

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462045

研究課題名(和文) 癌微小環境における RhoA 関連蛋白質 GCF2 の発現制御と転移浸潤メカニズムの解析

研究課題名(英文) Functional analysis of GCF2 in tumor microenvironment

研究代表者

大塚 英郎 (Ohtsuka, Hideo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50451563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：癌微小環境、特に上皮間葉移行(EMT)における細胞骨格調節因子GCF2/LRRFIP1の関与を明らかにするため研究を行った。膵癌細胞株でGCF2の発現を抑制することで、上皮系マーカーE-カドヘリンの発現が上昇、間葉系マーカーのビメンチンは発現が低下し、さらに機能的にも細胞の移動能・浸潤能が低下することが明らかとなった。そのメカニズムとして、GCF2はWnt signalにおける β -カテニンの核内移行を調節することでEMTを制御している可能性が示唆された。以上よりGCF2の発現を抑制することで癌細胞に上皮系の形質転換(Reversing EMT)を起こし、浸潤・転移を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway has been shown to promote the epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is a crucial process in multiple embryonic developmental processes and the progression of carcinomas. In the present study, we identified the signaling elements targeted by GCF2 for promotion of the EMT in pancreatic cancer. GCF2 silencing reversed the EMT, as shown by increased expression of E-cadherin (an epithelial marker) and decreased expression of vimentin (a mesenchymal marker). Silencing of GCF2 up-regulated phosphorylation of β -catenin and decreased its nuclear localization by targeting β -catenin destruction complex. The migration and invasion capabilities were strongly inhibited in GCF2 knocked down pancreatic cancer cells. Consequently, our data strongly suggested that LRRFIP1 played an important role in the invasion of carcinoma cells and as an attractive candidate for targeted therapy in human cancers.

研究分野：消化器外科学

キーワード：GCF2 LRRFIP1 EMT Wnt signal 膵癌

1. 研究開始当初の背景

GCF2/LRRFIP1 (以下 GCF2) は米国国立癌研究所の Alfred Johnson 博士らが 1998 年にクローニングした 752 アミノ酸よりなる蛋白質である。博士らは、GCF2 が細胞の核内で EGFR のプロモーター領域と結合しその転写を抑制する事を明らかにした (Reed AL, et al, J Bio Chem, 1998)。他方、Fong らは、actin 関連蛋白質 Flightless-1 の Leucine Rich Repeat (LRR) 領域を bait として Yeast two hybrid を行い、GCF2 が Flightless-1 と結合することを報告し、actin を中心とした細胞骨格の調節に参与することを示唆した (Fong KS et al, Genomics, 1999)。

GCF2 は正常組織のみならず、乳癌、子宮頸癌、肺癌、大腸癌、膵癌など多くの癌種でも高い発現を認めることから、我々はこれまで、とくに癌細胞における GCF2 発現とその機能解析に従事し、細胞骨格、運動調節機構に関してさまざまな興味深い知見を得ている。その機能に関して、LRRFIP1 が Wnt signal の重要な mediator である Dvl と細胞質において結合し、Wnt canonical pathway、non-canonical pathway のいずれのシグナルも活性化することを報告した (Ohtsuka H, et al. Int. J. Cancer 2011)。さらに、small G protein である RhoA の活性化を制御することで、細胞の浸潤能、転移形成能を促進すること、発現抑制細胞株の免疫不全マウスへの移植実験で、肝転移形成に深く関与することを報告してきた (Ariake K, et al. Cancer Lett. 2012)。

近年、乳癌細胞株と血管内皮細胞との共培養系で mRNA 発現をマイクロアレイにて検討したところ、癌細胞で GCF2 mRNA 発現が著明に上昇することが報告された (Buess M, et al. Neoplasia 2009)。また、GCF2 が血小板の血栓形成能に深く関与するとの報告 (Goodall AH, et al. Blood 2010) もあり、血管内皮あるいは細胞外基質との相互作用など癌微小環境において、GCF2 が細胞接着能、骨格調節等の機能を有し、その転移形成能に参与することが示唆される。さらに GCF2 遺伝子の癌組織における発現に関して、2006 年に Sjöblom らは乳癌および大腸癌で高率に変異を認める遺伝子として 189 の遺伝子を同定したが、GCF2 (LRRFIP1) も Cancer associated gene の 1 つとして報告されている (Sjöblom T, et al. Science 2006)。これらの報告より、GCF2 が癌細胞の悪性化に深く関与していることが示唆されるが、その機能については不明な点が多い。

