

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07368

研究課題名(和文) Crb3-PTPN3系を介した新規大腸腺癌転移制御機構の解析と転移阻害への応用

研究課題名(英文) The analyses of a novel mechanism for promoting colon adenocarcinoma metastasis via Crb3-PTPN3 axis and its application in inhibition of metastasis

研究代表者

飯岡 英和 (Iioka, Hidekazu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20425416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質Crb3は大腸腺癌細胞の移動・転移を促進する働きを持つが、作用機序が不明であった。本研究ではCrb3の細胞内ドメインに非受容体型チロシン脱リン酸化酵素の一つであるPTPN3が結合することを見出した。大腸腺癌細胞を用いてPTPN3をノックアウトしたところCrb3と同様に細胞移動が阻害された。また、大腸腺癌組織を用いて免疫染色を行ったところ、PTPN3はCrb3と共局在した。以上のことからPTPN3は協調して腫瘍の転移に機能すると考えられる。本研究における発見を基にさらに解析を進めることで腫瘍転移を阻害する新たな手立ての発見につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤転移の有無は癌患者の予後を左右する最も重要な指標であり、浸潤転移の激しい難治がんに対してはいまだ有効な手立てが十分でない状況である。本研究ではこれまでに知られていなかったCrb3による転移促進に注目し、そのメカニズムの一旦を明らかにすることを目的とした。Crb3タンパク質に結合するPTPN3タンパク質について、培養大腸癌細胞や患者由来組織切片を使用した解析を行い、Crb3と協調して機能する可能性を初めて見出した。今後これらのタンパク質の役割を詳細に解析することで、浸潤転移を抑える新たな作用機序を持つ薬剤の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The transmembrane protein Crb3 promotes migration and metastasis of colon adenocarcinoma cells. However, the molecular mechanism was unknown. In this study, we found one of the non-receptor type protein phosphatases, PTPN3, interacts with the intracellular domain of Crb3. The knockout of PTPN3 in colon adenocarcinoma cells displayed a reduction of cell migration in vitro. The immunohistochemistry revealed that PTPN3 is colocalized with Crb3 in colon adenocarcinoma patient tissues. This evidence strongly suggests that PTPN3 and Crb3 promote colon cancer metastasis in a coordinated manner. Further investigation of our findings might provide a novel strategy to inhibit tumor metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Crb3 細胞極性 浸潤転移

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエを用いた発生学的研究から、*Crumbs* (*Crb*) は細胞極性を制御することで上皮組織の正常な形態・機能の形成に寄与する遺伝子として同定された。近年の研究から、*Crb* が腫瘍抑制因子として機能することが報告され、実験生物や培養細胞を用いた実験系により検討が行われているが、ヒト悪性腫瘍における内在性 *Crb* の発現・機能は不明であった。申請者は哺乳類における *Crb* 相同遺伝子の一つ *Crb3* に着目し、独自に作成したモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色やウェスタンブロットを行い、ヒトの悪性腫瘍における *Crb3* の発現を解析した。その結果、まず *Crb3* が実際には広汎な腺癌組織、特に大腸癌、乳癌、前立腺癌に発現し、浸潤先進部や転移巣においても強く発現することが明らかとなった。次に、ヒト大腸腺癌由来培養細胞株を用いて *Crb3* ノックアウト (*Crb3*-KO) 細胞株を作成し、細胞増殖・移動性試験、免疫沈降や肝転移モデルマウスの解析を行い、*Crb3* が線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) を活性化し、大腸癌の転移を促進することを初めて報告した。しかし、FGFR の活性化機序を含め *Crb3* による転移制御メカニズムの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

