

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18117

研究課題名（和文）大腸癌におけるPLXND1を介したEMT機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of PLXND1-mediated EMT mechanism in colorectal cancer

研究代表者

萩原 清貴（Hagihara, Kiyotaka）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30781778

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）：大腸癌の遠隔転移機構である上皮間葉移行(EMT)のメカニズム解析を目的とした。PLXND1 knockdownで細胞浸潤能、遊走能の低下、化学療法に対する感受性の亢進、間葉系マーカーの低下を認めた。PLXND1のリガンド、SEMA3Eの活性に関わるFURINを阻害し、間葉系マーカーが低下した。次にPLXND1 knockdownとFURIN阻害薬を用い、EMT変化に伴うsignal解析を行うと、両方でリン酸化PI3K、AKTの低下を認め、PLXND1を介するEMTはPI3K/AKTを経由することが明らかになった。Notch signalとFURINの関連は明らかにはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Stage 大腸癌の5年生存率は20.2%と、大腸癌死亡には遠隔転移が大きく関わり、遠隔転移機構である上皮間葉移行の制御が重要である。PLXND1を阻害することでEMTを抑制し、浸潤能や遊走能を低下させ、化学療法への感受性を亢進させることが明らかとなった。PLXND1を直接阻害することは困難であるがFURIN阻害を用いリガンドであるSEMA3Eの活性を阻害することでPLXND1を間接的に阻害することが可能となる。FURIN阻害剤は実用化には至っていないが、近年sh RNAによるFURIN阻害の研究が進んでおり、大腸癌のEMT制御に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： We investigated the mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT), a mechanism of distant metastasis of colorectal cancer. We found that PLXND1 knockdown decreased cell invasion and migration, increased sensitivity to chemotherapy, and decreased mesenchymal markers. SEMA3E is the ligand of PLXND1 and FURIN which is involved in the activity of SEMA3E was inhibited and mesenchymal markers were decreased. Next, using PLXND1 knockdown and FURIN inhibitor, we performed signal analysis of EMT changes. We found that phosphorylated PI3K and AKT were decreased in both ways. That indicated PLXND1-mediated EMT is mediated through PI3K/AKT. The relationship between Notch signal and FURIN could not be clarified.

研究分野：大腸癌

キーワード：上皮間葉移行 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の罹患数は年々増加し、2016 年の本邦の統計では大腸癌の死亡数は肺癌に次ぐ第 2 位となっている。特に Stage 大腸癌の 5 年生存率は 20.2%と、大腸癌死亡には遠隔転移が大きく関わっており、遠隔転移の分子機構の解明が徐々に進んでいる。遠隔転移の分子機構の 1 つに上皮間葉移行(Epithelial to mesenchymal transition, EMT)があり、上皮細胞が間葉細胞に移行し血管やリンパ管を介して遠隔臓器に移動し、移動した場所で間葉細胞が上皮細胞に移行、増殖することで遠隔転移が起こるという分子機構である。近年、Notch signal と EMT の関連が大腸癌 (Fender AW et al, J Cell Biochem 2015)や乳癌 (Zhang J et al, Oncotarget 2016) など複数の癌で報告されているが、Notch signal と Snail、Slug、ZEB1 などの EMT マーカーの間をどのような経路が介しているか解明されていない。今回我々は卵巣癌で EMT との関連が報告(Tseng CH et al, PLoS One, 2011)されている PLXND1 に着目した。PLXND1 は細胞膜 1 回貫通型膜タンパク受容体で、リガンドである SEMA3E と結合することで腫瘍では乳癌 (Luchino J et al, Cancer Cell, 2013)、卵巣癌 (Tseng CH et al, PLoS One, 2011)、膀胱癌 (Yong LK et al, Oncotarget, 2016)、胃癌 (Chen H et al, Oncotarget, 2015)、大腸癌 (Casazza A et al, J Clin Invest, 2016)で転移や浸潤に関与しているとの報告がある。

