

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09840

研究課題名(和文)新規ラミニン融合遺伝子による扁平上皮癌の集団浸潤の分子機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism for collective invasion of squamous cell carcinoma by novel laminin fusion gene

研究代表者

越川 直彦 (Koshikawa, Naohiko)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70334282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラミニン融合遺伝子は、AAV-Cre感染によってマウスの舌組織で発現しました。その結果、ラミニン融合遺伝子の発現は基底細胞の過剰増殖と基底膜因子ラミニン-332の形成障害に影響を及ぼした。これらの結果は、ラミニン融合遺伝子が上皮組織から基底膜を通過する扁平上皮癌細胞の集団通過に影響を与えるだけでなく、上皮細胞から扁平上皮癌が発生する際の細胞変換にも関与している可能性があることを示唆している。今後、この正常上皮で発現するラミニン融合遺伝子が上皮基底細胞の形質転換を誘導することでがん化を誘導する可能性の検証を行う。さらに、基底膜の脆弱性が扁平上皮癌の集団浸潤に与える可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん浸潤・転移のこれまでの研究は、上皮間葉転換による上皮細胞の間葉細胞への転換を介したマトリックスメタロプロテアーゼによる基底膜破壊を介した様式に着目している。しかし、口腔がんや大腸がんなどの扁平上皮がんで見られる基底膜破壊を介さず、早期がんにも関わらず間葉組織への浸潤を示す質の悪い性質をもつ。本研究は、扁平上皮がん細胞が基底膜破壊に関与せず、脆弱な基底膜を通り抜けることを可能とする可能性を示唆している。このため、ラミニン融合遺伝子の発現が新たな扁平上皮がん細胞の基底膜を集団で通過する指標や鍵となる可能性をもつ。

研究成果の概要(英文)：The laminin fusion gene was expressed in mouse tongue tissue by infection with AAV-Cre. As a result, the expression of the laminin fusion gene affects basal cell hyperproliferation and impaired the formation of the basement membrane factor, laminin-332. These results suggest that the laminin fusion gene affects not only the collective passage of squamous cell carcinoma cells from epithelial tissues through the basement membrane but also that they may be involved in cellular transformation during the development of squamous carcinoma from epithelial cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ラミニン 基底膜 扁平上皮細胞 上皮組織

1. 研究開始当初の背景

口腔上皮内癌細胞は上皮-間葉転換による浸潤性の獲得に加え、上皮内癌がその構造を保ち集団で浸潤する様式(集団浸潤)を獲得する。集団浸潤は、上皮内癌細胞の過度な増殖と運動亢進、および、基底膜構造の何らかの異常がその発症に関わると考えられるが、その詳細は未だ明らかではない。

先行研究において、ラミニン 332 (Ln332) を構成するラミニン γ 2 鎖(γ 2 鎖)は基底膜の構成因子として、上皮細胞の安定的な接着と構造の維持に働くこと、一方、口腔癌を含む悪性がんにおいて、 γ 2 鎖は単鎖(γ 2 単鎖)として発現し、MMP 等のプロテアーゼによる限定分解を受けて、EGF 様増殖因子活性をもつリガンド断片となり、浸潤・転移などのがん細胞の悪性化を亢進する(図右)。

さらに最近、 γ 2 鎖をコードする LAMC2 遺伝子が、1、9 番の染色体転座により、核内受容体 NR6A1 のアンチセンス(AS)鎖と融合したラミニン γ 2 融合遺伝子(γ 2 融合遺伝子)として発現することを見いだした(Hoshino D, et al, Cancer Sci, 2021)その発現は扁平上皮癌を含む癌腫で確認されている。興味深いことに、 γ 2 融合遺伝子産物(γ 2 融合鎖)は、ラミニン 332 を形成するラミニン α 3、 β 3 鎖と会合する C 末端領域を欠損しているため、N 末端の EGF 様リガンドドメインのみの単鎖として発現する。そのため、 γ 2 融合鎖が、プロテアーゼによるプロセッシングを必要とせず EGF 様リガンドとして作用すること、また、Ln-332 形成の抑制することで基底膜構造に影響を与えることが示唆される。以上より、 γ 2 融合鎖が、口腔上皮癌の増殖、運動の亢進、そして、基底膜構造の脆弱化を誘導することで、口腔上皮内癌の基底膜破壊を伴わない集団浸潤に寄与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ラミニン γ 2 融合遺伝子が扁平上皮内癌の増殖、運動、基底膜形成に及ぼす影響を明らかとし、これまでに発症メカニズムが明らかとなっていない扁平上皮癌による集団浸潤の分子機序の解明を目的とする。