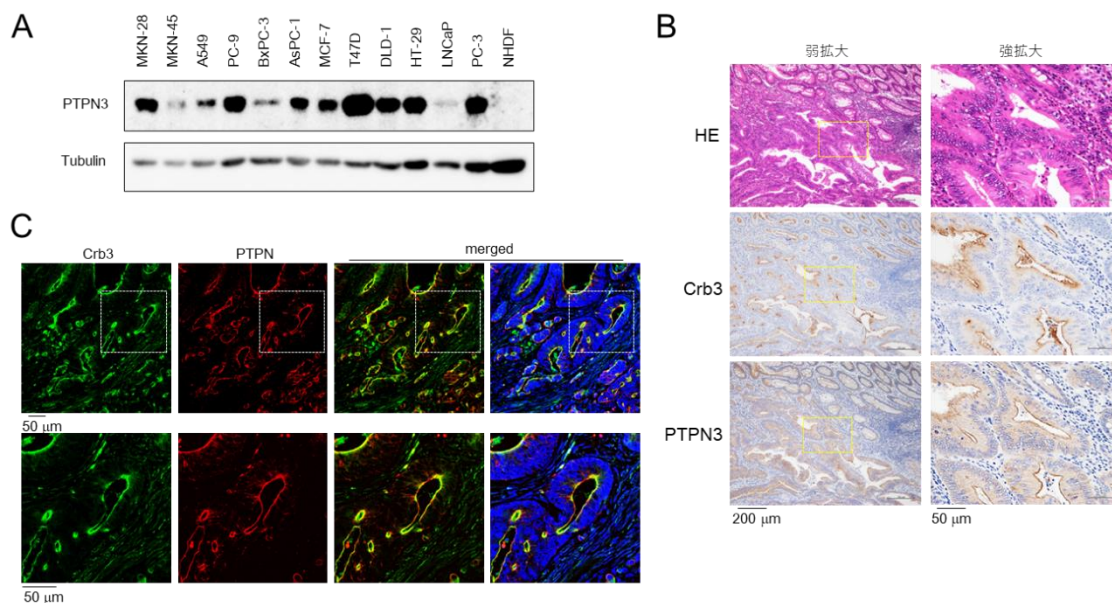
本研究では、予備実験において *Crb3* 結合タンパク質として新たに同定した非受容体型タンパク質脱リン酸化酵素 PTPN3 の解析を通じて、*Crb3* による腺癌細胞転移の促進機序を明らかにし、その知見に基づき浸潤転移の制御技術基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、①大腸癌浸潤転移における内在性 PTPN3 の発現と機能、②浸潤転移における PTPN3 と *Crb3* との関連性、③*Crb3*-PTPN3 系をターゲットとした転移阻害の検証、以上3点について解析を行い、大腸癌内在性 *Crb3* 及び PTPN3 の機能に基づいた浸潤転移制御の技術基盤を確立する。

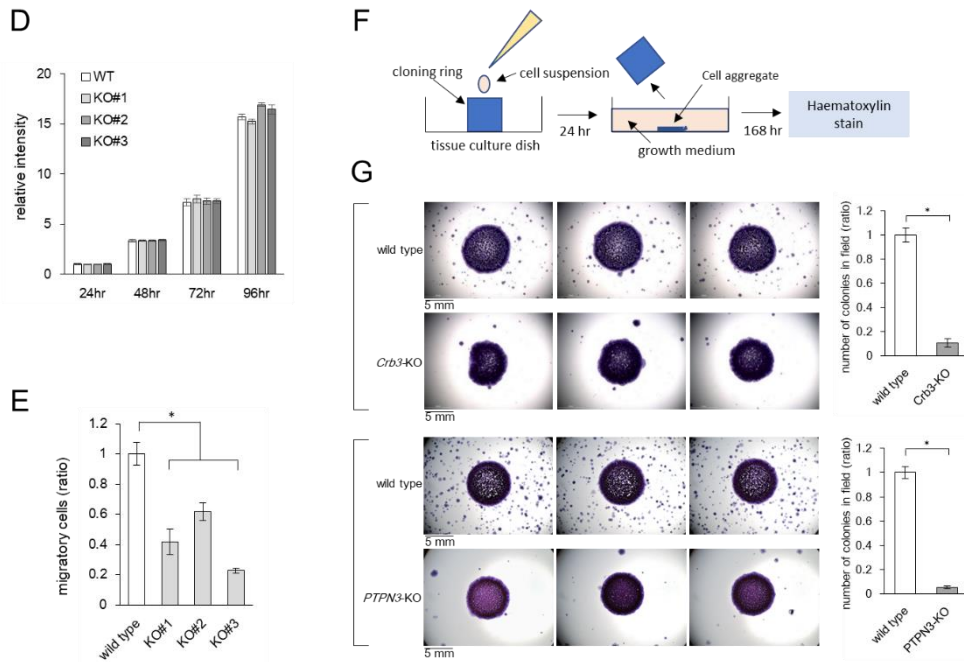
4. 研究成果

培養ヒト悪性腫瘍細胞株を用いたイムノブロットにより *Crb3* と PTPN3 の発現を比較、さらに患者由来大腸腺癌組織を用いた免疫組織染色を行い、発現パターンを比較した。イムノブロットの結果、PTPN3 は *Crb3* と同様に腺癌細胞系の細胞株において比較的強い発現を示した (図 A)。線維芽細胞株においては発現が見られなかった。次に患者由来大腸腺癌組織を用いた免疫組織染色を行ったところ、抗 PTPN3 抗体では腫瘍管腔頂部膜に強い染色が認められ、さらに細胞質も弱く染色された (図 B)。以前の結果から、*Crb3* は管腔頂部膜のみに局在することが判明しており、連続切片を用いた単染色による比較および、同一切片上での蛍光二重染色の結果から PTPN3 とは頂部膜上で共局在することが明らかとなった (図 C)。