2. 研究の目的

癌の微小環境下における GCF2 の細胞骨格、接着・移動能への関与の詳細な解析を通じて、癌細胞の悪性化、特に浸潤転移能への関与を明らかにすることを目的とする。

これまでの研究により血管内皮細胞や外基質との相互作用など、癌の微小環境において GCF2 の発現が変化する可能性が示唆されている。これらの研究を継続・発展させることで GCF2 の発現解析、GCF2 遺伝子の転写調節機構について明らかにするとともに、そのような微小環境下における GCF2 の機能、特に癌細胞の転移形成、浸潤能へ関与についてさらに詳細な検討をおこなう。さらに GCF2 は small G 蛋白の活性化制御を介して骨格調節能を有すると考えられることから、癌細胞における細胞骨格の変化と深く関連する上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition) への関与について明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株と膵癌組織切片における GCF2 と E-カドヘリンの発現解析

膵癌切除標本の組織切片を用いて、癌の浸潤部における EMT マーカーの発現、GCF2 の発現変化を免疫組織染色法により解析した。

(2) GCF2 の発現調節による EMT マーカーの発現変化とその細胞学的特徴

GCF2 の発現抑制細胞および GCF2 強制発現細胞における各種 EMT マーカーの発現とその変化を解析する。

(3) EMT signal pathway 上における GCF2 の機能解析

TGF- β や TNF- α などの EMT を誘導するサイトカインを培養細胞に添加した際の GCF2 の発現の変化を検討した。また EMT signal pathway における GCF2 の関与について、特にその Wnt activator としての機能より解析をおこなった。

(4) 膵癌抗がん剤感受性における GCF2 の関与

GCF2 の EMT への関与が明らかとなったことから、GCF2 の発現と癌細胞における抗がん剤感受性について検討を行なった。

(5) GCF2 遺伝子の転写調節機構の解析

これまでの研究により血管内皮細胞や外基質との相互作用など、癌の微小環境において GCF2 の発現が変化する可能性が示唆されている。GCF2 遺伝子の転写開始点より約 2000bp 上流域の塩基配列をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイ用ベクターに組み込み、レポーターアッセイを行う。サイトカインや各種増殖因子添加時の転写活性の変化などを解析することで、癌微小環境化の GCF2 の転写調節機構について検討をおこなう。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株と膵癌組織切片における GCF2 と E-カドヘリンの発現について

膵癌細胞株 5 種類を用いた検討で、上皮系マーカーである E-カドヘリンを強く発現している細胞株では、LRRFIP1 の発現が低く、逆に、間葉系マーカーであるビメンチンを強く発現している細胞株では、LRRFIP1 の発現が強い傾向が認められた。また膵癌組織切片の LRRFIP1 と E-カドヘリンの免疫染色を HistoFAXS を用いて解析した結果、LRRFIP1 と E-カドヘリンの発現は負に強い相関 (Pearson, $R = -0.80$) を示すことが明らかとなった。

(2) GCF2 の発現調節による EMT マーカーの発現変化とその細胞学的特徴

LRRFIP1 の強制発現癌細胞株では EMT マーカーに変化はなかったが、LRRFIP1 発現抑制癌細胞株では、E-カドヘリンの発現上昇およびビメンチンの発現低下を認め、機能的にも移動能・浸潤能が低下していた。すなわち、LRRFIP1 の発現抑制により癌細胞株は、上皮系の形質をさらに獲得するという“Reversing EMT”を起こしていることが示唆された。

(3) EMT signal pathway 上における GCF2 の機能解析

EMT を誘導する代表的なサイトカインである TGF- β (transforming growth factor- β) や TNF- α (tumor necrosis factor- α) を LRRFIP1 の発現抑制膵癌細胞株に添加し、EMT を誘導してもその誘導が減弱され浸潤能も抑制されていることが分かった。以上より、LRRFIP1 の発現抑制は、癌細胞の形質をより上皮系にする (Reversing EMT) という癌の浸潤・転移の阻止において重要な機能を有していると考えられた。

さらに分子生物学的な解析で、EMT の誘導にも関与する Wnt シグナルの β -カテニン経路において、LRRFIP1 は、その中核を担う β -catenin destruction complex とのタンパク質間相互作用を通じて、 β -カテニンの核内移行を regulate し、EMT の誘導に重要な機能を有していることが明らかとなった。特に LRRFIP1 発現抑制癌細胞株では、 β -カテニンの核内移行が阻害され、E-カドヘリンの発現を直接制御する Snail、Slug や Twist などの転写因子の発現が有意に低下、それにより E-カドヘリンの発現が上昇し、上皮系の形質を獲得する可能性が示唆された。

