

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09067

研究課題名（和文）大腸癌肝転移成立初期における細胞接着斑関連因子Paxillinの果たす役割の解明

研究課題名（英文）Study of the role of Paxillin, focal adhesion associated factor, in the early stage of colorectal cancer to liver metastasis

研究代表者

藤岡 正喜 (Fujioka, Masaki)

大阪公立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：10648463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究は腫瘍の肝転移における細胞基質間接着タンパクの関与に着目し、マウス肝臓への腫瘍転移成立過程における細胞接着斑関連因子の果たす役割を明らかにすることを目的として研究を行った。肝転移モデルにおいて、親株と肝転移巣形成株でPaxillinの有意な発現増加がみられ、さらにin vivo selection法によりさらに肝転移性を高めた株でより高いPaxillinの高発現が確認された。肺転移モデルにおいては、肺転移巣での発現変動はみられなかったものの、CTCにおいてPaxillinの高発現がみられた。以上の結果から、肝転移および肺転移にはPaxillinの発現が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにがん肝転移患者検体を用いたNGS解析において、Focal adhesion(FA)関連遺伝子群の有意な発現上昇および予後との関連が複数報告されている。したがって、FAが肝転移巣成立に重要な役割を果たすことが示唆されている。

本研究の成果により、血流を介した腫瘍の肝転移巣形成過程において、Paxillinを含むFocal adhesion関連因子の発現が転移巣の形成に重要な役割を果たすことが示唆され、転移を抑制する為の新たな治療標的としての可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Several reports have shown significant upregulation of Focal adhesion (FA)-related genes and their association with prognosis in NGS analysis of liver metastatic tumor samples from cancer patients. This study focused on the involvement of cell-substrate adhesion proteins in tumor liver metastasis.

In the liver metastasis model via the splenic vein, a significant increase in Paxillin expression was observed in the parental strain and the liver metastasis-forming strain, and a higher expression of Paxillin was confirmed in the strain with enhanced liver metastatic potential by in vivo selection method. On the other hand, no significant change in Paxillin expression was observed in the lung metastases induced by intravesical injection compared to the parental strain. These results suggest that Paxillin expression plays an essential role in liver and lung metastasis to bladder carcinoma, but the mechanism of its establishment in the metastases may differ.

研究分野：実験病理学

キーワード：腫瘍肝転移 接着斑 細胞基質接着装置 肝転移モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

がんは原発巣発見時に肝転移が見つかる症例が多く、肝臓での薬剤耐性が患者の予後を決めている。近年のがん肝転移患者検体およびがん細胞株を用いた NGS 解析において、FA 関連遺伝子群の有意な発現上昇が複数報告されている (Oga et al., Cancer Science 2019, Devaud et al., International journal of cancer 2019)。FA は細胞-基質間における接着装置であり、細胞-基質間接着部位に多くの細胞質因子が集積し、アクチンフィラメントからなるストレスファイバーの端点として形成される。本研究で着目した Paxillin は FA を構成するたんぱく質の一つであり、細胞遊走にも関与していることが知られている。

これまでの肝転移が多い大腸がんを標的とした我々の研究で、BALB/c マウス由来大腸がん細胞株 Colon26 (以下 C26) から、より高い肝転移能を獲得した Liver Metastasis (LM4) 細胞を単離した。LM4 細胞の特徴として、C26 に比して Paxillin 発現量が有意に増加しており、shRNA にて Paxillin 発現を恒常的に減少させた LM4-shPaxillin 株では肝転移能が対照群に比して有意に減少していることをすでに明らかにしている (図 1 (移植後 7 日目))。また、興味深いことに転移能抑制は移植後 3 日目ですでにみられている。したがって、大腸がんの肝転移初期において Paxillin が重要な役割を果たすことが示唆されるが、その詳細な機序および生体内における FA の形成の有無及び Paxillin の発現局在については不明である。

