

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10107

研究課題名（和文）Wnt経路の新規下流シグナルの腺様嚢胞癌における機能解析と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Functional analysis and development of novel adenoid cystic carcinoma therapy targeting Wnt signaling

研究代表者

樋口 勝規 (Higuchi, Yoshinori)

福岡歯科大学・口腔歯学部・客員教授

研究者番号：70117224

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）：本研究では、唾液腺発生と腺様嚢胞癌の腫瘍形成におけるSemaphorin 3A（Sema3A）の関与について検討した。その結果、唾液腺発生においてSema3Aの発現はWnt/ β -cateninシグナルにより負の制御を受け、またSema3AはAKTのリン酸化を介し細胞増殖を正に制御していることが明らかとなった。腺様嚢胞癌の免疫組織化学的検索にて、Sema3Aは腫瘍胞巣で強発現し、リン酸化AKTとの共発現が高頻度にみられた。これらの結果より、Sema3A-AKTシグナルは細胞増殖を促進し、唾液腺の形態形成と腺様嚢胞癌の病態形成に寄与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

先行研究にて、Sema3AがWnt/ β -cateninシグナルの新規下流因子であることを明らかにした。本研究では、このSema3Aの唾液腺発生と腺様嚢胞癌における発現・機能を明らかにすることを企図した。特に、腺様嚢胞癌の病理組織標本において、Sema3Aが腫瘍性筋上皮細胞特異的に発現していることを見出したことは今まで報告がなく学術的な意義がある。また、Sema3A-AKTシグナルが細胞増殖を促進することから、Sema3A-AKTシグナルを標的とした抗腫瘍治療につながる可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the involvement of Semaphorin 3A (Sema3A) in submandibular gland development and adenoid cystic carcinoma (ACC) pathogenesis. Sema3A expression is negatively regulated by Wnt/ β -catenin signaling and Sema3A positively regulates cell proliferation via phosphorylation of AKT in salivary gland development. Immunohistochemical analysis of ACC specimens revealed that Sema3A is strongly expressed in the tumor lesion and frequently co-expressed in phosphorylated AKT-positive areas. These results suggest that the Sema3A-AKT axis promotes cell growth to contribute to morphogenesis and pathogenesis, at least in ACC, of salivary glands.

研究分野：口腔外科学

キーワード：唾液腺 腺様嚢胞癌 Sema3A Wnt/ β -カテニン経路 細胞増殖 癌形質 形態形成

1. 研究開始当初の背景

Wnt/ β -catenin 経路は高等真核生物において種を超えて保存されたシグナル経路であり、細胞増殖や運動など多彩な細胞機能を制御し、個体の発生において重要な役割を担っている。一方、異常活性化によるシグナル経路の破綻は発癌に繋がる。近年、研究分担者らは唾液腺発生過程において Wnt/ β -catenin 経路によって形態形成および機能的な分化が制御されていることを見出した[1]。また、唾液腺悪性腫瘍である腺様嚢胞癌 (Adenoid cystic carcinoma: ACC) における Wnt/ β -catenin 経路の活性化について報告された。Wnt/ β -catenin シグナルは主に遺伝子発現を制御するが、我々の先行研究において、Wnt/ β -catenin シグナルの新たな下流因子 Semaphorin 3A (Sema3A) を同定した[2]。

Sema3A は、軸索誘導因子として知られる分泌タンパク質である。我々は、Wnt/ β -catenin シグナルが Sema3A の発現制御を介して歯原性上皮細胞の増殖を負に制御していることを明らかにした[2]。歯胚発生と同様に、唾液腺の発生過程も口腔上皮と隣接する間葉組織との相互作用により進行することから、それらの発生過程において共通の分子基盤を有すると考えられる。しかし、唾液腺の発生過程における Sema3A の役割は不明である。また、Sema3A ががん関連遺伝子として機能する可能性が報告されている[3-5]が、Sema3A の唾液腺悪性腫瘍への影響もまた不明であった。

私どもは、腫瘍形成と器官発生には共通の分子基盤が存在すると考え研究に取り組んでいる。唾液腺発生に加え、唾液腺を発生母地とする悪性腫瘍である ACC に着目し、比較検討を行うこととした。ACC は、緩徐な発育と神経浸潤を起ししやすい特徴を有し、現在有効な化学療法がなく、放射線抵抗性も持つ。転移再発を起しやすく、長期の生命予後が不良な癌である。現在、MYB/NFIB、MYBL1/NFIB 融合遺伝子などの遺伝子異常は報告されているが、これらの遺伝子異常を標的とした抗がん剤の効果は十分ではなく、さらなる病態解明が必要とされている。KIT や EGFR の過剰発現など、いくつかの遺伝子異常と ACC の病因・病態への関与も報告されているが、ACC における Sema3A の機能は不明である。

2. 研究の目的

唾液腺発生過程と ACC 腫瘍形成における Sema3A の発現とその機能を解析し、Sema3A を介したシグナル伝達について機能解析を行う。

3. 研究の方法

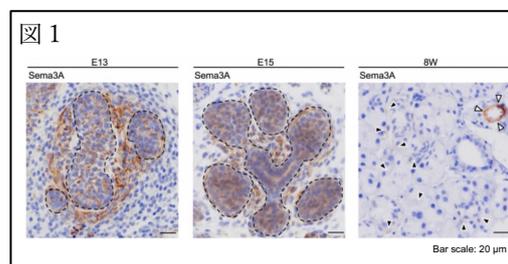
胎齢 13 日齢 (E13)、E15 及び生後 8 週齢 (8W) マウスの顎下腺における Sema3A の発現について免疫組織化学染色法を用いて解析した。マウス顎下腺器官培養を行い、Sema3A 発現の経時的変化を定量的 PCR 法にて検索した。また、マウス顎下腺を上皮と間葉を分離し、それぞれの Sema3A 発現を蛍光免疫染色法と定量的 PCR 法を用いて解析した。

Wnt/ β -catenin シグナル活性因子 CHIR99021、Sema3A 阻害剤である SM-345431 や AKT 阻害剤を用いてマウス顎下腺器官培養の処理を行い、形態形成やシグナル伝達に与える影響について検討した。

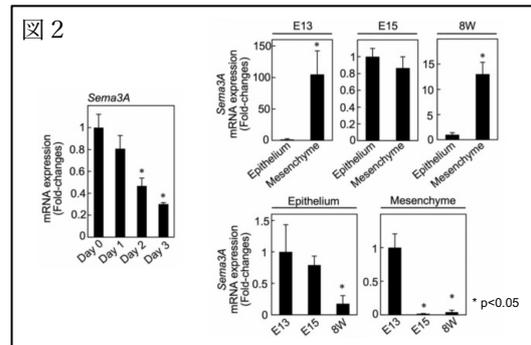
ヒト ACC 組織標本を用いて、免疫組織化学染色を行い、Sema3A、pAKT、増殖細胞のマーカー Ki-67 および腫瘍性筋上皮細胞のマーカー p63 の発現様式について検索した。

4. 研究成果

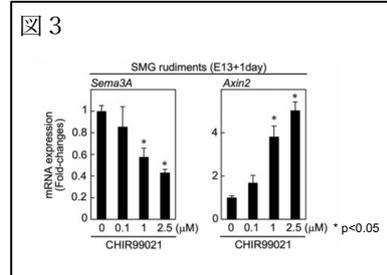
マウス顎下腺における Sema3A の発現について免疫組織化学染色を行うと、E13 と E15 では Sema3A はマウス顎下腺の上皮と間葉の両方の組織に発現していた。8W では Sema3A は上皮ではほとんど検出されず、血管に Sema3A が高発現していた (図 1C)。



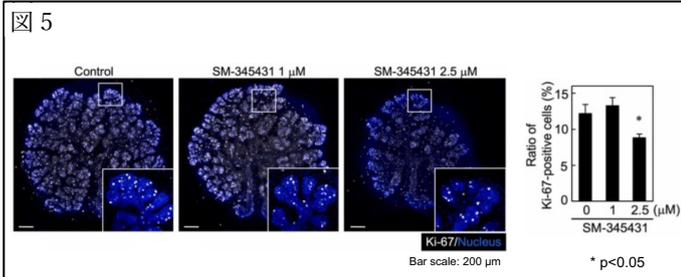
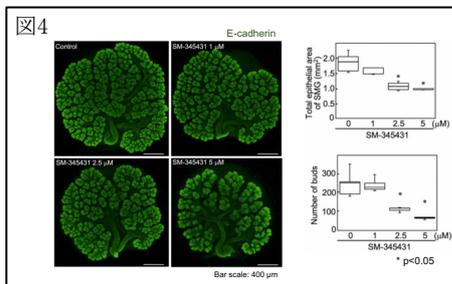
定量的PCR法を用いて、*Sema3A* の発現解析を行った。マウス顎下腺器官培養において、経時経過とともに *Sema3A* の発現は減少した (図2左)。また、上皮間葉を分離して *Sema3A* の発現を上皮間葉間で比較すると、E13 では間葉に高く、E15 では上皮間葉ともに発現し、8W では間葉に高い発現がみられた (図2右上)。上皮、間葉それぞれにおける *Sema3A* の発現変化を検索すると、上皮間葉ともに経時的に *Sema3A* の発現は減少した (図2右下)。これらの結果より、唾液腺発生の各段階において *Sema3A* の発現は変化していることが示された。



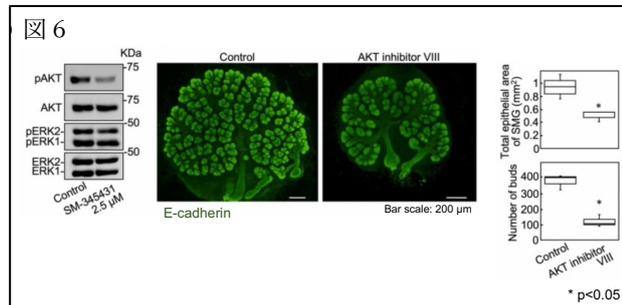
また、Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させるために CHIR99021 をマウス顎下腺器官培養に作用させると、CHIR99021 濃度依存的に *Sema3A* の発現は減少し、Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子である *Axin2* の発現は増加した (図3)。歯胚と同様に、唾液腺発生過程においても *Sema3A* は Wnt/ β -catenin シグナルの下流因子としてし、負の発現制御を受けていると考えられた。



次に、マウス顎下腺器官培養を *Sema3A* 阻害剤である SM-345431 で処理すると、SM-345431 濃度依存的にマウス顎下腺の腺上皮総面積、bud や cleft の数および増殖細胞のマーカである Ki-67 陽性細胞数の減少を認めた (図4, 5)。

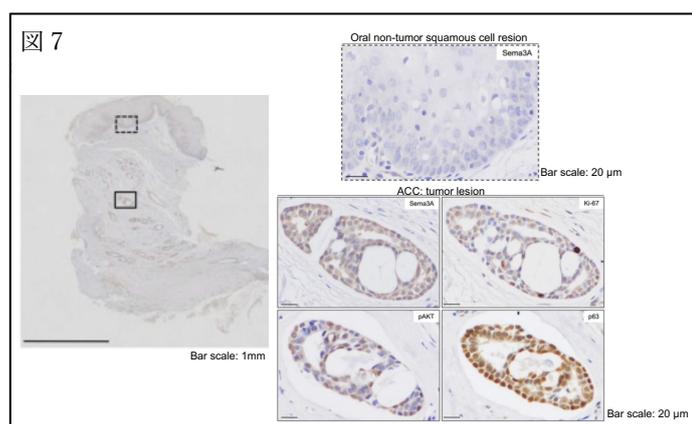


Sema3A の下流シグナルについて解析したところ、AKT のリン酸化が抑制されていた (図6)。*Sema3A* は AKT のリン酸化を介して細胞増殖に関与することが示唆された。そこで、AKT 阻害剤でマウス顎下腺器官培養の処理を行うと、AKT 阻害剤 10 μ M にて有意に腺上皮総面積や bud 数の減少を認めた (図6)。唾液腺の発生において *Sema3A* が AKT のリン酸化を介して関与していることが示唆された。



さらに、ACC 病理組織標本を用いて *Sema3A*、Ki-67、pAKT、腫瘍性筋上皮細胞のマーカである p63 について免疫組織化学染色を行ったところ、*Sema3A*、pAKT、Ki-67 および p63 の共発現を認めた (図7)。

本研究の結果から、唾液腺発生において *Sema3A* の発現は Wnt/ β -catenin シグナルにより負の制御を受け、また *Sema3A* は AKT のリン酸化を介して細胞増殖を正に制御



することが明らかとなった。そして、ACCにおいて Sema3A、pAKT、増殖細胞のマーカー Ki-67 および腫瘍性筋上皮細胞のマーカーp63 が共発現していたことから、Sema3A-Akt axis は唾液腺形態形成と腫瘍形成に関わっていることが示唆された。

* 図 1~7: The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis. Fujii S, Fujimoto T, Hasegawa K, Nagano R, Ishibashi T, Kurppa KJ, Mikami Y, Kokura M, Tajiri Y, Kibe T, Wada H, Wada N, Kishida S, Higuchi Y, Kiyoshima T. *Pathol Res Pract.* 2022, 236:153991. doi: 10.1016/j.prp.2022.153991. より引用、一部改変

<引用文献>

- [1] Matsumoto S, Kurimoto T, Taketo MM, Fujii S, Kikuchi A. The WNT/MYB pathway suppresses KIT expression to control the timing of salivary proacinar differentiation and duct formation. *Development.* 2016, 143:2311-24. doi: 10.1242/dev.134486.
- [2] Fujii S, Nagata K, Matsumoto S, Kohashi KI, Kikuchi A, Oda Y, Kiyoshima T, Wada N. Wnt/ β -catenin signaling, which is activated in odontomas, reduces Sema3A expression to regulate odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development. *Sci. Rep.* 2019, 9:4257. doi: 10.1038/s41598-019-39686-1.
- [3] Bagci T, Wu JK, Pfannl R, Ilag LL, Jay DG. Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene.* 2009, 28:3537-3550. doi: 10.1038/onc.2009.204.
- [4] Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka MJ, Bogler O, Mikkelsen T, Hirose T, Nishikawa R, Cheng SY. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene.* 2007, 26:5577-86. doi: 10.1038/sj.onc.1210348.
- [5] Li X, Chen Q, Yin D, Shi S, Yu L, Zhou S, Chen E, Zhou Z, Shi Y, Fan J, Zhou J, Dai Z. Novel role of semaphorin 3A in the growth and progression of hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 2017, 37:3313-20. doi: 10.3892/or.2017.5616.

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii S, Fujimoto T, Hasegawa K, Nagano R, Ishibashi T, Kurppa KJ, Mikami Y, Kokura M, Tajiri Y, Kibe T, Wada H, Wada N, Kishida S, Higuchi Y, Kiyoshima T.	4. 巻 236
2. 論文標題 The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 153991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.153991.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本龍史、藤井慎介、清島保
2. 発表標題 軸索誘導因子Sema3Aによる唾液腺形態形成および腺様嚢胞癌の増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsufumi Fujimoto, Shinsuke Fujii, Tamotsu Kiyoshima
2. 発表標題 Sema3A-AKT Axis In Salivary Gland And Adenoid Cystic Carcinoma Developments
3. 学会等名 第68回JADR総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本 龍史、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 唾液腺発生と腺様嚢胞癌腫瘍形成における軸索誘導因子Semaphorin 3A (Sema3A)の役割の解明
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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	清島 保 (Kiyoshima Tamotsu) (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	藤井 慎介 (Fujii Shinsuke) (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	長谷川 佳那 (Hasegawa Kana) (30793989)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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		
フィンランド	Institute of Biomedicine, トゥルク大学	MediCity Research Laboratories, トゥルク大学	トゥルクバイオサイエンスセン ター, トゥルク & オーボ・ア カデミー大学