(4) 膵癌抗がん剤感受性における GCF2 の関与

膵癌細胞株 4 種 (Panc1, MiaPaca2, ASPC1, BxPC3) でゲムシタピン感受性と GCF2 の発

現量について検討を行った。ゲムシタピン感受性の最も低い Panc1 で GCF2 の発現量は最も多く、またゲムシタピン感受性の最も高い BxPC3 で GCF2 の発現量は最も少ないが明らかとなったことから、ゲムシタピン感受性と GCF2 発現量に負の相関が示唆された。GCF2 発現量の多い Panc1 および MiaPaca2 の 2 種の細胞株で GCF2 の発現を抑制すると、ゲムシタピン添加時の生細胞の比率が有意に減少、カスパーゼアッセイなどから細胞のアポトーシスが著明に促進することが示された。そのメカニズムとして、GCF2 発現抑制膵癌細胞株ではゲムシタピン添加時の JNK および c-jun のリン酸化が強く促進されており、そのアポトーシス誘導への関与が強く示唆された。

(5) GCF2 遺伝子の転写調節機構の解析

GCF2 遺伝子の転写調節機構を解析するため、GCF2 遺伝子の転写開始点より約 2000bp 上流域の塩基配列をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイ用ベクターの作成を行っている。

以上の結果より、GCF2 は癌細胞における EMT の制御に深く関与していると考えられた。LRRFIP1 の発現抑制癌細胞株では、Wnt/ β -カテニンシグナル経路が抑制され、 β -カテニンの核内移行が阻害される。一方、 β -カテニンは、もう 1 つの機能である E-カドヘリンの細胞内ドメイン結合分子として、細胞膜上に発現を強め、同時に E-カドヘリンの発現も上昇していると考えられた。このことから癌細胞はさらに上皮系形質を獲得し、移動能・浸潤能が抑制されていると考察された。以上のことから、LRRFIP1 の機能を阻害することで、EMT の制御を介して癌の浸潤・転移を制御する可能性が考えられ、有望な治療標的であると考えられた。以上の知見について、欧文誌「Cancer Letters」にて発表した (Douchi D, et al. Cancer Lett. 2015)。

さらに、癌細胞の EMT が抗がん剤感受性に深く関与することから、GCF2 の発現と抗がん剤感受性について、おもに膵癌とゲムシタピン感受性について検討を行った。GCF2 の発現を抑制し、上皮系の性質を獲得した癌細胞では、ゲムシタピンによるアポトーシス誘導が強く促進し、その感受性が高くなることがあきらかになった。また、そのメカニズムとして GCF2 発現抑制癌細胞ではゲムシタピン添加時の JNK および c-Jun の活性化が強く促進すること、さらにゲムシタピンなど細胞のストレス障害の細胞内の modulator である Rac を阻害することで JNK の活性化が起こらなくなることから、SAPK/JNK pathway の関与が強く示唆された。以上の知見について現在欧文誌に論文投稿中である。

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1件)

(1)Douchi D, Ohtsuka H, Ariake K, Masuda K, Kawasaki S, Kawaguchi K, Fukase K, Oikawa M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Silencing of LRRFIP1 reverses the epithelial-mesenchymal transition via inhibition of the Wnt/ -catenin signaling pathway. Cancer Lett. 2015 Aug 28;365(1):132-40. doi:10.1016/j.canlet.2015.05.023. (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

(1)堂地大輔, 大塚英郎, 有明恭平, 深瀬耕二, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明. Silencing LRRFIP1 reverses epithelial -mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ -catenin signaling pathway 第73回日本癌学会総会 パシフィコ横浜(横浜市)(2014年9月26日)

(2)堂地大輔, 大塚英郎, 海野倫明. Functional analysis of GCF2/LRRFIP1 in the tumor microenvironment 第22回日本がん転移学会学術集会 ホテルブエナビスタ(松本市)(2013年7月11日)

(3)堂地大輔, 大塚英郎, 有明恭平, 深瀬耕二, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明. がん微小環境における新規細胞骨格調節因子 GCF2/LRRFIP1 の機能解析. 第68回日本消化器外科学会総会 シーガイアコンベンションセンター(宮崎市)(2013年7月19日)

〔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

大塚 英郎(Ohtsuka, Hideo)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 50451563

(2)研究分担者

元井 冬彦(Motoi, Fuyuhiko)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 30343057

深瀬 耕二(Fukase, Koji)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 00578677

(3)連携研究者

()

研究者番号: