

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16412

研究課題名（和文）シヌクレイン- γ による癌転移機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of cancer metastasis by synuclein-gamma

研究代表者

谷 総一郎 (Tani, Soichiro)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40721022

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）：synuclein- γ は、神経フィラメントのひとつで様々な癌においてsynuclein- γ の発現が予後因子として報告されている。大腸癌の遠隔転移におけるsynuclein- γ の分子生理学的機序については明らかでない。本研究はsynuclein- γ に注目し、癌転移の機序解析とsynuclein- γ の分子生物学的意義を解明することとした。synuclein- γ は神経繊維であり、染色条件をパラフィンセクションを用いて検討した。臨床検体を用いて行った検討ではsynuclein- γ 陽性の腫瘍ではT細胞の浸潤が低く、免疫応答に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は、2017年悪性疾患罹患数が男女合わせて1位であり、対策が必要な疾患の一つである。大腸癌において遺伝子変異の重要性などが明らかになっているがSynuclein- γ に関しては未だ十分ではない。Synuclein- γ は神経繊維の一つの因子であり、がん微小環境におけるSynuclein- γ の重要性を解明することで癌の治療やバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Synuclein- γ , a neurofilament, was discovered in 1998 as a breast cancer-specific gene, and the expression of synuclein- γ has been reported as a prognostic factor in various cancers. In contrast, the molecular physiological mechanism of synuclein-gamma in distant metastasis of colorectal cancer is not clear. Synuclein-gamma is a nerve fiber, and staining conditions were examined using paraffin sections. In the study using clinical specimens, T-cell infiltration was low in synuclein-gamma-positive tumors, suggesting that it may be involved in immune responses.

研究分野：消化器癌

キーワード：Synuclein- γ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

synuclein は神経フィラメントの一つであり、synuclein ファミリーには α 、 β 、 γ の三種類の神経タンパク質がある。synuclein- α はシナプス末端に存在し、シナプス機能制御や神経可塑性に関与し、synuclein- α のミスセンス変異は家族性パーキンソン病の原因として知られている。また、synuclein- β は認知症や神経変性疾患の関与が報告されている。

我々は癌転移に重要な分子を同定するため、CT26 大腸癌リンパ節高転移株を作成し、網羅的解析を行った。その結果、大腸癌リンパ節高転移癌細胞において synuclein- γ (Sncg) が高発現であり、synuclein- γ の高発現がリンパ節における転移促進に関与していると考えられた。(図 1)

synuclein- γ は 1998 年に乳癌特異的遺伝子として発見され、その後、様々な癌腫で synuclein- γ の高発現が癌の予後不良因子となるとの関連が指摘され、これまでに乳癌や肺癌、膵癌、大腸癌などで高発現であり、進行癌で発現が上昇すること報告されている。一方で大腸癌における synuclein- γ と癌進展、転移の機序解析や意義については明らかではない。

2. 研究の目的

synuclein- γ と癌進展、転移の機序解析について臨床検体や細胞株における発現などを検討し、その臨床的意義について検討する。

3. 研究の方法

臨床検体における大腸癌切除を用いて免疫化学染色を行い、synuclein- γ の発現について検討した。評価は原発巣とともに、転移リンパ節についても検討した。また、その周囲におけるリンパ球浸潤 (CD3、CD8) についても検討をおこない、がん微小環境での synuclein- γ の発現と免疫細胞への影響について検討を行った。また、細胞株における synuclein- γ の発現についても qPCR と Western blotting を用いて mRNA と蛋白レベルでの発現の検討を行った。

4. 研究成果

大腸癌切除標本および郭清リンパ節の免疫染色 (マウスモノクローナル IgG1 γ -synuclein 抗体) を行った。原発巣における癌細胞と 間質での synuclein- γ の発現の評価を行った (図 2)。

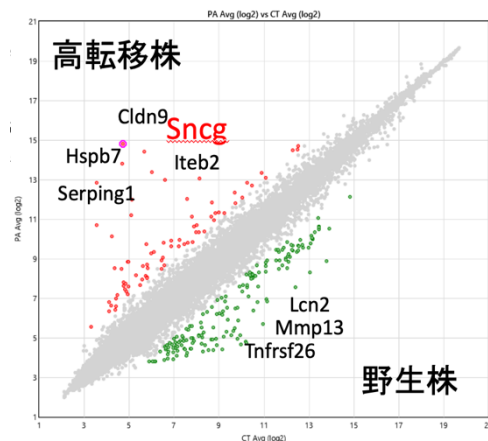


図 1 : 遺伝子発現解析で synuclein- γ が高発現

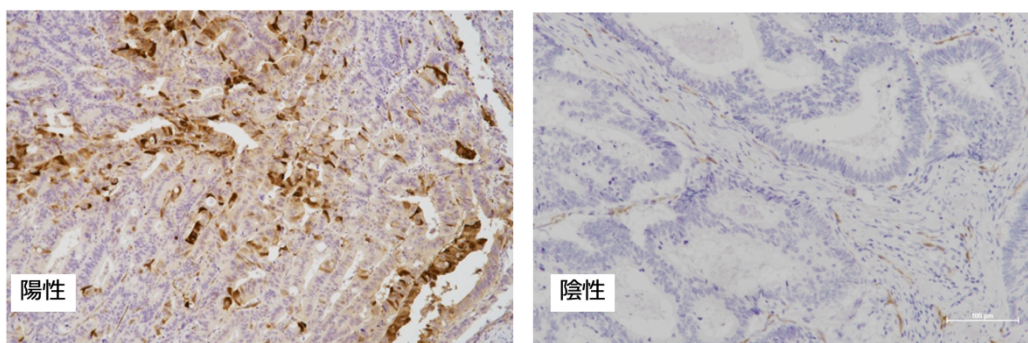


図 2: 原発巣における synuclein- γ の免疫染色。陽性ではがん細胞で synuclein- γ が染色されている。陰性例では間質のみ染色されている。

