

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16205

研究課題名（和文）STILによるタイトジャンクション減弱機構の解明と非浸潤性乳管癌病理診断への応用

研究課題名（英文）Mechanism of tight junction attenuation by STIL and its application to the pathological diagnosis of ductal carcinoma in situ of the breast

研究代表者

伊藤 秀明 (Hideaki, Ito)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：90711276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、非浸潤性乳管癌の浸潤性乳管癌への移行における分子機構を、中心小体複製関連因子STILによるタイトジャンクション減弱メカニズムより明らかにし、浸潤癌移行の可能性が高い症例の選別への応用を目指した。STILノックダウンにより、乳癌細胞におけるタイトジャンクションは増強した。さらに、STILは、タイトジャンクション減弱効果を報告されているTRAF4と相互作用することを見出した。STILはTRAF4を含むタイトジャンクション関連因子の局在を変化させ、タイトジャンクション減弱に働いていると考えられ、これらを非浸潤性乳管癌病理組織で評価することにより、浸潤リスク評価に応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞結合の一つであるタイトジャンクションの減弱メカニズムから、乳癌浸潤メカニズムの迫り、またこれまでにない非浸潤性乳管癌の浸潤リスク評価法の確立を目指した。その成果として、中心小体複製関連因子STILが乳癌の進展に関わっている可能性を見出した。本成果は乳癌の浸潤メカニズム解明の一助となり、また本成果を基盤的知見とし、STIL及びTRAF4の発現や相互作用を病理組織で評価することで、乳癌病理診断に応用できる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms in the transition from non-invasive to invasive breast ductal carcinoma, based on the mechanism of tight junction attenuation by STIL, and to apply this to the selection of cases with high potential for invasive cancer transition. After STIL knockdown, tight junctions in breast cancer cells were enhanced. Furthermore, STIL was found to interact with TRAF4, which has been reported to have a tight junction attenuating effect; STIL may alter the localisation of tight junction-associated factors, including TRAF4, and act to attenuate tight junctions. Assessing them in the histopathology of ductal carcinoma in situ could be applied to invasive risk assessment.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 タイトジャンクション STIL 浸潤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性では罹患率が最も高い癌腫であり、今後も患者数が増加すると予測されている。このうち非浸潤性乳管癌は、これまでは浸潤性乳管癌の前駆病変と考えられてきた。しかし、近年非浸潤性乳管癌のすべてが、浸潤性乳管癌に移行するわけではないと考えられており、その一部のみが浸潤癌へ移行すると考えられている。浸潤性乳管癌への移行における分子機構、また非浸潤性乳管癌の浸潤癌移行の可能性が高い症例の選別が課題となっている。

乳管上皮を含む正常粘膜上皮組織では表層側の細胞接合部にタイトジャンクションを形成し、それにより細胞の極性を形成している(Farquhar & Palade, 1963, J. Cell Biol., Tsukita et al. 1999, Trends Cell Biol.)。タイトジャンクションの減弱・消失それに伴う細胞極性の喪失は、間質への浸潤を引き起こす要因の一つと考えられている。実際、非浸潤性乳管癌では、タイトジャンクションは部分的に残存しており、細胞極性も一部は維持されていると考えられている。そのため浸潤癌へ移行時には、タイトジャンクションを減弱させ、細胞極性を消失させる分子機構が働いていると予想されるが、その全容は未だに明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

乳癌におけるタイトジャンクションの減弱及び細胞極性の喪失は、非浸潤性乳管癌が浸潤性乳管癌へ移行するのに重要な要因であると考えられる。しかし、乳癌において、タイトジャンクション減弱機構、細胞極性の喪失に関する機序の大部分が未解明である。そこで、本研究では乳癌における、STILによるタイトジャンクション減弱機構を明らかにし、そのメカニズムを応用した非浸潤性乳管癌の浸潤癌移行リスク分類の確立を目指している。

