

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：83802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16733

研究課題名（和文）新規がん転移関連分子STAC2の分子機能と乳がんにおける臨床的意義の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular function of STAC2, a novel cancer metastasis-associated molecule, and its clinical significance in breast cancer

研究代表者

河田 卓也（Kawata, Takuya）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員

研究者番号：30792494

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）：新規がん転移関連分子候補STAC2の分子機能とヒト乳がんにおける臨床的意義の解析を目的として解析を行った。マウス乳がん培養細胞株では、細胞増殖やアポトーシスとの関連が示唆された。しかし、ヒト乳がん培養細胞株では、STAC2の発現と悪性度とを関連付けるデータは得られなかった。また、臨床検体を用いて、ヒト乳がんにおけるSTAC2 mRNA発現と臨床病理学的因子との関係を解析した。その結果、STAC2発現と悪性度とは相関しなかった。また、新規ドライバー融合遺伝子候補とされるACACA-STAC2は解析した症例には検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規がん転移関連分子候補STAC2と転移を含むがんの悪性度との関連を明らかにすることを目的とした。これにより、複雑な転移メカニズムの一端を解明するだけでなく、転移を標的とする新たな創薬ターゲットとなる可能性を期待した。今回の解析から、ヒト乳がん細胞株を用いた実験ではSTAC2の高発現が悪性度を増強する結果は得られなかった。また、STAC2の発現と乳癌症例を用いた解析では臨床病理学的な因子との相関を認めなかった。また、ACACA-STAC2融合遺伝子の頻度は極めて低く、解析症例中には見いだせなかった。以上より、STAC2はヒトがんにおいて転移や悪性形質との関連が低いと想定される。

研究成果の概要（英文）： Analysis was performed to analyze the molecular function of STAC2, a novel candidate cancer metastasis-associated molecule, and its clinical significance in human breast cancer. In cultured mouse breast cancer cell lines, STAC2 was suggested to be associated with cell proliferation and apoptosis. However, in human breast cancer cultured cell lines, no data were obtained to correlate STAC2 expression with malignancy. We also analyzed the relationship between STAC2 mRNA expression and clinicopathological factors in human breast cancer using clinical specimens. The results showed that STAC2 expression did not correlate with malignancy. In addition, ACACA-STAC2, a novel driver fusion gene candidate, was not detected in the analyzed cases.

研究分野：病理学

キーワード：がん転移

1. 研究開始当初の背景

転移という現象は腫瘍の悪性形質を決定づける最も重要な因子である。がんを根治するためには転移をターゲットとした治療戦略が必要となるが、現在まで転移のメカニズムは十分に解明されておらず、転移に的を絞った治療薬の開発は立ち遅れている。我々は転移のメカニズムを明らかにし、責任分子を同定してがん治療に応用するために、マウス乳がんから転移能や臓器特異性、転移様式などが異なるモデルを作成し、解析を行い*1、Secretory leukocyte protease inhibitor*2, Semaphorin3B, S100A14*3など、転移を促進する分子群を同定してきた。STAC2はこれらの分子とともに転移を促進する候補分子の1つと考えられる。STAC2はSH3ドメインやZnフィンガードメインを持ち、アダプタータンパク質の1種と予想されている。また、2016年にAcetyl-CoA Carboxylase Alpha(ACACA)との融合遺伝子(ACACA-STAC2)が乳がんのドライバー融合遺伝子の候補の1つとして同定されている*4。しかしながら、STAC2の分子機能や発現分布、また、ACACA-STAC2融合遺伝子の分子機能やがんにおける役割はほとんど解明されていない。また、静岡がんセンターで行われている癌症例のゲノムおよび遺伝子発現解析“project HOPE”(がん症例のマルチオミックス解析)のデータでは、乳がんにおいてSTAC2の発現が高い症例が多いことが示されている。これらのことから、STAC2は高発現によりがんの悪性形質、特に転移を増強する性質があること、乳がん症例では融合遺伝子をつくり、がんの悪性度の増加に關与する可能性が想定された。

2. 研究の目的

本研究では新たに同定されたがん転移促進分子候補であるが、その機能がほとんど未知であるSTAC2の機能解析とヒト乳がん症例におけるSTAC2発現の意義を解明することを目的とする。また、乳がんドライバー融合遺伝子候補であるACACA-STAC2の機能とその存在頻度を明らかにすることを目的とした。本研究でSTAC2の分子機能や発現が解明されることにより、がん転移メカニズムや乳がんの診断・治療において新たな知見が得られると期待された。

3. 研究の方法

(1) マウス乳がん細胞株による in vitro 実験

マウス乳癌細胞株MCH66から作製された高転移株HM1-6, Lu10と低転移株66LMに発現する遺伝子の解析により、高転移株に発現が高い遺伝子としてSTAC2が同定された。HM1-6およびLu10にはSTAC2に対するsiRNAでノックダウンを、66LMには発現ベクターにより、強制発現を行った。それぞれ、STAC2の変動とがんの悪性度との関連を実験的に検証