既報と同様に synuclein- γ 陽性症例ではリンパ節転移を含め進行癌を多く認めた。予後に関しては有意差を認めなかったが、大規模な症例数での検討が必要と考えられた。(図 3) また、原発巣で synuclein- γ が高発現の症例群では CD3 陽性細胞 (成熟 T 細胞) の浸潤が低下していたが、CD8 陽性細胞 (細胞障害性 T 細胞) について synuclein- γ の発現では差を認めなかった。CD3 と CD8 の免疫染色を用いた Immunoscore が大腸癌において予後因子となり、Immunoscore が高値であると予後良好であることが報告されている。²⁾ 一方で、synuclein- γ と Immunoscore を含めた

免疫に関する相互作用については明らかではなく、synuclein- γ による癌に対するリンパ節を含めたなど免疫応答の機序については今後、詳細な解析が必要であると考えられる。

synuclein- γ の発現が、癌微小環境における免疫応答にどのように関わっているかは不明であり、NK 細胞や MDSC を含めたマクロファージ、血管新生、免疫抑制性に分化する可能性のある Th17 や免疫応答を抑制する制御性 T 細胞についても検討が必要と考える。さらに癌微小環境と synuclein- γ の関係を解明するために、免疫染色で線維芽細胞 (aSM など)、血管内皮細胞 (CD31 など) について解析を行うことでさらなる知見が得られる可能性がある。

また、マウス由来大腸癌細胞株 (CT26) およびヒト由来大腸癌細胞株 (colo205, HCT116, WiDr) を用いて、癌細胞における synuclein- γ の発現について qPCR, western blotting で検討した。(図 4, 5)

qPCR においては Colo205 では synuclein- γ の発現がなく、HCT116 では発現を認め、WiDr で高発現であった。この結果より synuclein- γ の mRNA の発現は Colo205 では低く、WiDr では高発現であることが示唆された。また、蛋白レベルでの発現を検討するため、Western blotting を行った。CT26 では synuclein- γ の発現をみとめなかった。一方で、qPCR の結果と同様に WiDr では synuclein- γ は高発現であった。この結果より大腸癌細胞株においても synuclein- γ の発現は異なっており、癌の進展、転移などを含む悪性度に影響を及ぼしている可能性も考えられた。

synuclein は神経フィラメントの一つであり、3 種類 (α , β , γ) のファミリーが存在する。Synuclein- α はパーキンソン病におけるレビー小体の構成タンパクであるが、Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して抗原提示細胞を活性化し、自然免疫及び獲得免疫を活性化させることが報告されている³⁾。synuclein- γ は 127 アミノ酸で構成される水溶性の高度に保存されたタンパク質であり、原発巣における synuclein- γ の発現が癌の予後不良因子であること、synuclein- γ の高発現が細胞分裂を促進し、腫瘍の増大に影響することや薬剤誘導性アポトーシスを抑制することが報告されている⁴⁾ (Pan ZZ et al; JBC, 2002, Jia T et al; Cancer Res 1999)。synuclein- γ は水溶性であることから、血清中の synuclein- γ を測定することで、バイオマーカーとしての利用も考えられることから、詳細な解析に基づいた臨床応用が期待される。

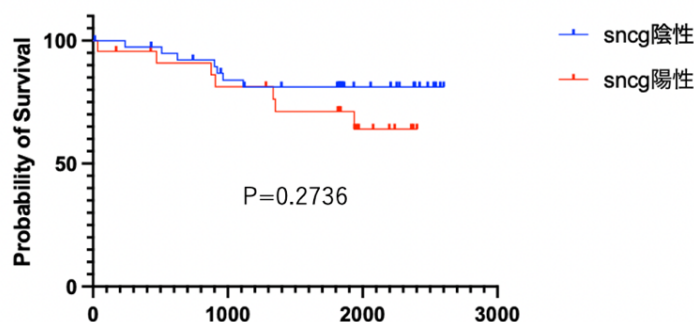


図 3: 大腸癌原発巣における synuclein- γ 陽性群と陰性群の全生存率の比較

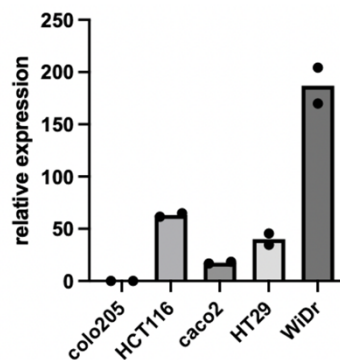


図 4: qPCR による大腸癌細胞株における synuclein- γ の発現の検討。

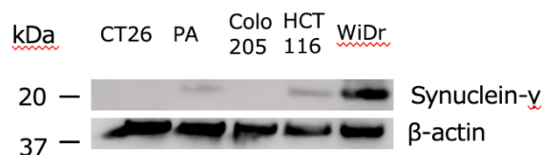


図 5: Western blotting による大腸癌細胞株における synuclein- γ の発現。

1) Bruening, Wendy, et al. "Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary." *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 88.9 (2000): 2154-2163.

2) Pagès, Franck, et al. "International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study." *The Lancet* 391.10135 (2018): 2128-2139.

3) Alam, Md Masud, et al. "Alpha synuclein, the culprit in Parkinson disease, is required for normal immune function." *Cell reports* 38.2 (2022): 110090.

4) Pan, Zhong-Zong, et al. "γ-Synuclein promotes cancer cell survival and inhibits stress-and chemotherapy drug-induced apoptosis by modulating MAPK pathways." *Journal of Biological Chemistry* 277.38 (2002): 35050-35060.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------