扁平上皮内癌による集団浸潤は、上皮内で過増殖した癌細胞が塊で移動を開始し、基底膜を引きちぎるように上皮組織から離脱する。早期癌である上皮内癌が突然に浸潤するため、その発症機構の解明は口腔癌を根治するためにも重要な問題である。研究代表者が着目したラミニン γ 2 融合遺伝子産物は、染色体転座により C 末端領域を欠損した γ 2 鎖が単鎖の断片として発現するため、そのままの状態でも EGF 様増殖因子として作用し、さらに、基底膜形成を抑制する新たな作用が予測される。以上から、これまでに分子機序の不明であった扁平上皮癌による集団浸潤の分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) Ln- γ 2-NR6A1 融合(γ 2 融合鎖)遺伝子産物の γ 2 融合鎖のタンパク質を特異的に検出する抗体の作製を試みた。 γ 2 鎖と異なり、 γ 2 融合鎖の C 末端に付加される自然界のタンパク質とは相同性のない NR6A1・AS 鎖から形成される 13 アミノ酸を抗原としたモノクローナル抗体の作製を行った。
- 2) 口腔癌培養細胞(HSC3、HSC4、SCC)細胞が発現する γ 2 融合鎖、 γ 2 鎖、NR6A1 の mRNA、タンパク質の発現をそれぞれ PCR、ウエスタンブロット(WB)で検索した。
- 3) 低悪性度のがん細胞に γ 2 融合遺伝子を導入したトランスフェクタントを作製し、Mock とトランスフェクタント細胞の 2D、3D 培養下の増殖、運動、浸潤能を解析した。
- 4) γ 2 融合鎖コンディショナルノックイン(γ 2 融合鎖-cKI)マウスを作製し、AAV-Cre を用

いて、マウス舌組織の基底膜構造に及ぼす影響を病的に解析した。

4. 研究成果

1) $\gamma 2$ 融合鎖に対する特異抗体の作製

まず、293FT 細胞で作製した $\gamma 2$ 融合鎖のリコンビナントタンパク質をマウスに投与し、そこから $\gamma 2$ 鎖に ELISA、WB で反応せず、 $\gamma 2$ 融合鎖のみに反応する抗体を検索し、 $\gamma 2$ 融合鎖抗体 (抗体 X) を樹立した (図 1 下段)。

2) 3 種類の口腔癌細胞の mRNA および無血清培養上清を用いて、 $\gamma 2$ 融合鎖の mRNA 発現を半定量 RT-PCR、タンパク質の分泌を抗体 X による WB で検討し、2 種類の口腔癌細胞で $\gamma 2$ 融合鎖の mRNA 発現を確認した。一方、タンパク質レベルでの検出は、抗体 X の WB での検出限界以下となり、検出できなかった。

3) EGFR 変異のない低悪性度の肺がん細胞に $\gamma 2$ 融合遺伝子を強制発現させたトランスフェクタント細胞と Mock 細胞の 2D、3D 培養下の細胞増殖、トランスウェルチャンバーを用いた細胞運動、マトリゲルへの浸潤能を解析した結果、 $\gamma 2$ 融合鎖は Mock に比較して有意に運動性、浸潤性を亢進していた (図 2A、B)。一方、 $\gamma 2$ 融合鎖は 2D の培養条件下では、mock との増殖の有意な鎖が見られていないが、3D 増殖培養下ではがん細胞の増殖を亢進した (図 2A)。一方、 $\gamma 2$ 融合鎖の発現は EGFR を発現しない VMRC-LCD 細胞の増殖、運動には影響を与えない (図 2B)。以上より、 $\gamma 2$ 融合鎖は EGFR シグナルを活性化させることで、がん細胞の悪性化亢進に寄与していることが明らかとなった。