した。

(2) ヒト乳がん細胞株による in vitro 実験

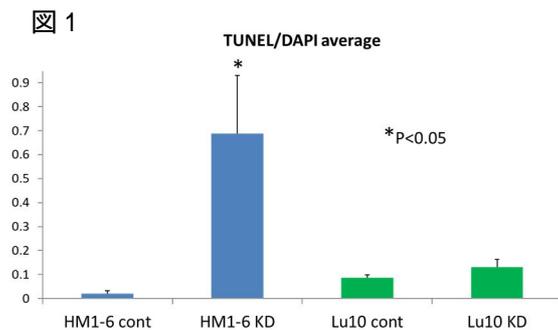
ト乳がん細胞株の公開データベースの情報から、STAC2 を高発現する細胞 SKBR3 と低発現細胞 MCF7, MDA-MB-231、および ACACA-STAC2 融合遺伝子を持つ BT-474 を入手した。STAC2 の発現を RT-PCR で確認後、高発現細胞は siRNA でノックダウン、低発現細胞は発現ベクターにより強制発現を試み、がんの悪性度との関連を実験的に検証した。また、蛍光抗体染色により STAC2 の局在を明らかにした。

(3) STAC2 分子発現の臨床的意義の解明

乳がんの外科手術症例 164 例に対して mRNA 発現のマイクロアレイ解析データを用い、STAC2 遺伝子発現を高、中、低の 3 グループに分類し、臨床病理学的事項との関連を検討した。さらに、STAC2 を高発現する症例の mRNA を用いて RT-PCR を行い、ACACA-STAC2 融合遺伝子の存在を検証した。

4. 研究の成果

(1) 3 種類の STAC2 に対する siRNA を、HM1-6 と Lu10 に導入し、70-80%程度のノックダウン効率を認めた。XTT assay では、STAC2 のノックダウン細胞 HM1-6 と Lu10 は増殖活性が低下した。また、STAC2 のノックダウンにより、HM1-6 では浮遊細胞が増加し、Lu10 では細胞突起が減少するなど、形態変化が確認された。TUNEL 染色では、HM1-6 のノックダウンにより有意に陽性細胞の増加が認められた。HM1-6 のノックダウン細胞では、ウェスタンブロットにより、Caspase-3, 6, 9, PARP の発現増加がみられ、アポトーシス経路の活性化が示された(図 1)。66LM において複数の発現ベクターの導入を試みたが、高発現クローンを作製できなかった。

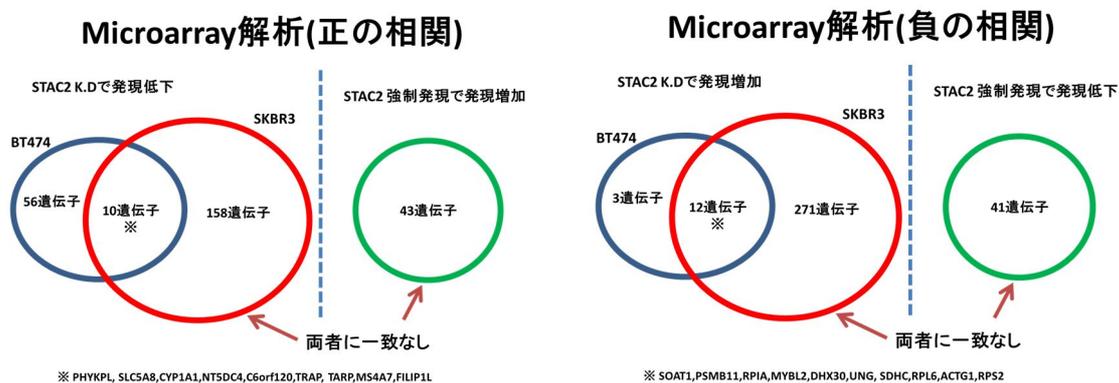


(2) 入手したヒト乳がん細胞株のうち、MCF7 と MDA-MB-231 は STAC2 発現がほとんどなく、BT-474 と SKBR3 は高発現を示すことを確認した。BT474 においては RT-PCR で ACACA-STAC2 融合遺伝子の存在を確認した。3 種類の siRNA を用いて、BT-474 と SKBR3 の STAC2 のノックダウンを行い、70%程度のノックダウン効率を認めた。マウス乳がん細胞株で見られた形態変化は認めなかった。XTT assay により ACACA-STAC2 のノックダウンによる BT-474 の増殖能の変化を調べたがコントロール群との有意差はなく、増殖に対する影響を認めな

った。次に、低発現株である MCF7 に対して複数の発現ベクターによる強制発現細胞の作製を試みたが、一過性に高発現する細胞が得られたが、安定高発現クローンの選択はできなかった。

BT-474・SKBR3 に対する STAC2 ノックダウン細胞、MCF7 に対する STAC2 一過性強制発現細胞を用いてマイクロアレイ法を用い、mRNA 発現の網羅的解析を行った。いずれのパターンでも、発現に差がみられた遺伝子は少なく、すべてに共通して発現が変動する遺伝子は確認できなかった。STAC2 の発現変動と他の分子の発現やシグナルパスウェイに対する影響は少ないと考えられた(図 2)。

