

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20136

研究課題名(和文)新規EMT誘導転写因子を標的とし、難治性卵巣癌の腹膜進展制御を目指す新たな挑戦

研究課題名(英文)New challenge aiming at peritoneum development control of ovarian cancer by targeted new EMT transcriptional factor

研究代表者

関谷 龍一郎 (SEKIYA, RYUICHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：40712352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：PLAGL2(Pleimorphic adenoma gene like-2)は卵巣癌で発現が見られるC2H2 zinc-finger領域を有する転写因子である。今回、PLAGL2のホモログ遺伝子であるPLAG1、PLAGL1においても、アクチン細胞骨格及び細胞遊走能に変化を認めることがわかった。また、DNAマイクロアレイ解析にてPLAGL2の細胞死誘導メカニズムにいくつかの遺伝子が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：PLAGL2(Pleimorphic adenoma gene like-2), a member of the PLAG gene family, is a C2H2 zinc-finger transcriptional factor that is involved in cellular transformation and apoptosis. I found out that a change is also admitted in actin stress fiber and cell chemotactic activity in PLAG1 and PLAGL1 which are a homolog gene of PLAGL2. A possibility that several genes participate in a cell mortal lead mechanism of PLAGL2 in a DNA micro array analysis was suggested.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：PLAGL2 卵巣癌 RhoA Rac1 CHN1 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が細胞間接着を失い、転移浸潤を生じる過程は上皮性細胞様形態から間葉系細胞様形態へと変化する上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) に基づく現象であると考えられている。その中でもとくに乳癌、胃癌、脳腫瘍 (膠芽腫)、卵巣癌は EMT と抗癌剤耐性の関連が高いとされている。

我々は以前の研究で、C2H2 zinc-finger 領域を有する転写因子である Pleomorphic adenoma gene like-2 (PLAGL2) が卵巣癌細胞株である ES-2 細胞に対して、アクチン骨格の形成と細胞遊走能を促進していることを見出した。このような変化は、アクチン骨格形成を司る重要な因子である、Rho family small GTPase である RhoA と Rac1 の活性化によるものであることが示唆された。

2. 研究の目的

卵巣癌治療において抗癌剤耐性の獲得は予後に影響する重大な因子である。PLAGL2 を恒常的に発現する卵巣癌細胞株を作成する過程において、発現細胞株は増殖することなく消えていった。この現象から PLAGL2 の発現により細胞の増殖が静止したか、または細胞死が誘導された可能性が考えられた。そこで PLAGL2 の発現が、卵巣癌細胞の細胞死をどのような分子メカニズムで誘導しているかを解明する。また卵巣癌治療において、抗癌剤耐性能の獲得が予後に影響する重要な因子であり、抗癌剤耐性と EMT の関係が様々な癌腫でも報告されている。その中でも特に乳癌、胃癌、脳腫瘍、卵巣癌は EMT と抗癌剤耐性の関連が高いとされ、現在までに発表された文献や報告も増えてきている。そのことにより抗癌剤耐性を含めた癌の浸潤転移に関わるメカニズムの一端を解明することにより PLAGL2 等の EMT 関連転写因子をターゲットとした分子標的治療の可能性を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PLAGL2 がどのようなタンパク質複合体を形成し、そこに結合するタンパク質を同定し解析するために、PLAGL2 と同じ PLAG ファミリーである PLAGL1、PLAG1 についての機能解析を行う。PLAGL2 は 496 アミノ酸からなる転写因子でありホモログ遺伝子としての PLAGL1 と PLAG1 が存在している。PLAGL1 は p53 と関連し、腫瘍抑制因子として作用することが報告されている。一方、PLAG1 はいくつかの癌で変異が見つかり、癌との関連性が示唆されている。脂肪芽細胞腫、肝芽腫、唾液腺腫の多形的な促進に強く関わっているとの報告も見られる。PLAGL1、PLAG1 の siRNA をそれぞれ 2 種類設計し、ES-2 細胞を用いて発現を抑制し、その細胞株を用い形態変化、遊走能変化を確認する。

(2) PLAGL2 の発現が卵巣癌細胞株に動のような分子メカニズムで細胞死を誘導するか検討するため、PLAGL2 の発現を薬剤で誘導する系を複数の卵巣癌細胞株を用い作成。それらの細胞株において PLAGL2 発現が再防止を誘導するか確認し、その後、DNA アレイを用いて PLAGL2 が誘導する遺伝子の解析を行う。複数の細胞において PLAGL2 を発現誘導して 24、72 時間後に mRNA を抽出し、発現解析を行う。それらの遺伝子を解析ツールを用いて、細胞死に関連する遺伝子の発現に変化があるかを解析する。そしてそれらの遺伝子が PLAGL2 により直接転写されるのか、また PLAGL2 が活性化した二次的なシグナルにより転写されるのか検討する。

4. 研究成果

(1) PLAGL2 は 496 アミノ酸からなる転写因子であり、ホモログ遺伝子として PLAG1 と PLAGL1 が存在する。PLAG1 はいくつかの癌で変異が見つかり、癌との関連性が示唆されている。また、脂肪が細胞腫、肝芽腫、唾液腺腫の多形的な促進に強く関わっていることが報告されている。一方、PLAGL1 は p53 と関連し、腫瘍抑制因子として作用することが報告されている。

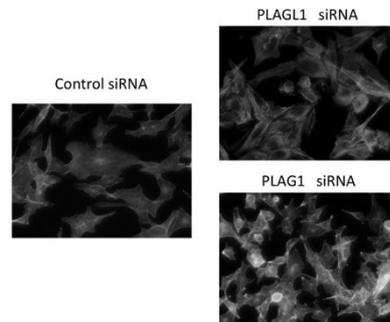


図1 PLAGL1、PLAG1発現抑制によるES-2細胞の形態変化

PLAG1、および PLAGL1 の siRNA を 2 種類設計し、ES-2 細胞を用いて発現抑制を行い、その形態変化及び細胞遊走能の変化を確認した。PLAG1 抑制細胞株では PLAGL2 抑制と同様にアクチンストレスファイバーの構築が見られ、細胞形態も上皮系細胞形態から間葉系細胞の形態を示し EMT が関与している可能性が示唆された (図 1)。PLAGL1 抑制細胞株ではアクチンストレスファイバーの構築は見られなかったものの、形態は PLAG1 と同様に上皮系細胞様形態から間葉

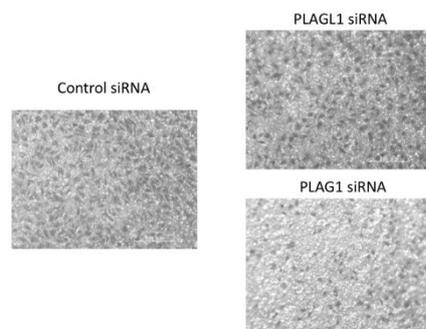


図2 PLAGL1、PLAG1発現抑制によるES-2細胞の遊走能変化

系細胞の形態に変化した。(図1)次に遊走能について検討した。siRNAにてPLAG1、PLAGL1を抑制し、Boyden chamberを使用し、2時間後、4時間後、6時間後の3段階に分けて確認した。その結果として、PLAG1抑制ではどの時間帯においてもcontrol群に比べ細胞遊走能が優位に低下していた。(図2)PLAGL1抑制でも同様にどの時間帯においてもcontrol群に比べ細胞遊走能が優位に低下していた。(図2)これらはPLAGL2における変化と同様であり、PLAG1、PLAGL1ともにPLAGL2と同様のアクチン骨格形成や細胞遊走能の促進に関与していることが示唆された。今後さらに、Rho family small GTPaseであるRhoAやRac1の活性やRAC GTP-bindingタンパクに特異的に作用するCHN1(chimerin1)との関連性についても検討する必要があると考えられる。

(2)MDA-MB-231細胞を使用しGFP融合蛋白としてPLAGL2を遺伝子導入しPLAGL2過剰発現株を作成したところ、細胞は増殖することなく消えていった。このことはPLAGL2は細胞死に何らかの影響を与えていることを示唆する結果であり、そのメカニズムを解明するためにPLAGL2発現抑制株のRNAによるマイクロアレイ解析を行った。PLAGL2の2種類のsiRNAを使用しES-2細胞によるPLAGL2抑制株を作成し、そのmRNAを抽出マイクロアレイ解析を行った。PLAGL2を抑制することによりKRTAP1-5、LYPD1、NNMT、EPHB6、CHRNA1、IGFBP7などの遺伝子が2種類ともsiRNAにて著大な上昇を認めていた。その上昇する複数の遺伝子よりIGFBP7、IGF-BPrP1をピックアップした。IGFBP7は、IGF-BPrP1とも呼ばれる因子で骨格筋新生過程において、IGFによる細胞増殖誘導には影響を与えずに骨格筋芽細胞の分化を抑制することが知られている。また、細胞周期G1期への停滞やアポトーシス誘導によるIGF非依存的な活性も報告されている。さらにEMT転写関連因子であるZEB-1(zinc finger E-box binding homeobox1)が多く悪性度の高い癌腫で認められているが、卵巣癌の抗癌剤耐性や転移浸潤にどの程度関連しているか明確には解明されていない。抗癌剤耐性や転移浸潤の獲得とEMTに関連する中で、EMT関連転写因子であるZEB-1との相互作用にはいくつかの報告があり、EMT転写因子によるEMTの促進から癌細胞の運動能や浸潤能の更新、ZEB1の機能を直接的に阻害するmiRNAの転写抑制により肝細胞性獲得や薬剤耐性能の亢進などが示唆されている。また慢性的な抗腫瘍薬剤への暴露によって腫瘍細胞の大部分はアポトーシスに向かうものの、EMT化しより悪性化、タイ性能を獲得するものが残され、その結果転移能が更新し、腹膜播種や転移が誘

導される可能性がある。今回、すでに樹立されている卵巣癌のパクリタキセル耐性化獲得細胞株においてZEB-1の発現上昇、E-cadherin発現低下を認め、EMTを介したパクリタキセル耐性、転移浸潤能が更新することを示した。そこで今後はPLAGL2、RhoA、Rac1とZEB-1との関連性についても検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Yoshikawa N, Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Niimi K, Mitsui H, Sekiya R, Suzuki S, Shibata K, Callen D, Kikkawa F. PRIMA-1MET induces apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species irrespective of p53 status and chemo-sensitivity in epithelial ovarian cancer cells. *Oncology Reports*. 査読あり 2016 May;35(5):2543-52 doi: 10.3892/or.2016.4653.

Suzuki S, Sakata J, Utsumi F, Sekiya R, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Efficacy of glypican-3-derived peptide vaccine therapy on the survival of patients with refractory ovarian clear cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 査読あり 2016 Sep 30;5(11):e1238542. doi: 10.1080/2162402X.2016.1238542

Sakata J, Kajiyama H, Suzuki S, Utsumi F, Niimi K, Sekiya R, Shibata K, Senga T, Kikkawa F. Impact of positive ZEB1 expression in patients with epithelial ovarian carcinoma as an oncologic outcome-predicting indicator. *Oncology Letter*. 査読あり 2017 Oct;14(4):4287-4293. doi: 10.3892/ol.2017.6658.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 龍一郎 (SEKIYA, Ryuichiro)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：40712352

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()