

平成 30 年 8 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20559

研究課題名(和文) 1 1インテグリンを介した癌進展メカニズムの解明と増殖抑制法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the cancer progression through the $\alpha 1\beta 1$ integrin pathway for establishment of a novel treatment for tumor growth

研究代表者

小池 一幸 (KOIKE, KAZUYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：10618060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Semaphrin7A(SEMA7A)遺伝子は口腔癌由来細胞株、口腔癌臨床サンプルにおいて発現増強しており、その発現を抑制した形質転換細胞株を用いた検証から、特にMAPK経路を介した細胞周期調節によって原発腫瘍の増殖能および転移能に強く影響を及ぼすことが示唆された。さらに、SEMA7Aの抑制に伴い、様々なインテグリン関連遺伝子、ターゲット遺伝子が影響を受けることが確認され、SEMA7Aの制御により、口腔癌の進展を制御する可能性が示された。したがって、本研究結果は、SEMA7Aを分子標的とした新たな分子標的治療の礎となると考えられ、今後の臨床応用の際に有益なデータになると思われる。

研究成果の概要(英文)：Significant SEMA7A upregulation was detected in the cell lines and most primary OSCCs compared with the normal counterparts. The SEMA7A expression level was correlated closely with tumoral size and metastasis. In vitro, cellular growth, migration, and invasion in SEMA7A knockdown cells significantly decreased with inactivated extracellular regulated kinase (ERK), and cell-cycle arrest at the G1 phase resulting from upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors, including p21Cip1 and p27Kip1. These data indicated that SEMA7A may play a role in OSCCs via MAPK signaling cascades, making it a potentially useful diagnostic/therapeutic target for use in patients with OSCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：1 1インテグリン Semaphrin7A 口腔扁平上皮癌 microarray 増殖抑制法

1. 研究開始当初の背景

癌細胞における増殖、浸潤、転移などの性質を決定するシグナル伝達経路に作用する様々な因子や遺伝子に関する研究が、現在、盛んに行われている。このシグナル伝達経路とそれに対する作用因子や遺伝子の組み合わせが明らかになれば、癌の性質（悪性度）や、治療上の注意点を事前に予測診断することが可能である。また、これらの組み合わせの系における扇の要となる遺伝子・因子は癌治療における分子標的となり、これに作用する薬剤は分子標的治療薬として癌治療に大きな進歩をもたらす可能性がある。

本研究では、インテグリンに着目した。インテグリンは、癌細胞の転移に関係していると既に報告がされている重要な接着因子であるが、非常に複雑な癌細胞転移メカニズムの詳細（増殖性、細胞運動性、血管新生誘導能、周囲細胞とのクロストーク等々）はまだわかっていない。また、インテグリンは単に重要な接着因子であると言うだけでなく、シグナル伝達に重要な役割を担い、癌細胞の性質決定に大きな影響を与えることが知られている。さらに、一言にインテグリンと呼称されるが、インテグリンの構成ドメインにより、インテグリンへの結合因子やシグナル伝達経路、さらにはその細胞活動への影響などが異なっている。

本研究に先立ち、口腔癌細胞株 2 種に対する microarray 解析を行い、以下の結果を得た。(1)口腔癌細胞において発現増強している遺伝子群の中で、口腔癌において高発現をしているインテグリンの構成ドメインとして $\alpha 1$ と $\beta 1$ を同定した。(2) 口腔癌における高発現を示した遺伝子群の中から、 $\alpha 1\beta 1$ インテグリンに作用する遺伝子として Semaphorin 7A (SEMA7A)を同定した。

本研究ではインテグリンを単なる接着因子ではなく、複雑な機能を有するシグナル伝達系の受容体として位置付け、既に同定した SEMA7A についてターゲット遺伝子や細胞周期への影響等を含めて詳細に解析することで、新たな癌治療を開発するためのシーズ研究となり、臨床的にも社会的にも重要な研究であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では既に同定した SEMA7A について、口腔癌における SEMA7A の発現状態やその臨床的・分子生物学的意義について、*in vitro*, *in vivo* の両面から明らかにすることを目的とする。さらには SEMA7A が作用するシグナル伝達経路について明らかにし、SEMA7A 制御により癌細胞の進展を抑制する治療法の開発について検討する。

