

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390419

研究課題名(和文)新規がん関連上皮細胞による、がん悪化促進機構に関する研究

研究課題名(英文) Investigation into mechanisms of cancer aggressiveness by epithelial cells undergoing EMT

研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH, Masao)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90345041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「新規がん関連上皮細胞による、がん悪化促進機構に関する研究」の課題の下、研究を遂行した。がん関連上皮細胞に発現するマーカー分子をDNAマイクロアレイなどを用いて同定し、がん細胞や、線維芽細胞などで検討した。複数の遺伝子を解析した結果、比較的悪性度の高いがん細胞に発現する2種類の分子マーカー(RetとPai2)と、非常に悪性度の高いがん細胞に発現する分子マーカー(ITGA3)を得た。またITGA3は、癌微小環境内の線維芽細胞にも染色されることが判明した。これらの研究成果は複数の論文で発表し、現在新たなgeneZを含め、解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：I performed experiments based on "Investigation into mechanisms of cancer aggressiveness by epithelial cells undergoing EMT". Using DNA microarray analyses, I explored several molecular marker proteins which are specifically expressed in epithelial cells undergoing EMT. I found that the marker proteins, Ret and Pai2, are expressed in aggressive cancer cells, whereas the marker protein (ITGA3) is in the most aggressive cells. However, ITGA3 was also expressed in fibroblast or mesenchymal cells in cancer microenvironment, as determined by immunohistochemical analyses. These findings have been published in articles and the details, including gene Z, will be investigated by me and my collaborators.

研究分野：分子病理学

キーワード：EMT TGF-beta がん細胞 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

EMT は、がん細胞を悪性度の高い低分化型形質への分化機構として作用している。一方、研究代表者はこれまでの EMT 研究の中で、EMT を非常に強く誘導するサイトカインである TGF- β に着目し、TGF- β 誘導性 EMT の分子機構の一部を解明してきた。その研究の中で、ごく最近、がん細胞が産生する TGF- β が、がん周囲の正常上皮細胞に EMT を誘導し、異種の複数な間葉細胞を発生させており、特に FGF-2 などの増殖因子との協調作用により、浸潤/運動性や細胞外基質分解酵素産生能が劇的に亢進した、がん関連上皮細胞 (EDAF 細胞) に分化誘導させることを見出した。さらに、EDAF 細胞が、がん細胞のコラーゲン内浸潤を助長することを見出した。故に EMT が、がん細胞以外の正常上皮細胞などにも関与し、がんの悪化を促していることを明らかにしている(,)。

2. 研究の目的

EDAF 細胞によるがん細胞浸潤促進機構を解明するために、EDAF 細胞の特性を知る必要がある。さらに、EDAF 細胞の生体内動態を評価することは、新たな癌の悪性度診断法や制癌法の開発への応用が期待され、非常に重要である。しかし、現時点では EDAF 細胞が、CAF 特有のマーカー分子を非発現な未知な細胞であり、一般的な間葉細胞の分子マーカー以外に特異分子マーカーも不明であることから、生体内で EDAF 細胞を鑑別評価・同定することは不可能である。TGF- β と FGF-2 などの増殖因子との協調作用の結果、EDAF 細胞への分化がおこるが、その際、多くの遺伝子の選択的スプライシングが関与する事がわかっている(,)。そこで、これまでに施行した、網羅的なエクソンアレイと DNA マイクロアレイの蓄積したデータなどをもとに、EDAF 細胞への分化機構を明らかにし、総合的に特異分子マーカーを同定する。その結果を、マウスやヒト病理標本での解析に応

用し、EDAF 細胞の生体内での機能を解明し、新規ながん診断に展開させることを目的とした。

3. 研究の方法

EDAF 細胞は TGF- β と FGF-2 との協調作用により発生する。これまでの DNA マイクロアレイならびにエクソンアレイ解析のデータを下に、EDAF 細胞の分化制御を司るシグナル分子ならびに EDAF 細胞に特異的なマーカー分子の探索を行った。第一に、シグナル分子や転写因子に焦点を当て、得られた分子を分子生物学的に解析し、分化機序やがん細胞の浸潤を促進させる分子機構を解明する。第二に、細胞骨格などの分子に焦点を当て、得られた分子の抗体を入手しマーカー分子を探索する。その後、ヒトがん細胞をマウスに移植した標本での宿主由来 EDAF 細胞の発現挙動を検討し、ヒトの病理標本を用い悪性度との相関を解析する。

4. 研究成果

本研究では、DNA マイクロアレイのデータをもとに、TGF- β と FGF-2 で発現が劇的に上昇する 4 つの遺伝子 (Ret, ITGA3, Pai2, geneZ) に着目した。まず、DNA マイクロアレイのデータをリアルタイム PCR にて検証した。その後、EDAF 細胞に発現を検討する前に、これらの遺伝子の発現とがん悪性度との相関を約 20 種類の悪性度の異なる乳癌細胞で検討した。予想に反し、Ret の mRNA レベルならびにタンパク質レベルとも悪性度と逆相関する結果となり、Pai2 の mRNA レベルは乳癌の悪性度と大きな相関を見出せず、タンパク質レベルは市販の抗体の問題で検出することが出来なかった。一方、ITGA3 は乳癌の悪性度と非常に相関することが分かった。ITGA3 のノックダウンや中和抗体を用いると細胞運動が抑制されることから、ITGA3 が、がん細胞の運動促進に関与していた。一方、ITGA3 の発現が高い細胞では、EMT 誘導転

写因子である ZEB1 と ZEB2 の発現も高く、ERK 活性も非常に亢進していることもわかった。また、ERK の活性化分子である MEK の阻害剤である U0126 を用いると ZEB1 と ZEB2 の発現のみならず ITGA3 の発現も低下した。したがって、これらの遺伝子発現の転写には ERK が深く関与していることが生化学的な解析のみならず病理学的解析からも

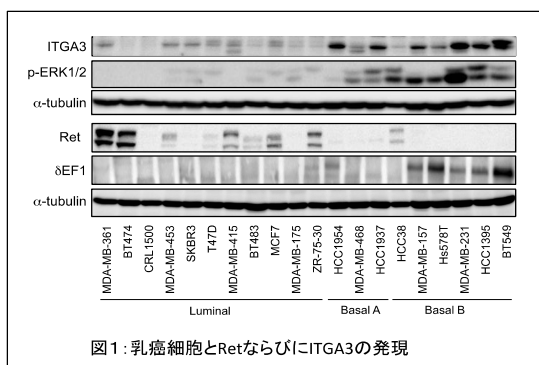


図1: 乳癌細胞とRetならびにITGA3の発現

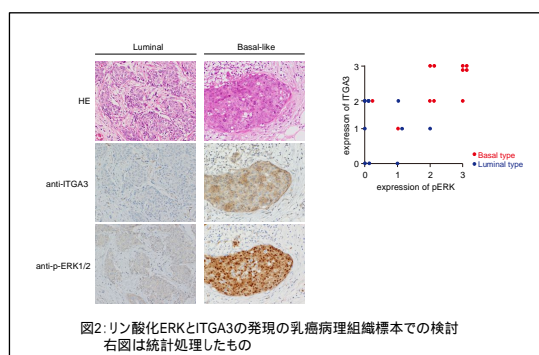


図2: リン酸化ERKとITGA3の発現の乳癌病理組織標本での検討
右図は統計処理したものの

判明した(図1,2)。したがって、ITGA3 が新たな EMT の分子マーカーとして、また乳癌の悪性度の指標となる可能性を明らかにできた。これらの解析は乳癌細胞や乳癌組織を中心として得られた結果であり、現在、口腔・頭頸部領域のがんでも検討を進めている。次に、TGF-β と FGF-2 で分化産生させた EDAF 細胞での ITGA3 の発現を in vitro で確認し、実際病理標本で ITGA3 の発現の検討を試みた。しかしながら、悪性度の高い癌細胞にも染色が認められ、EDAF 細胞のみの特異的発現を確認することはできなかった。また、geneZ に関しては、現在解析を進行中であり、これまで同様に乳癌細胞や線維芽細胞での発現をさまざまな手法で検討している。

一方、EMT 時には mRNA の選択的スプライシングの変化が起こることをすでに発見し

報告している。エクソンアレイのデータなどを用い、新たに Rac1 の選択的スプライシングを見出した。これまでに、研究代表者らは EMT 時の選択的スプライシング因子として ESRPs を見出しており、これらの関連性を、口腔癌細胞で検討した。ESRP をノックダウンすることにより、Rac1 は Rac1b と選択的スプライシングが変化し、それに伴い高い浸潤能を示した(図3)。したがって、Rac1b が新たな EMT の分子マーカーとして機能する可能性があり、現在、この Rac1b と EDAF 細胞との関連性も検討している。これらの結果はすでに英文学術誌に投稿し受理されている。

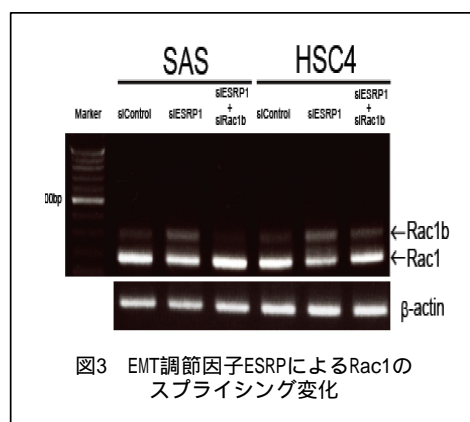


図3 EMT調節因子ESRP1によるRac1のスプライシング変化

<引用文献>

- Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K and Saitoh M. TGF-β drives epithelial-mesenchymal transition through δEF1-mediated downregulation of ESRP. **Oncogene** 2012 31:3190-3201
- Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF-β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. **EMBO J.** 2011 30:783-795

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Saitoh M, Endo K, Furuya S, Minami M, Fukasawa A, Imamura K, Miyazawa K. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF- β signals that induce Snail expression **Oncogene** 2015 in press (査読有) doi: 10.1038/onc.2015.161.

Saitoh M. The epithelial–mesenchymal transition is regulated at the post-transcriptional levels by TGF- β signaling during tumor progression **Cancer Sci.** 2015 in press (査読有) doi: 10.1111/cas.12630.

Kawasaki T, Ishida M, Tada T, Matsuya H, Saitoh M, Sato A, Suzuki M, Sugimoto R, Mue Y, Uesugi N, Ishida K, Ishida K, Ariga H, Ichihara S, Sugai T, Sapino A. Well-differentiated neuroendocrine tumor of the breast with recurrence due to needle tract seeding. **Virchows Arch.** 2015 in press (査読有) doi: 10.1007/s00428-014-1704-5.

Fukagawa A, Ishii H, Miyazawa K, Saitoh M. δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. **Cancer Med.** 2015 4:125-135. (査読有) doi: 10.1002/cam4.347.

Ishii H, Saitoh M, Sakamoto K, Kondo T, Katoh R, Tanaka S, Motizuki M, Masuyama K, Miyazawa K. Epithelial splicing regulatory protein 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. **J. Biol. Chem.** 2014 289:27386-27399 (査読有) doi: 10.1074/jbc.M114.589432.

Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, Miyazawa K, Saitoh M. Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing EMT and of cancer cells with aggressive phenotypes. **Cancer Sci.** 2013

104:1189-1197. (査読有) doi: 10.1111/cas.12220.

Motizuki M, Isogaya K, Miyake K, Ikushima H, Kubota T, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K. Oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . **J. Biol. Chem.** 2013 288:18911-18922 (査読有) doi: 10.1074/jbc.M113.480996.

Saitoh M, Shirakihara T, Fukasawa A, Horiguchi K, Sakamoto K, Sugiyama H, Beppu H, Fujita Y, Morita I, Miyazono K, Miyazawa K Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells **PLOS ONE** 2013 13:8:e62659 (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0062659.

Saitoh M and Miyazawa K. Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. **J Biochem.** 2012 151:563-571 (査読有) doi: 10.1093/jb/mvs040.

[学会発表](計 12 件)

Masao Saitoh: ZEB1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Masao Saitoh: Roles of Stat signaling in the induction of Snail by TGF- β . TGF- β meeting 2014.5. 8-10 Leiden University (Leiden, Nederland)

Masao Saitoh: Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing EMT and of cancer cells with aggressive phenotypes TEMTIA 2013.11.13-16, Allicante Hotel (Allicante, Spain)

齋藤正夫: Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing

epithelial mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes 第 55 回 歯科基礎医学会総会 2013.9.21 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

Masao Saitoh: Role of TGF- β superfamily signals in EMT and epithelial cell polarity 第 86 回日本生化学会総会 2013.9.13 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Masao Saitoh: Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing EMT and of cancer cells with aggressive phenotypes FASEB, J2013.7.28-8.2 Steamboat Hotel (Steamboat Springs, USA)

齋藤正夫: TGF- β 誘導性 EMT と癌微小環境 第 45 回結合組織学会 第 60 回マトリックス研究会大会 合同大会 2013.6.29 和歌山県立医科大学 (和歌山県・和歌山市)

Masao Saitoh: FGF-2 accelerates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition AACR meeting” Tumor Invasion and Metastasis conference” 2013.1.21 Omni San Diego Hotel (San Diego, USA)

Masao Saitoh: FGF-2 accelerates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition The TGF- β symposium 2012.10.29-30 昭和薬科大学 (東京都・町田市)

Masao Saitoh: Role of TGF- β superfamily signals in EMT and cancer progression 第 71 回日本癌学会総会 2012.09.21 ホテルロイトン札幌 (北海道・札幌市)

齋藤正夫: TGF- β 誘導性 EMT の分子機構 第 54 回歯科基礎医学会総会 2012.9.25 奥羽大学 (福島県・郡山市)

Masao Saitoh: Role of BMP signaling in TGF- β -mediated EMT TGF- β meeting 2012.08.30 Leiden University (Leiden, Nederland)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH, Masao)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：90345041

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(3) 研究協力者

遠藤 香織 (ENDO, Kaori)
坂本 啓 (SAKAMOTO, Kei)
石井 裕貴 (ISHII, Hiroki)
星 裕太 (HOSHI, Yuta)
深川 彰彦 (FUKAGAWA, Akihiko)
古谷 智 (FURUYA, Satoshi)
宮澤 恵二 (MIYAZAWA, Keiji)
川崎 朋範 (KAWASAKI, Tomonori)