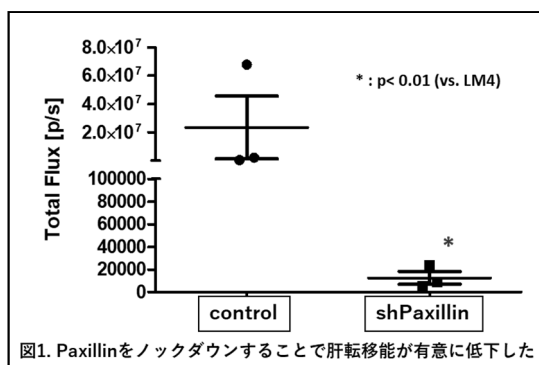


図1. Paxillin をノックダウンすることで肝転移能が有意に低下した

2. 研究の目的

本研究では FA の成立が膀胱癌の肝転移の重要な因子であることを明らかにするために、膀胱癌を用いて、肝転移成立における FA の関与の有無について研究を行う。膀胱癌の肝臓への転移は、その他の臓器への転移に比べてその患者の死亡ハザード比は 1.66 と高く (大腸癌は 1.32、胃癌は 1.03)、生存率が低い癌である (肝以外への転移癌の 1 年生存率が 24.0% に対して、肝転移の場合は 15.1%) (Cancer Epidemiol. 2020)。また、膀胱原発腫瘍は TURBT や BCG 注入法などの治療方針がある程度整っている一方で、転移性膀胱癌は原発性膀胱癌に比べて、一次治療の時点で抗がん剤による全身治療を選択できる患者はすでに半分以下であり、なかでも肝臓へ転移した症例に対して白金製剤の有効性が低いことが知られている。癌の遺伝子発現データベースである TCGA データベースにて転移がある Stage IV 膀胱癌において、FA 関連遺伝子の有意な発現上昇が確認されていることから、FA 関連遺伝子が肝転移性膀胱癌の有効な治療標的となり得る可能性があり、本研究の果たす社会的意義は大きい

そこで、本研究ではがんの肝転移成立過程における Paxillin の果たす役割およびその制御機構を明らかにすることを目的とし、転移巣-周囲正常細胞間における Paxillin 発現の有無及び Paxillin の修飾状態の変化による肝転移巣の細胞の動態および周囲微小環境について観察を行い、それらの分子制御機構についても解析を行う。具体的には、本研究では、Paxillin のがん肝転移成立過程での果たす役割について明らかにすることを目的として、Paxillin の腫瘍転移における機能、マウス肝臓での転移におけるがん細胞および周囲環境での FA の有無および接着基質 (血管、コラーゲン繊維など) の動態観察、以上 2 点について研究を行った。

3. 研究の方法

1: マウス肝転移モデルにおける膀胱癌細胞株における肝転移能の評価

マウス肝臓に対する膀胱癌の肝転移能を評価するために、既存のマウス膀胱がん細胞株 (MB49、Mbt-2 など) を用いてルシフェラーゼ (Luc) 発現株を作成し、マウス脾臓よりがん細胞株を移植した (マウス肝転移モデル)。さらに Luc 発光イメージングによって肝転移の有無を定量的に評価した。十分に肝臓への生着が確認できれば以降に記す研究を行い、生着能が不十分な場合は肝転移巣を選択培養し、肝への高転移能を有する集団を作成する in vivo selection を行った。

2: RNA 干渉法による野生株および Paxillin 発現抑制株における肝転移能の評価

上記 1 の研究で作出した luc 発現細胞株に対して、さらに Paxillin 遺伝子の shRNA を導入して恒常的に Paxillin 発現抑制した細胞株を作成し、マウス肝転移モデルにて肝転移能に対する影響を評価した。

3: 同種同所移植による肺への転移における Paxillin 発現の検討

肝臓に転移した腫瘍の栄養供給は、新生された腫瘍血管だけでなく、既存の血管を利用する (vessel co-option) と報告されており、申請者の先行研究においても同様に、肝低転移性の親

株では肝末梢で転移巣を形成するのに対し、肝高転移株では門脈の周囲に腫瘍塊を形成することを明らかにしており、肝高転移株はFAを成立させることで、門脈本幹から栄養供給を受けていると考えられる。一方で、肺転移や脳転移巣においては、既存血管を利用せずに新生血管を形成することが知られていることから、転移先となる臓器によって栄養血管の利用様式が異なることが推測される。したがって、本研究ではマウスへ腫瘍の同種同所移植を実施し、得られた肺転移巣におけるpaxillin発現の有無およびCirculated Tumor Cell (CTC)を回収し、paxillin発現の有無について検討した。

4. 研究成果

1: マウス肝転移モデルにおける膀胱癌細胞株における肝転移能の評価

マウスに膀胱癌細胞株を脾臓より注入し、門脈経路による肝転移を実施した。移植後14日後に剖検を実施し、肝転移巣を単離して得られた肝高転移株を用いて、マウス肝転移を実施し、親株および肝高転移株におけるPaxillinの発現についてqPCR法にて確認した結果、有意な発現増加が肝高転移株でみられた(図2)。さらに、親株に対して、レンチウイルスベクター導入によりPaxillin遺伝子を強制恒常発現させた株を作成し、親株およびPaxillin強制発現株をそれぞれ用いてマウス肝転移を実施した結果、Paxillin強制発現株においても肝高転移株と同様に高い転移能及び転移巣から周囲への高い浸潤能が病理組織学的解析の結果、得られた。