### 3. 研究の方法

#### (1) STIL 及び TRAF4 の発現・局在解析

乳癌培養細胞における STIL や TRAF4 の発現とタイトジャンクションの関係を明らかにするため、乳癌培養細胞で ZO-1 陽性部位と STIL、TRAF4 や他の浸潤関連因子の発現の関係を蛍光免疫染色で評価し、さらに STIL が TRAF4 の局在に影響があるかどうかを明らかにするため、STIL ノックダウン細胞において TRAF4、他の浸潤関連因子 (Cortactin) の局在を蛍光免疫染色で確認した。

#### (2) STIL と TRAF4 の相互作用の解析

STIL と TRAF4 の相互作用を解析するため、Proximity ligation assay (PLA) を用い、これら分子の複合体形成の評価を *in situ* で行った。

#### (3) 病理組織における STIL・TRAF4 発現解析

病理組織における STIL や TRAF4 の発現・局在について明らかにするため、免疫組織化学により発現の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) STIL の発現とタイトジャンクションの減弱機構

乳癌培養細胞 (MCF-7) を用いて、STIL ノックダウンを行い、ZO-1 の免疫染色を施行することにより、タイトジャンクションの評価を行った。蛍光免疫染色像を撮影し画像解析を施行することにより、ZO-1 陽性部位を定量した。その結果、細胞密集状態で STIL ノックダウン細胞では、ZO-1 陽性部位が増加しており、タイトジャンクションが増強していると判断した。

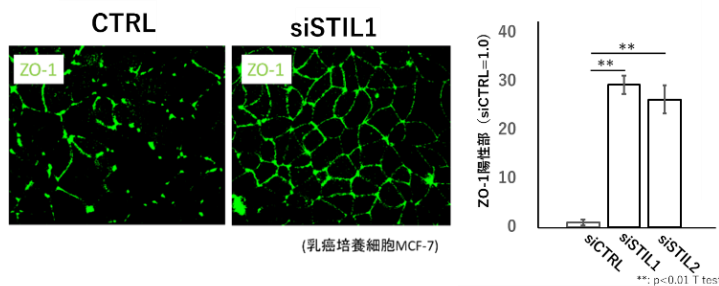


Figure 1. STILノックダウンにより、密集状態の乳癌細胞MCF-7細胞接合部におけるZO-1陽性部位が増加

#### (2) STIL と TRAF4 の相互作用

次に、STIL のタイトジャンクション減弱効果について、そのメカニズムを解明するため、先行研究でタイトジャンクション減弱効果を報告されている TRAF4 (Rosseau et al. 2013, PLoS Biol.) に注目し、STIL と TRAF4 の相互作用について解析を行った。PLA により、STIL と TRAF4 の相互作用を病理組織において *in situ* で確認した。尚、この実験に際して開発した、組織上で PLA シグナルを定量・解析し、病理診断に応用するための手法やプログラムは特許として出願した。

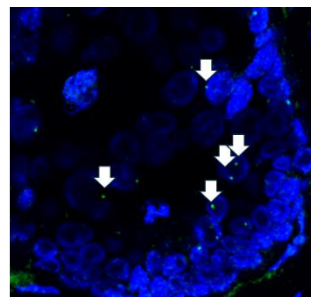


Figure 2. STIL と TRAF4 の結合を示す PLA シグナル (矢印)

### (3) STILによる TRAF4 を介したタイトジャンクション減弱メカニズムの検討

MCF-7 細胞で、タイトジャンクション減弱時の TRAF4 の局在について解析を行った。先行研究では、TRAF4 がタイトジャンクション減弱作用を有すると報告されていたため、STIL が TRAF4 の細胞接合部付近へ集積させ、タイトジャンクションを減弱させているとの仮説を立て、検証を行った。その結果、タイトジャンクションが減弱していると考えられる細胞遊走先進部付近では、予想と反し STIL や TRAF4 の共局在が細胞間接合部に見られず、一方で細胞遊走部より離れ、タイトジャンクションがはっきりとみられる部位では、STIL と TRAF4 の共局在が認められた。さらに、STIL ノックダウンにより、TRAF4 の細胞接合部への集積は増強していた。これらの結果は、TRAF4 がタイトジャンクションを制御していることを否定するものではないが、仮説とは異なり、TRAF4 が存在することにより、タイトジャンクションがより安定化している可能性も考えられる結果であった。TRAF4 のタイトジャンクションにおける機能については、先行研究をもとに当初予想した機能とは異なる可能性があり、乳癌培養細胞を用いて、さらなる詳細な検討が必要であると考えている。

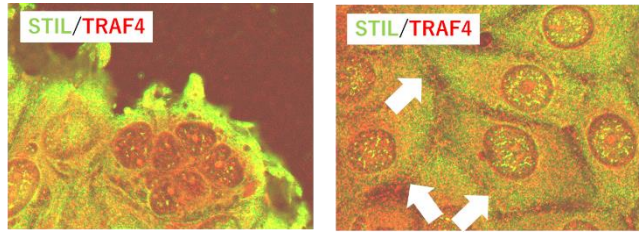


Figure 3. 細胞遊走部では、STILは細胞先進部にみられ、細胞間接合部へのSTIL及びTRAF4の局在は明らかでないが、遊走先進部より離れた部ではSTIL及びTRAF4の細胞接合部への共局在が見られる（矢印）。

細胞間接合部に見られず、一方で細胞遊走部より離れ、タイトジャンクションがはっきりとみられる部位では、STIL と TRAF4 の共局在が認められた。さらに、STIL ノックダウンにより、TRAF4 の細胞接合部への集積は増強していた。これらの結果は、TRAF4 がタイトジャンクションを制御していることを否定するものではないが、仮説とは異なり、TRAF4 が存在することにより、タイトジャンクションがより安定化している可能性も考えられる結果であった。TRAF4 のタイトジャンクションにおける機能については、先行研究をもとに当初予想した機能とは異なる可能性があり、乳癌培養細胞を用いて、さらなる詳細な検討が必要であると考えている。

### (4) 病理組織における TRAF4・STIL の発現解析

乳腺病理組織においては、TRAF4 は非腫瘍性乳管上皮では発現が高く、一部で細胞接合部に集積していた。一方で癌成分では浸潤・非浸潤にかかわらず、発現が低下し細胞接合部への集積は見られなかった。即ち、タイトジャンクションが残存している非腫瘍部において TRAF4 は細胞接合部に集積していると考えられる。これらの結果は、培養細胞を用いた実験と矛盾しないものである。また、TRAF4 がタイトジャンクション減弱に働くことを示す結果ではないものの、抗 TRAF4 抗体による免疫組織化学が、非浸潤性乳管癌と非腫瘍組織を鑑別に有効である可能性があることを示す結果であった。

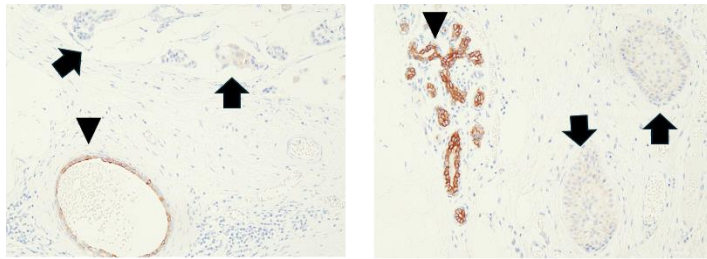


Figure 4. 病理組織では、非腫瘍部ではTRAF4は細胞接合部にみられる。一方で、非浸潤性乳管癌や浸潤性乳管癌ではTRAF4の発現は減弱し、細胞接合部での局在もみられない。（矢頭：非癌部、矢印：癌部）

一方 STIL は、染色体不安定性を伴う症例で発現が高いという知見を得た。

現在、症例数を増やし、非浸潤性乳管癌の浸潤性乳管癌移行リスク評価が、STIL や TRAF4 の発現評価により可能か検討中である。

### (5) タイトジャンクションに関連し、乳癌の非浸潤・浸潤を制御する因子の検索

タイトジャンクションに関連する因子が、細胞運動や浸潤といった機能にも関与している可能性が指摘されており、他の浸潤関連因子と STIL の局在及びタイトジャンクションの関係についても解析も行った。特に、タイトジャンクションに関連するアクチン結合因子である Cortactin は、我々はこれまでに癌細胞の浸潤に関する機能の解析を行ってきたものであり、本課題ではその解析をさらに進展させ、タイトジャンクションとの関係についても解析を試みた。

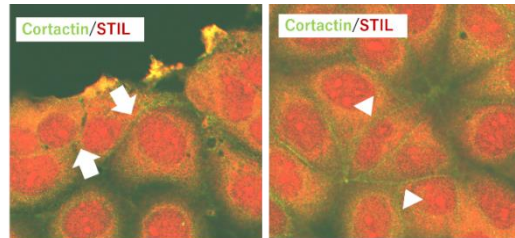


Figure 5. 細胞遊走先進部（矢印）と先進部より離れた部位（矢頭）では、STILやCortactinは細胞遊走先進部から離れた部位でより増強している。

Cortactin は癌細胞浸潤に重要な因子であるが、我々はこれまでに STIL が Cortactin の局在を制御し、リン酸化を亢進させることにより、浸潤能を亢進させることを明らかにしている。そのため、タイトジャンクションにおける STIL による Cortactin 制御機能について解析を試みた。

STIL および Cortactin は、細胞接合部では、細胞先進部から離れた部分で共局在が認められた。さらに、STIL ノックダウン細胞では、タイトジャンクションは増強するとともに細胞接合部に Cortactin がより多く見られた。STIL は、細胞遊走先進部や浸潤先端部で Cortactin の局在をタイトジャンクションから移動させる働きを担っている可能性があると考え、さらなる解析を進めている。

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 2件）

1. 著者名 Yamanaka Shunpei, Suzuki Susumu, Ito Hideaki, Sivasundaram Karnan, Hanamura Ichiro, Okubo Ikuko, Yoshikawa Kazuhiro, Ono Shoya, Takahara Taishi, Satou Akira, Tsuzuki Toyonori, Ueda Ryuzo, Ogawa Tetsuya, Fujimoto Yasushi	4. 巻 24
2. 論文標題 Establishment of Mucoepidermoid Carcinoma Cell Lines from Surgical and Recurrence Biopsy Specimens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1722 ~ 1722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24021722	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 Tsunoda Takumi, Riku Miho, Yamada Norika, Tsuchiya Hikaru, Tomita Takuya, Suzuki Minako, Kizuki Mari, Inoko Akihito, Ito Hideaki, Murotani Kenta, Murakami Hideki, Saeki Yasushi, Kasai Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 ENTREP/FAM189A2 encodes a new ITCH ubiquitin ligase activator that is downregulated in breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	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) 10.15252/embr.202051182	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤秀明, 猪子誠人, 陸美穂, 中村律子, 大西紘二, 笠井謙次
2. 発表標題 中心小体複製関連因子STILのCortactinを介した浸潤機構の解明
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤秀明
2. 発表標題 STIL (SCL/TAL1 interrupting locus) の膵臓癌細胞浸潤における機能解析
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤秀明, 猪子誠人, 陸美穂, 村上秀樹, 笠井謙次
2. 発表標題 STIL(SCL/TAL1 interrupting locus)による浸潤突起形成機構
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 伊藤 秀明
2. 発表標題 STIL ( SCL/TAL1 interrupting locus ) の膵臓癌細胞浸潤における機能解析
3. 学会等名 第 39 回 日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤秀明, 猪子誠人, 陸美穂, 村上秀樹, 笠井謙次
2. 発表標題 膵臓癌における中心小体複製関連因子STIL(SCL/TAL1 interrupting locus)による細胞遊走亢進機構の解明
3. 学会等名 第30回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 STIL - ARHGEF7シグナルの検出方法及びその使用	発明者 伊藤 秀明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-122077	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	笠井 謙次  (Kasai Kenji)	愛知医科大学・医学部病理学講座・教授  (33920)	
研究協力者	都築 豊徳  (Tsuzuki Toyonori)	愛知医科大学・医学部病理診断学講座・教授  (33920)	
研究協力者	中野 正吾  (Nakano Shogo)	愛知医科大学・医学部外科学講座(乳腺・内分泌外科)・教授  (33920)	

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