と関連およびインテグリン α 6の発現と相関を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト胆管癌細胞株を用いてインテグリン α 6遺伝子発現を抑制することにより、胆管癌の形態や発現形質、悪性度の性質変化を調べ、難治性で予後の悪い胆管癌の治療標的分子および悪性度評価の指標としての有用性を明らかにした。さらに、胆管癌におけるインテグリン α 6の発現機序を明らかにするため、インテグリン α 6の発現がみられる胆管癌細胞と発現を抑制した胆管癌細胞を用いて遺伝子発現解析を行い、インテグリン α 6の発現に関与する候補遺伝子を明らかにした。本研究により、インテグリン α 6を標的とした治療応用へと展開するための研究基盤を確立することができた。

研究成果の概要（英文）：ITGB6 knockout (ko) cell lines were generated by the CRISPR/Cas9 system using the cholangiocarcinoma (CCA) cell line HuCCT1. ITGB6-ko CCA cells showed reduced migration, invasion, and colony-forming ability, indicating that integrin α 6 is useful as a therapeutic target and marker of CCA malignancy. RNA-seq analysis of genes differentially expressed in ITGB6-ko revealed that PODXL2 is the most significantly downregulated gene. Immunohistochemical analysis of PODXL2 is associated with clinicopathological characteristics such as localization, growth type, serosa invasion, and bile duct invasion of intrahepatic CCA, and correlated with integrin α 6 expression.

研究分野：Pathology

キーワード：インテグリン α 6 胆管癌 CRISPR/Cas9 RNA-seq PODXL2

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は解剖学的に肝内胆管癌、肝門部胆管癌、肝外胆管癌に分類される。胆管癌は5年生存率10%以下と予後が悪く、治療法は外科的切除が第一選択であるが適応率は約30%である。近年、網羅的遺伝子解析により特徴的な遺伝子変異が明らかとなり、これらを標的とした治療の開発が試みられているが、同一腫瘍内でも不均一な性質を示すことが危惧され、新たな治療法が必要とされている。特に肝内胆管癌は部位や肉眼型により性質が異なり、組織学的形態や遺伝子・蛋白質発現の違いから、傍肝門部大型胆管から発生する癌と末梢小型胆管から発生する癌の2つの亜型に分類され、臨床病理学的所見や予後が異なることが報告された。また細胆管細胞癌(細胆管癌)は、肝内胆管癌と性質が異なるため本邦では独立した疾患として扱われているが、最近、胆管前駆細胞由来であることや(Moeini A et al. J Hepatol2017)、細胆管癌様部位を含む肝内胆管癌は予後が良く、免疫組織化学的に分類可能であることが示された(Rhee H et al. Liver Int 2018)。申請者はこれまでに、細胞接着分子インテグリン $\alpha v \beta 6$ ($\beta 6$)が、細胆管癌および肝細胞癌と比較して肝内胆管癌で明瞭に強い発現を示すことを明らかにした(Soejima Y et al. Hepatol Res 2014)。さらに肝内胆管癌ではインテグリン $\beta 6$ の発現が傍肝門部および胆管浸潤型で末梢部位および腫瘍形成型よりも強く、胆管侵襲やリンパ節転移とも関連し、肝内胆管癌の亜型分類と密接に関わることを明らかにした。

肝内胆管癌でインテグリン $\beta 6$ の発現は、傍肝門部大型胆管癌で末梢小型胆管癌よりも明瞭に強いことが明らかとなったが、その発現はどのような機序で制御されているのか、また肝門部胆管癌や肝外胆管癌での発現はどのような機序で制御されているのか、を学術的「問い」とする。さらにインテグリン $\beta 6$ の発現を抑制することにより、胆管癌の形態や性質が悪性度の低い末梢小型胆管癌様の性質へと変化し得るのかについても検証し、治療応用のための研究基盤の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、胆管癌におけるインテグリン $\beta 6$ の発現機序を明らかにするため、インテグリン $\beta 6$ の発現がみられる、またはみられない胆管癌株細胞を用いて遺伝子発現解析を行い、インテグリン $\beta 6$ の発現促進に関与する遺伝子を明らかにする。さらに、インテグリン $\beta 6$ 遺伝子発現を抑制することによる、胆管癌の形態や発現形質、悪性度の性質変化を調べ、胆管癌の治療標的分子としての有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ITGB6 ノックアウト細胞株の発現形質および悪性度の解析