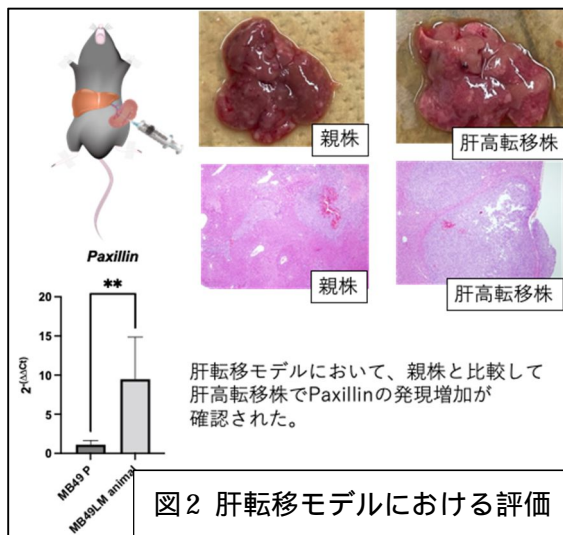


図2 肝転移モデルにおける評価

2: RNA 干渉法による野生株およびPaxillin発現抑制株における肝転移能の評価

1の実験でPaxillinの高発現が肝転移頻度を教条させる可能性が示唆されたため、確認実験として、親株および肝高転移株に対して、Paxillinを発現抑制させるようにshRNAを恒常的に発現させるレンチウイルスベクターを作成し、親株および肝高転移株に対して、それぞれベクターの導入をおこなった。その結果、親株および肝高転移株いずれも、肝臓への転移能が著しく抑制された(図3)。

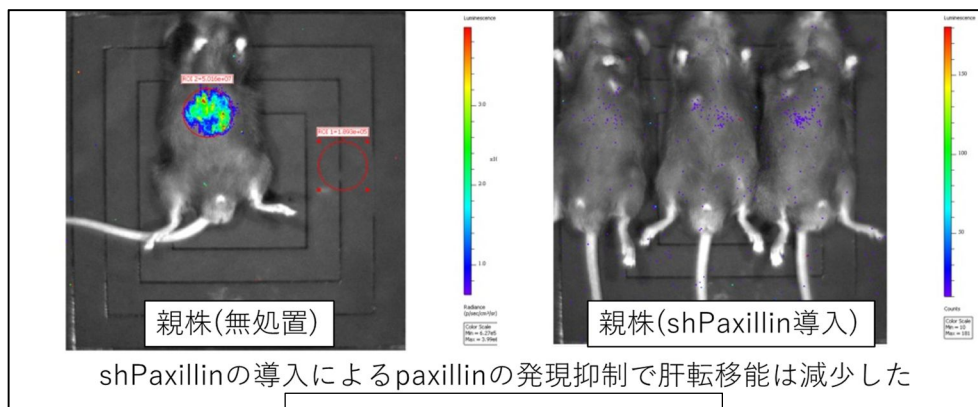


図3 肝転移モデルにおける評価

以上の結果から、Paxillinの発現が肝転移能に形成に重要な役割を果たすことが示された。

3: 同種同所移植による肺への転移におけるPaxillin発現の検討

脾静脈を介した肝転移モデルにおいて、肝転移巣形成にはPaxillinの発現が重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかしながら、マウス肝転移モデルはその特性上、門脈支配の臓器から肝臓への転移を模倣していることから、体循環・肺循環を介した転移を評価するには不適である。したがって、膀胱腔内注入による同種同所移植によって作成した肺転移巣におけるPaxillinの発現について検索を行った。その結果、原発巣(膀胱腔内)に比して転移巣(肺)でのPaxillinの有意な発現変動は認められなかった。一方で、同種同所移植モデルにて回収したCirculated tumor cellにおいてPaxillinの有意な発現増加が確認された。以上の結果から、

以上の結果から、膀胱癌への肝転移および肺転移にはPaxillinの発現が重要な役割を果たすことが示唆されたが、その転移巣に成立における機序は異なる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kakehashi Anna, Chariyakornkul Arpamas, Suzuki Shugo, Khuanphram Napaporn, Tatsumi Kumiko, Yamano Shotaro, Fujioka Masaki, Gi Min, Wongpoomchai Rawiwan, Wanibuchi Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13061216	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 該当する

1. 著者名 Kakehashi Anna, Suzuki Shugo, Ishii Naomi, Okuno Takahiro, Kuwae Yuko, Fujioka Masaki, Gi Min, Stefanov Vasily, Wanibuchi Hideki	4. 巻 21
2. 論文標題 Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7746 ~ 7746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207746	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 Fujioka Masaki, Suzuki Shugo, Gi Min, Kakehashi Anna, Oishi Yuji, Okuno Takahiro, Yukimatsu Nao, Wanibuchi Hideki	4. 巻 94
2. 論文標題 Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 927 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-020-02665-x	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、梯アンナ、大石祐司、鰐淵英機
2. 発表標題 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸(DMA)はマウス経胎盤ばく露によりヒストンH3K9修飾を介した肺発がんを促進する
3. 学会等名 2020年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔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
---------	---------