4) 口腔上皮内癌の集団浸潤において、癌細胞が集団で基底膜を壊すことなく間質組織に移動することが特徴となる。そこで、 $\gamma 2$ 融合鎖が口腔癌の発症、そして、その周囲の基底膜に及ぼす影響を $\gamma 2$ 融合鎖のコンディショナルノックイン・トランスジェニック (cKI-TG) マウスで解析した。検証した。まず、口腔上皮に $\gamma 2$ 融合鎖の発現を AAV-Cre により誘導する実験系を立ち上げた。マウス口腔内に AAV を投与し、20 週後の舌組織の基底膜、基底細胞の状況を病理解析した。まず、基底細胞の過増殖が観察され、その部分には $\gamma 2$ 融合鎖の発現が確認された。次に、基底膜を構成する $\gamma 2$ 鎖の発現を免疫組織染色により検討したところ、 $\gamma 2$ 融合鎖の発現する基底細胞直下の基底膜では、 $\gamma 2$ 鎖の発現が抑制されていた。この結果から、 $\gamma 2$ 融合鎖の発現が Lm-332 構成鎖である $\gamma 2$ 鎖の発現を抑制し、基底膜構造を脆弱にするなどの何らかの影響を与えている可能性が示唆された。今後、cKI TG マウス上皮構造の詳細な解析を進めることで、 $\gamma 2$ 融合鎖の発現が扁平上皮内癌の集団浸潤に関与する更なる可能性を検証する。