ITGB6 高発現胆管癌株細胞 HuCCT1 を用い、CRISPR/Cas9 システムにより ITGB6 ノックアウト細胞株を作製する。その後、発現形質と悪性度(増殖能、浸潤能、移動能)を比較解析する。発現形質はインテグリン $\beta 6$ や肝内胆管癌の亜型分類に関わるマーカー(S100P、CD56)の発現変化を調べ、増殖能はMTTアッセイ、浸潤能はinvasionアッセイ、移動能は創傷治癒アッセイにより解析する。

(2) インテグリン $\beta 6$ 遺伝子発現制御因子の解明

ITGB6 高発現胆管癌株細胞 HuCCT1 と、ITGB6 低～非発現胆管癌株細胞 HuH28 を用いて遺伝子発現解析を行い、ITGB6の発現を制御する遺伝子を同定する。遺伝子発現解析はマイクロアレイ発現解析を用い、解析は群間比較解析、パスウェイ解析、Gene Ontology 解析、クラスタリング解析を行う。

4. 研究成果

(1) ITGB6 ノックアウト胆管癌細胞株の作製

HuCCT1 にgRNA(#1, #2, #3)と TrueCut Cas9 Protein v2 (Invitrogen) を Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 Transfection Reagent (Invitrogen) を用いて導入した。ゲノムDNA切断効率を Gene Art Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen) で調べ、最も切断効率の高かったgRNA #2を用いてトランスフェクションを行い、シングルセルクローニングを行った。シーケンス解析によりまずヘテロ接合変異が確認され、さらにこの細胞株を用いて再度トランスフェクションを行うと、2つのホモ接合変異(ITGB6-ko1, ITGB6-ko2)が得られた(図1)。これらの細胞株におけるインテグリン $\beta 6$ 蛋白質の発現は蛍光免疫染色とフローサイトメトリーにより、HuCCT1-wtと比較して明瞭な減衰がみられた(図2)。

HuCCT1	Sequence of target genes	Results	Amino acid
wt	(T)CCATGGATGACGACCTCAAC		SMDDDLN
ITGB6-ko1	(T)CCATGGATGACGACCTCAAC	+1	SIG (STOP)
ITGB6-ko2	(T)CCATGGATGACGACCTCAAC	+1	SIG (STOP)
	ATG-----ACCTCAACACAATAAAGG	-25	MTSTQ (STOP)

図1. ダイレクトシーケンス解析

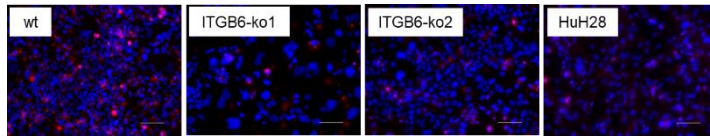
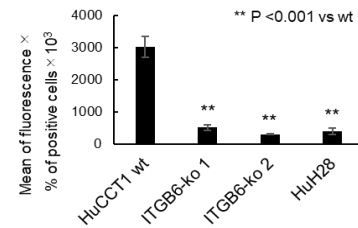


図2. 蛍光免疫染色とフローサイトメトリーによるインテグリンβ6蛋白質発現



(2) ITGB6 ノックアウトによる移動能、浸潤能、遊走能の低下

HuCCT1-wt と比較して ITGB6-ko1, ko2 では移動能、浸潤能が共に有意な低下をみとめた ($P < 0.001$) (図3)。遊走能は、ITGB6-ko1 では96時間後 ($P < 0.001$)、ITGB6-ko2 では48時間後に有意な低下がみられた。

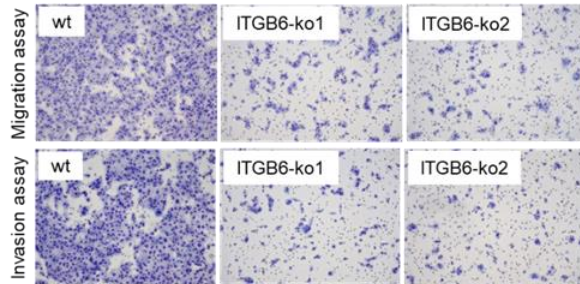


図3. 移動能、浸潤能解析

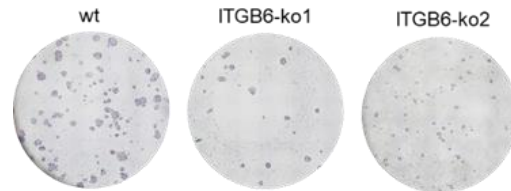


図4. コロニー形成能解析

(3) ITGB6 ノックアウトによるコロニー形成能低下と細胞周期変化

HuCCT1-wt と比較して ITGB6-ko1, ko2 ではコロニー形成能の有意な低下がみられた (それぞれ $P < 0.05$, < 0.01) (図4)。また、フローサイトメトリーにより ITGB6-ko で G0/G1 期の低下と、S/G2/M 期の増加をみとめ、細胞周期の変化が示された。