図 2



高発現株に対して STAC2 タンパクの蛍光抗体染色を複数の抗体を用いて行ったが、いずれも非特異的な染色結果が目立ち、判定が困難であった。

(3) 臨床病理学的な因子として年齢、組織型、リンパ節転移、遠隔転移、予後に関して解析を行ったが、いずれも明らかな差異を認めなかった(表 1)。STAC2 の発現が高値であった症例のうち、RNA が利用可能であった 10 症例では、いずれも ACACA-STAC2 融合遺伝子は検出されなかった。

以上のとおり、マウス乳がん細胞株ではアポトーシス経路の抑制に伴い細胞増殖活性を増加させる可能性が示唆された。しかし、乳がん細胞株では STAC2 とがんの悪性度との関連を示すデータは得られなかった。また、臨床病理学的因子と STAC2 発現との間に有意な相関は見られなかった。さらに、新規乳がんドライバー遺伝子候補と考えられている ACACA-STAC2 融合遺伝子は、今回解析した症例には検出されなかった。

表 1

STAC2 mRNA発現と臨床病理学的因子の関係

	年齢 50歳以下	術前治療 あり	小葉癌	Histological grade 3	リンパ節 転移あり	遠隔 転移あり	再発あり
High	15	13	8	15	25	2	1
N=48	31.3%	27.1%	16.7%	31.3%	52.1%	4.2%	2.1%
Intermediate	13	9	2	10	19	0	5
N=29	44.8%	31.0%	6.9%	34.5%	65.5%	0.0%	17.2%
Low	33	9	14	28	52	2	6
N=87	37.9%	10.3%	16.1%	32.2%	59.8%	2.3%	6.9%

参考文献：

- *1: Sugino T, et al. (2002) Am. J. Pathol., 160, 1973-1980
- *2: Sugino T, et al. (2007) BMC Med., 212, 152-160
- *3: Tanaka M, et al. (2015) BMC Cancer., 15, 53
- *4: Zhao J, et al. (2016) Oncotarget., 7, 61054-61068

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Kawata T, Muramatsu K, Shishito N, Ichikawa-Tomikawa N, Oishi T, Kakuda Y, Akiyama Y, Yamaguchi K, Sakamoto M, Sugino T.	4. 巻 11
2. 論文標題 EMID1, a multifunctional molecule identified in a murine model for the invasion independent metastasis pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16372 ~ 16372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96006-2	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 Yasui H, Kawata T, Muramatsu K, Kakuda Y, Oishi T, Norose T, Notsu A, Nishimura S, Fukuoka J, Sugino T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Expression of N-Terminal-Deficient E-Cadherin Protein in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 383 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001822	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 Terada Y, Takahashi T, Hayakawa T, Ono A, Kawata T, Isaka M, Muramatsu K, Tone K, Kodama H, Imai T, Notsu A, Mori K, Ohde Y, Nakajima T, Sugino T, Takahashi T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Artificial Intelligence-Powered Prediction of ALK Gene Rearrangement in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCO Clinical Cancer Informatics	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) 10.1200/CCI.22.00070	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 Omori S, Muramatsu K, Kawata T, Miyawaki E, Miyawaki T, Mamesaya N, Kawamura T, Kobayashi H, Nakashima K, Wakuda K, Ono A, Kenmotsu H, Naito T, Murakami H, Sugino T, Takahashi T.	4. 巻 148
2. 論文標題 Trophoblast cell-surface antigen 2 expression in lung cancer patients and the effects of anti-cancer treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-021-03784-3	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 Miyata H, Akiyama Y, Iizuka A, Kondou R, Maeda C, Kanematsu A, Watanabe K, Ashizawa T, Nagashima T, Urakami K, Ohshima K, Kawata T, Muramatsu K, Shiomi A, Terashima M, Sugino T, Notsu A, Mori K, Yamaguchi K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Development of an Automatic Measurement Method for CD8 and PD-1 Positive T Cells Using Image Analysis Software	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 419 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15500	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 Wakuda K, Morita M, Sekikawa M, Morikawa N, Miura K, Doshita K, Iida Y, Kodama H, Mamesaya N, Kobayashi H, Ko R, Ono A, Kenmotsu H, Naito T, Murakami H, Muramatsu K, Kawata T, Mori K, Shimizu T, Gon Y, Takahashi T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Concordance of ALK fusion gene-rearrangement between immunohistochemistry and next-generation sequencing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 96 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-023-02451-6	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 Omori S, Muramatsu K, Kawata T, Miyawaki E, Miyawaki T, Mamesaya N, Kawamura T, Kobayashi H, Nakashima K, Wakuda K, Ono A, Kenmotsu H, Naito T, Murakami H, Sugino T, Takahashi T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of B7-H3 expression in patients with lung cancer following various anti-cancer treatments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 356 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-023-01353-8	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 Sugino T, Ichikawa-Tomikawa N, Tanaka M, Shishito N, Miura T, Abe M, Muramatsu K, Oishi T, Kakuda Y, Kawata T, Akiyama Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of S100A14 as a metastasis-promoting molecule in a murine organotropic metastasis model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 411 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10585-019-09979-w	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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