2. 研究の目的

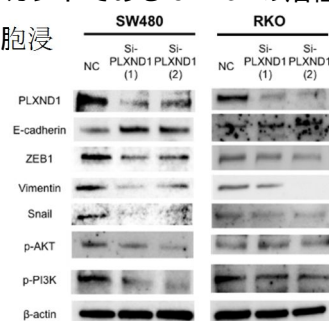
本研究では EMT の上流に位置する、Notch signal から EMT につながるシグナルの解析を目的とする。大腸癌において Notch signal を阻害することで EMT マーカーの発現が低下することは報告されているが (Fender AW et al, J Cell Biochem 2015)、Notch signal から EMT につながる経路が解析されていない。その経路を明らかにすることで、Notch signal の阻害による EMT の抑制が癌治療の新たな選択肢となり、Notch signal 阻害分子の臨床応用に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

大腸癌 cell line のうち、qRT-PCR、Western blotting で PLXND1 の発現が高いことを確認した SW480、RKO を用い、Furin 阻害剤または、PLXND1 の knockdown による機能解析、invasion assay、chemosensitivity assay を行い、Western blotting で間葉系マーカーの発現を解析した。Furin 阻害剤で PI3K/AKT signal が低下するか Western blotting で検討した。Notch signal と Furin に関連があると仮定し、Notch signal を γ -secretase inhibitor を用い抑制し、間葉系マーカーの発現が低下するか Western blotting で検討した。

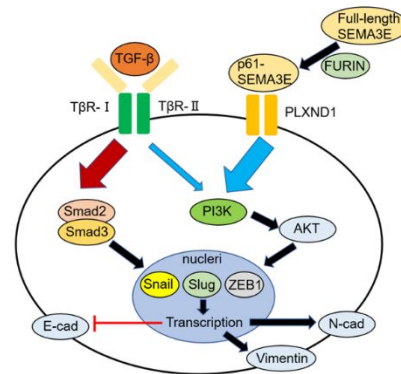
4. 研究成果

PLXND1 knockdown で細胞浸潤能、遊走能の低下、5-FU、L-OHP に対する感受性の亢進、上皮系マーカーの上昇、間葉系マーカーの低下を認めた。PLXND1 のリガンドである SEMA3E の活性体である p61-SEMA3E への変換に関わる FURIN を阻害することで細胞浸潤能、遊走能の低下、5-FU、L-OHP に対する感受性の亢進、間葉系マーカーが低下した。次に PLXND1 knockdown と FURIN 阻害薬を用い、EMT の変化に伴う signal 解析を行った。PLXND1 knockdown と FURIN 阻害薬を用いることで、リン酸化 PI3K、AKT の低下を認めた。これらの結果より、PLXND1 を介する EMT は PI3K/AKT を経由して起きていることが明らかになった。Notch signal の阻害剤



である -secretase inhibitor を用いたが、上皮、間葉系マーカーともに変化を認めなかった。Notch が EMT の上流に位置すると既報があったが、今回の検討では Notch と EMT における関連が明らかにできなかった。

EMT のメカニズム解析を進めた。EMT は TGF- β を経路するものと、PI3K/AKT を経路するものに分かれる。PLXND1 阻害で PI3K/AKT signal が阻害され、SMAD2/3 を介する TGF- β 経路が亢進した。TGF- β 阻害で SMAD2/3 を介する TGF- β 経路が阻害され、PI3K/AKT 経路の亢進を認め、片方の阻害のみでは EMT の制御には不十分であった。TGF- β と PI3K/AKT 経路の両方を阻害することで EMT が著明に抑制された。FURIN は pro TGF- β を TGF- β に変換する働きもあるため、FURIN を阻害することで両方の経路の遮断が可能となるため、EMT の制御に有効であると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩原 清貴
2. 発表標題 The association of PLXND1 and epithelial to mesenchymal transition in colon cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原 清貴
2. 発表標題 大腸癌におけるPLXND1の上皮間葉移行との関連
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 萩原 清貴
2. 発表標題 The association of PLXND1 and epithelial to mesenchymal transition in colon cancer
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

雑誌投稿に向け準備中です。

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