(4) RNA-seq による発現変動遺伝子の抽出

HuCCT1-wt と ITGB6-ko の発現遺伝子比較では、 $p < 0.05$ および $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ で 621 個、 $\text{Log}_2\text{FC} < -1$ で 479 個の遺伝子が得られ、GO および Pathway 解析を行った。GO 解析において、ITGB6-ko で発現低下した遺伝子群では cell-cell signaling や extracellular matrix organization などに関連する遺伝子の低下がみられた。一方、ITGB6-ko で発現増加がみられた遺伝子群では免疫応答に関連する遺伝子が多くみられたが、cell proliferation や cell migration に関連する遺伝子の増加がみられた。Pathway 解析では増殖や移動に関連する経路の変動は明らかではなかった。さらに、補正 P 値 < 0.05 , $\text{log}_2\text{FC} < -1$ で 38 個、 $\text{log}_2\text{FC} > 1$ で 92 個の遺伝子が抽出された。これらの中で、移動や接着と関連が示唆される遺伝子 (PODXL2, CLDN2, S100A2, TSPAN8, LGALS1, CEACAM6) に着目した。(図5)

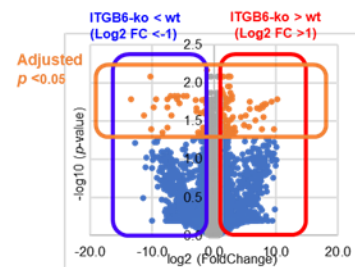


図5. RNA-seq による発現変動遺伝子(Volcano plot)

(5) リアルタイム PCR

HuCCT1-wt と比較して ITGB6-ko 細胞における PODXL2, CLDN2, S100A2, TSPAN8, LGALS1, CEACAM6 の mRNA 量は、PODXL2 で有意な低下がみられた ($P < 0.05$)。また、CEACAM6 では有意な増加がみられた ($p < 0.01$, < 0.05)。

(6) 蛍光免疫染色による PODXL2, CEACAM6, S100P, MUC1, CD56 の発現

PODXL2 は HuCCT1-wt で細胞質に発現がみられ、ITGB6-ko 細胞で発現減衰していた。インテグリンβ6 との二重染色では共局在が示された (図6)。CEACAM6 は ITGB6-ko 細胞で HuCCT1-wt と比較して発現が増加し、細胞膜および細胞質に局在していた。S100P, MUC1 は、HuCCT1-wt で細胞質に発現がみられたのに対し、ITGB6-ko 細胞で発現減衰していた。CD56 は明らかな発現変化はみられなかった。

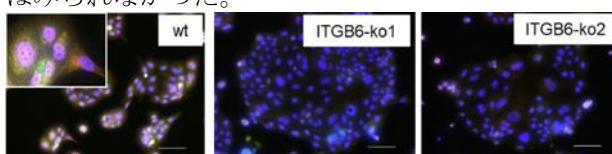


図6. インテグリンβ6とPODXL2の蛍光二重染色

(7) 肝内胆管癌組織における PODXL2 の発現と臨床病理学的所見との関連

肝内胆管癌組織材料 52 例を用いた PODXL2 免疫組織化学的解析では、発生部位、発現様式、漿膜浸潤、胆管浸潤などの臨床病理学的所見と関連し、インテグリンβ6 の発現と相関を示した(図 7)。

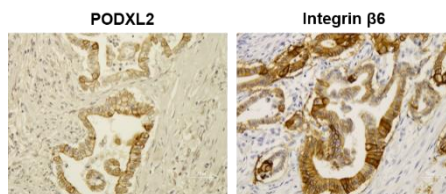


図 7. PODXL2 の免疫組織化学的解析

(8) HuCCT1 と HuH28 を用いた GeneChip 解析

① 変動遺伝子の抽出

Log2 FC >1, <-1 で抽出した変動遺伝子は 6876 個で、これらを用いて GO, Pathway 解析を行った。Pathway 解析では、PI3K-Akt signaling pathway や Focal adhesion など ITGB6 が関連する Pathway で変動がみられた。この 2 つ経路に着目し、HuCCT1 で発現が高い遺伝子を調べた。