3. 研究の方法

(1) 多くの口腔癌由来細胞株および臨床サンプルに関して、SEMA7A が高発現していることを確認する。

口腔癌由来細胞株における SEMA7A の mRNA、タンパクレベルの発現状態について、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析する。

臨床サンプルにおける SEMA7A の発現状態について、リアルタイム PCR、免疫組織化学染色法を用いて解析する。

臨床諸指標と SEMA7A の発現状態との関係を検討し、その臨床的意義を明らかにする。

(2) SEMA7A の遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製し、それをもちいた機能解析およびマウス移植実験を行い、増殖・浸潤・転移における SEMA7A の役割を明らかにする。

培養細胞に SEMA7A 遺伝子の shRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製する。

形質転換細胞を用いた増殖能試験、浸潤能試験、遊走能試験により SEMA7A が増殖、浸潤、遊走に与える影響を検討する。

細胞周期への影響を明らかにする。

形質転換細胞を用いたマウス移植実験により、*in vivo* における腫瘍の増殖・転移に関する SEMA7A の役割を明らかにする。

(3) 形質転換細胞と親株の発現状態の比較により、作用するターゲット遺伝子や細胞周期への影響を明らかにする。

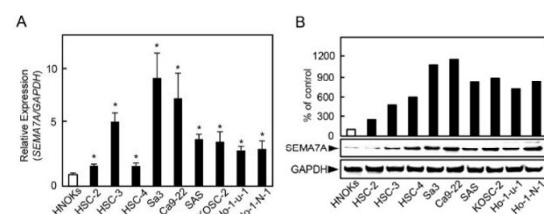
SEMA7A の $\alpha 1\beta 1$ インテグリンのシグナル伝達経路への影響を明らかにする。

形質転換細胞と口腔癌由来細胞株（親株）の発現状態を microarray 解析にて網羅的に解析し、どのようなターゲット遺伝子に作用するかを検討する。

4. 研究成果

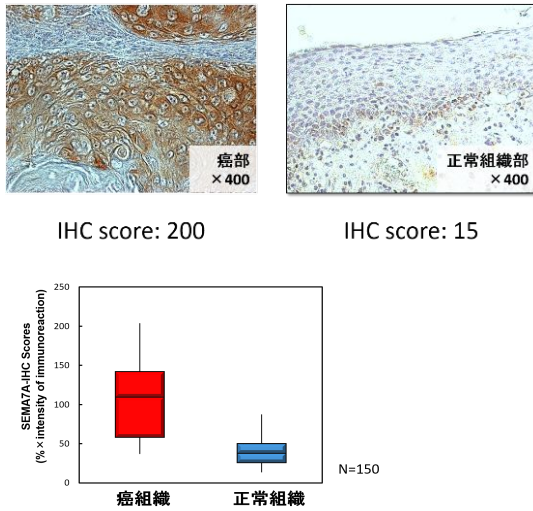
(1) 多くの口腔癌由来細胞株および臨床サンプルに関して、SEMA7A が高発現していることを確認する。

口腔癌由来細胞株における SEMA7A の mRNA、タンパクレベルの発現状態について、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析したところ、いずれも有意な発現亢進を認めた。(図 1)



(図 1:SEMA7A の発現確認 A:リアルタイム PCR、B:ウエスタンブロット法)

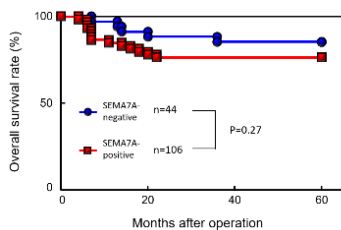
臨床サンプルにおける SEMA7A の発現状態について、免疫組織化学染色法を用いて解析したところ、正常組織部に比較して腫瘍部において有意な発現亢進を認めた。(図 2)



(図 2: 臨床サンプルにおける SEMA7A の発現状態 (免疫組織化学染色))

臨床諸指標と SEMA7A の発現状態との関係を検討したところ、腫瘍径と有意な相関関係を認めた。(表 1) また 5 年生存率に有意差は認めなかった。(図 3)

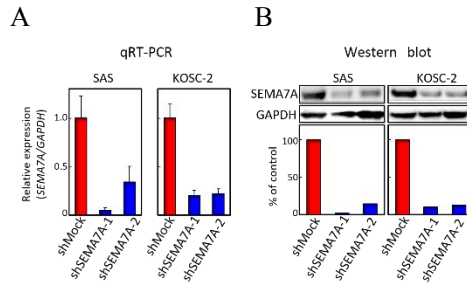
Clinical classification	Total	Results of immunostaining No. of patients (%)		p value
		SEMA7A- negative	SEMA7A- positive	
Age at surgery (years)				
<60	46	16 (35%)	30 (65%)	0.6420
≥60 <70	47	7 (15%)	40 (85%)	
≥70	57	21 (37%)	36 (63%)	
Gender				0.4770
Male	101	29 (29%)	72 (71%)	
Female	49	15 (31%)	34 (69%)	
T primary tumor				
T1	28	13 (46%)	15 (54%)	0.0254 *
T2	57	17 (30%)	40 (70%)	
T3	27	6 (22%)	21 (78%)	
T4	38	8 (21%)	30 (79%)	
N regional lymph node				0.0002 *
Negative	93	38 (41%)	55 (59%)	
Positive	57	6 (11%)	51 (89%)	
Stage				0.0006 *
I	26	11 (42%)	15 (58%)	
II	43	18 (42%)	25 (58%)	
III	25	7 (28%)	18 (72%)	
IV	56	8 (14%)	48 (86%)	
Vascular invasion				0.1833
Negative	110	35 (32%)	75 (68%)	
Positive	40	9 (23%)	31 (77%)	
Histopathologic type				0.5762
Well	99	28 (28%)	71 (72%)	
Moderately	42	16 (38%)	26 (62%)	
Poorly	9	0 (0%)	9 (100%)	
Tumoral site				0.5851
Stomach	39	11 (28%)	28 (72%)	
Esophagus	89	29 (33%)	60 (67%)	
Rectal mesorectum	8	1 (13%)	7 (87%)	
Distal Floor	11	3 (27%)	8 (73%)	
Soft palate	3	0 (0%)	3 (100%)	



(図 3: SEMA7A の発現と 5 年生存率)
(表 1: SEMA7A の発現と臨床指標の相関)

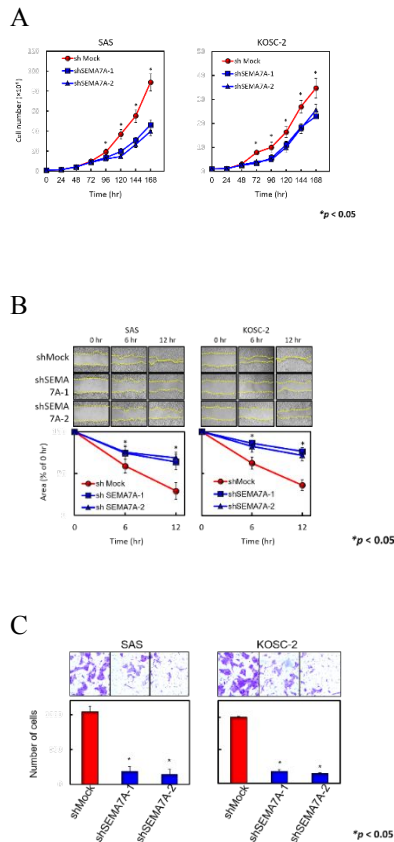
(2) SEMA7A の遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製し、それを用いた機能解析およびマウス移植実験を行い、増殖・浸潤・転移における SEMA7A の役割を明らかにする。

培養細胞に SEMA7A 遺伝子の shRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製し、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法にて SEMA7A の発現減弱を確認した。(図 4)



(図 4: 形質転換細胞株の樹立 A: リアルタイム PCR、B: ウエスタンブロット法)

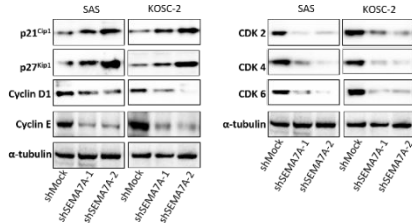
形質転換細胞を用いて増殖能試験、遊走能試験、浸潤能試験を行ったところ、shMock に比べて shSEMA7A では増殖能、浸潤能、遊走能すべてにおいて有意な差を認めた。(図 5)



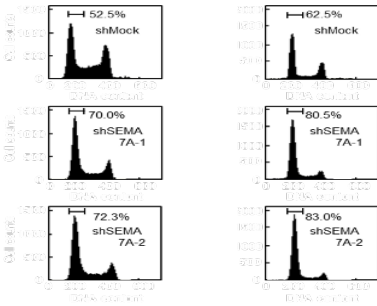
(図 5: 機能解析 A: 増殖能試験 B: 遊走能試験 C: 浸潤能試験)

細胞周期解析を行ったところ、SEMA7Aは細胞周期のうち特にG1期に与することで、腫瘍増殖へ影響を及ぼすことを明らかにした。(図6)

A

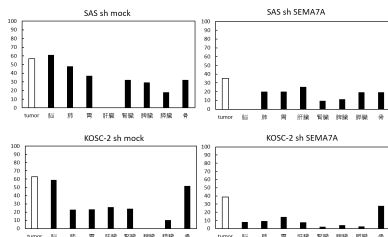


B



(図6: 細胞周期関連解析 A: ウェスタンブロット法 B: フローサイトメトリー)

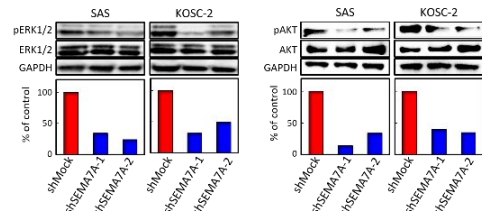
マウスにおける形質転換細胞を用いた癌転移実験を行った。転移評価はヒト Alu 配列を用いた。shMock に比べて shSEMA7A では、原発腫瘍だけでなく各臓器への腫瘍転移率においても有意な低下を認めた。(図7)



(図7: マウス転移評価実験)

(3) 形質転換細胞と親株の発現状態の比較により、作用するターゲット遺伝子や細胞周期への影響を明らかにする。

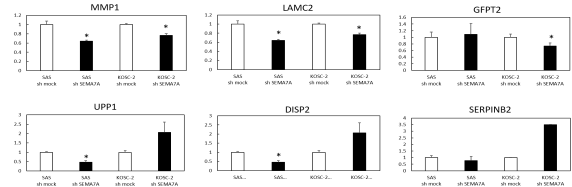
SEMA7A の $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンのシグナル伝達経路への影響をウェスタンブロットにて検討した。shMock に比べて shSEMA7A 導入した2株では、pERKの発現減弱を認めた。(図8)



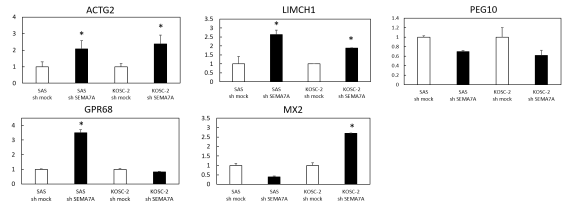
(図8: インテグリン関連遺伝子群の解析)

形質転換細胞と口腔癌由来細胞株(親株)の発現状態を microarray 解析にて網羅的に解析し、どのようなターゲット遺伝子に作用するかをリアルタイムPCRを用い検討した。今後のターゲットとなる可能性のある遺伝子が抽出された。(図9)

A



B



(図9 共通変動遺伝子の解析 A: 発現亢進遺伝子群 B: 発現減弱遺伝子群)

(4) まとめ

本申請研究期間において、口腔癌細胞において、発現増強している $\alpha 1 \beta 1$ タイプのインテグリンに作用する遺伝子群の中でもっとも発現増強している遺伝子である Semaphorin 7A (SEMA7A) 遺伝子臨床的・分子生物学的意義について、in vitro, in vivo の両面から明らかにした。SEMA7A 遺伝子は口腔癌由来細胞株、口腔癌臨床サンプルにおいて発現増強しており、その発現を抑制した形質転換細胞株を用いた検証から、腫瘍の増殖能及び転移能共に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、SEMA7A の抑制に伴い、様々なインテグリン関連遺伝子、ターゲット遺伝子が影響を受けることが確認され、 $\alpha 1 \beta 1$ タイプインテグリン、特に SEMA7A の制御により、口腔癌の進展を制御する可能性が示された。したがって、本研究結果は、SEMA7A を分子標的とした新たな分子標的治療の礎となると考えられ、今後の臨床応用の際に有益なデータになると思われた。

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)

全て該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 一幸 (KAZUYUKI, KOIKE)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：10618060

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者：なし