図1. $\gamma 2$ 融合鎖特異抗体の反応性の比較

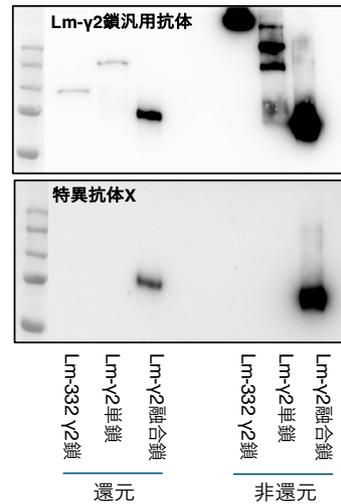


図2 Lm- $\gamma 2$ 融合鎖の発現は肺がん細胞増殖能 (A) と運動能 (B) を亢進

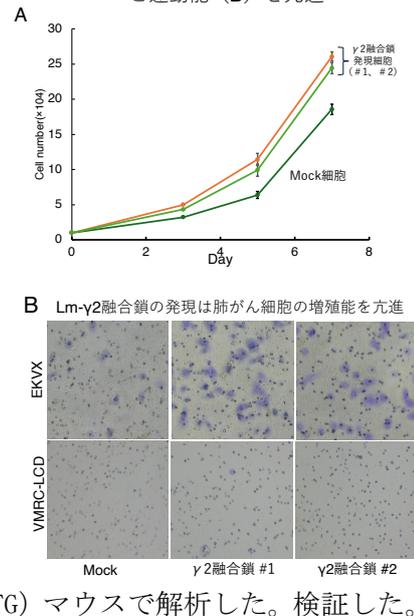


図3. $\gamma 2$ 融合鎖の発現は、舌上皮基底細胞の増殖を亢進 (20週)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Karashima Takashi, Umemoto Susumu, Kishida Takeshi, Osaka Kimito, Nakagawa Masatoshi, Yoshida Eisaku, Yoshimura Toru, Sakaguchi Masahiko, Nishimoto Hiroyuki, Tai Mami, Inoue Keiji, Seiki Motoharu, Koshikawa Naohiko, Shuin Taro	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical evaluation of urine laminin 2 monomer as a potent biomarker for non muscle invasive bladder cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2453 ~ 2462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5087	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 兼子峻、舟橋伸昭、吉村徹、山下太郎、越川直彦	4. 巻 in press
2. 論文標題 ラミニン 2 単鎖をバイオマーカーとした 肝発がん、遠隔転移の予測を可能とする新たな診断法の構築	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hoshino Daisuke, Kato Hisamori, Fukumura Kazuhiro, Mayeda Akila, Miyagi Yohei, Seiki Motoharu, Koshikawa Naohiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Novel <i>LAMC2</i> fusion protein has tumor promoting properties in ovarian carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4957 ~ 4967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15149	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 Asakura Nobuhiko, Nakamura Naotoshi, Muroi Atsushi, Nojima Yosui, Yamashita Taro, Kaneko Shuichi, Ikeda Kazuki, Koshikawa Naohiko, Suzuki Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Expression of Cancer Stem Cell Markers EpCAM and CD90 Is Correlated with Anti- and Pro-Oncogenic EphA2 Signaling in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8652 ~ 8652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168652	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 Yamashita Taro, Koshikawa Naohiko, Shimakami Tetsuro, Terashima Takeshi, et al.	4. 巻 74
2. 論文標題 Serum Laminin 2 Monomer as a Diagnostic and Predictive Biomarker for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 760 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31758	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13件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 兼子峻、舟橋伸昭、宮城洋平、越川直彦
2. 発表標題 新規ラミン融合遺伝子を発現するがん細胞の同定
3. 学会等名 第82回 日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 舟橋伸昭、岡田光、山下太郎、越川直彦
2. 発表標題 Lm- 2 単鎖により誘導される EGFR/AKT 経路を介した肝細胞がんの発症と悪性化に関する研究
3. 学会等名 第82回 日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川大空、越川直彦、舟橋伸昭
2. 発表標題 肝細胞癌における新規診断バイオマーカーのエピジェネティクスな発現・制御の研究
3. 学会等名 第32回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 舟橋伸昭、越川直彦
2. 発表標題 肝がんにおいて、ラミニン 2 単鎖はEGFR活性化を介してがん悪性化進展を促進する
3. 学会等名 第32回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koshikawa N, Kaneko R, Funahashi N.
2. 発表標題 Chromosomal translocation converts a laminin gene, LAMC2, into an oncogene in ovarian carcinoma
3. 学会等名 Tissue, Matrix, and Pathobiology: Joint Meeting of ASMB (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越川直彦
2. 発表標題 ラミニン 2単鎖をバイオマーカーとした肝発がん、遠隔転移の予測を可能とする新たな診断法の構築
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naohiko Koshikawa, Daisuke Hoshino, Yohei Miyagi
2. 発表標題 Identification of LAMC2-fusion gene as an oncoprotein produced by chromosomal translocation
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越川直彦、宮城洋平
2. 発表標題 新規ラミニン 2融合遺伝子による悪性化進展の分子機序の解明
3. 学会等名 第26回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越川直彦、山下太郎、中川将利、吉田栄作、吉村徹、金子周一、清木元治
2. 発表標題 新たな肝細胞がんを予測する新たなバイオマーカーとしての血清ラミニン 2モノマー
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟橋伸昭、岡田光、山下太郎、金子周一、清木元治、越川直彦
2. 発表標題 肝発がんにおけるLn- 2mの機能解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村直俊、室井敦、朝倉暢彦、野島陽水、榎本将士、鈴木貴、越川直彦
2. 発表標題 EphA2およびEGFRを介した肝細胞がん進展の数理モデリング
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝倉暢彦、室井敦、中村直俊、野島陽水、越川直彦、鈴木貴
2. 発表標題 がん幹細胞マーカーによる肝細胞がんの分類とEphA2シグナル伝達
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟橋伸昭、越川直彦
2. 発表標題 ラミニン 2単鎖が肝発がんおよび新たな機能の解析
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胆管増生を伴う肝細胞を検出するためのバイオマーカー	発明者 山下太郎、岡田 光、金子周一、舟橋伸昭、清木元治、越川	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-121616	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京工業大学生命理工学院 越川研究室 http://koshikawalab.bio.titech.ac.jp

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