② ITGB6 発現制御候補遺伝子の抽出

HuCCT1 では HuH28 と比較して、ITGB6 の発現が 104.4 倍、ITGB4 の発現が 31.5 倍高かった。PI3K-Akt signaling pathway において HuCCT1 と HuH28 で発現量の差が最も大きかったのは EREG (FC=14354) であり、その他 Growth factors (AREG, FC=919; FGF2, FC=38.1; TGFA, FC=35.8) や ERBB3 (FC=54.6), MET (FC=7.5), EGFR (FC=6.2) などの GF 受容体で差がみられた (図 8)。また、Focal Adhesion の経路においては RAC2 (FC=42.0) や PAK6 (FC=123.3) の発現量が大きく異なっていた (図 9)。

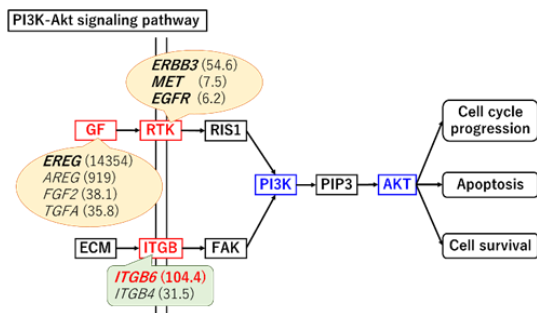


図 8. PI3K-Akt signaling pathway において HuCCT1 で高発現を示した遺伝子

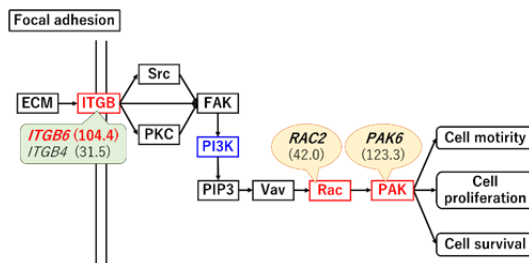


図 9. PI3K-Akt signaling pathway において HuCCT1 で高発現を示した遺伝子

③ RT-PCR

PI3K-Akt signaling pathway と Focal adhesion で発現の差が大きかった EREG, ERBB3, MET, EGFR, RAC2 についてリアルタイム PCR で mRNA 発現量を調べた。EREG, ERBB3, MET, RAC2 の mRNA 発現量が HuCCT1 で HuH28 と比較して有意に高かったが (p =0.0044, p <0.001, p =0.0050, p =0.0019)、EGFR では有意差がみられなかった(図 10)。さらに ITGB6-ko 細胞においてもこれらの mRNA 量を調べたが、いずれも差はみられなかった。

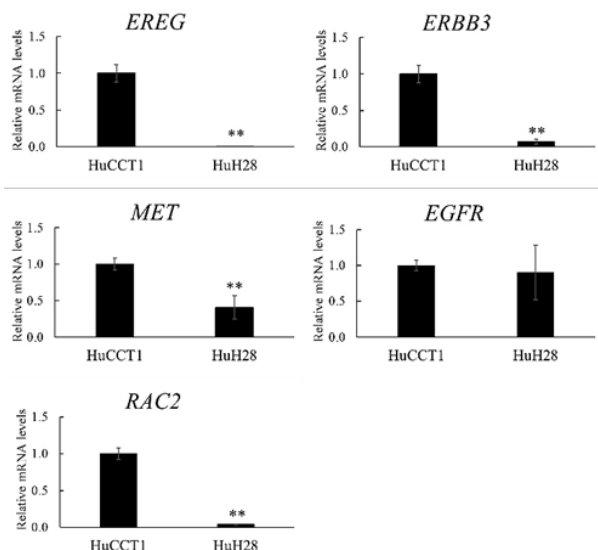


図 10. HuCCT1 と HuH28 における EREG, ERBB3, MET, EGFR, RAC2 の mRNA 発現量 (*p <0.05, **p <0.01)

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 1件）

1. 著者名 Soejima Yurie、Takeuchi Miho、Miyamoto Nao、Sawabe Motoji、Fukusato Toshio	4. 巻 22
2. 論文標題 ITGB6-Knockout Suppresses Cholangiocarcinoma Cell Migration and Invasion with Declining PODXL2 Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6303 ~ 6303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22126303	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 副島友莉恵、竹内美穂、宮本菜央、沢辺元司、福里利夫
2. 発表標題 ITGB6ノックアウト胆管癌細胞株の機能解析と遺伝子発現変化
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 副島友莉恵、竹内美穂、宮本菜央、沢辺元司、福里利夫
2. 発表標題 胆管癌細胞株におけるITGB6ノックアウトと機能解析
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学ホームページ
<https://www.tmd.ac.jp/>

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			
イタリア	フィレンツェ大学			