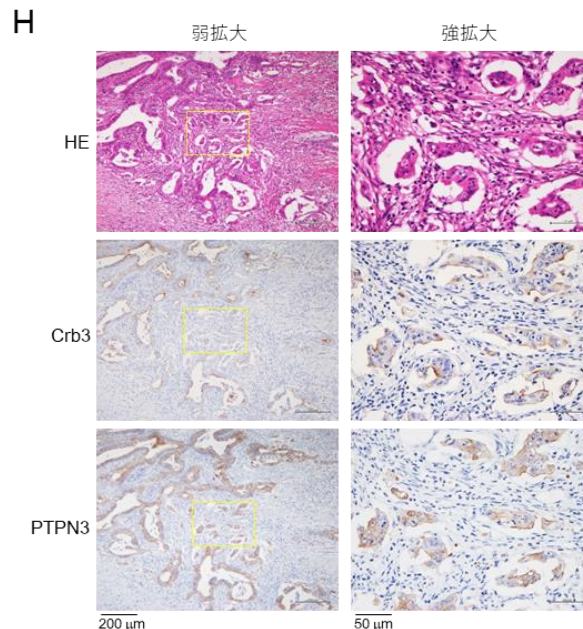


次に大腸腺癌細胞株 DLD-1、LoVo を使い、siRNA 使用したノックダウン、および CRISPR-CAS9 によるノックアウトを行い PTPN3 の発現を低下、又は消失させた際の細胞の挙動をコントロール細胞と比較した。その結果、*Crb3* の場合と同様に発現の低下や消失により増殖性に変化は無いが (図 D)、移動性の低下が認められた (図 E)。以上のことから PTPN3 は *Crb3*

と共局在し、細胞の移動を促進する可能性が支持された。

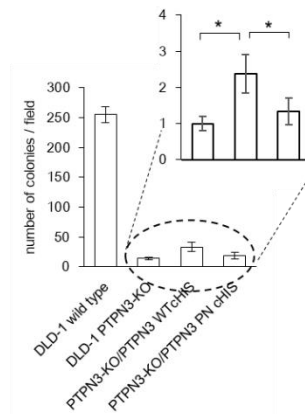
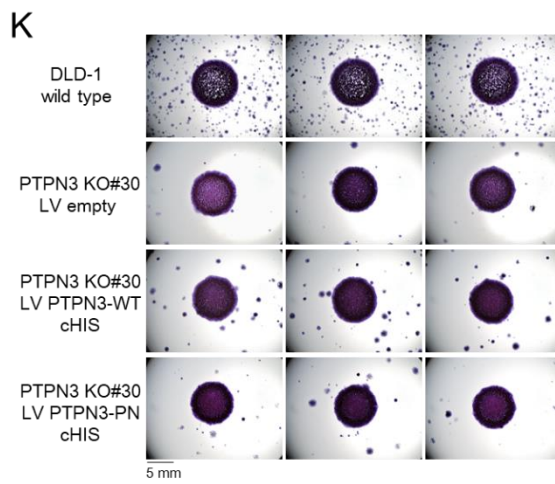
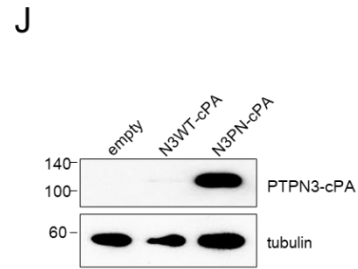
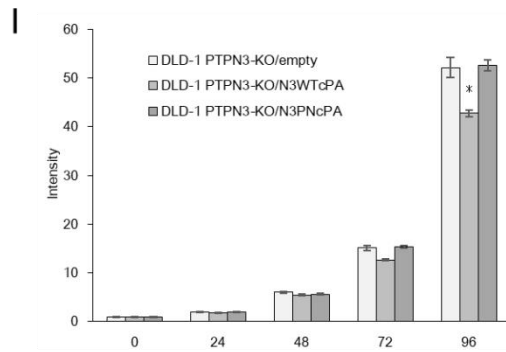


また転移における PTPN3 と Crb3 の関連性を調べるために、培養皿上で細胞塊の転移を評価する実験系を構築し、Crb3 と PTPN3 のノックアウト株の転移能を比較した (図 F)。その結果、ノックアウト細胞株群は野生型細胞株と比較し、転移能が著しく低下していることが判明した (図 G)。また、浸潤の見られる大腸腺癌組織を用いて免疫組織染色を行ったところ、間質組織中を腫瘍細胞が集団で浸潤する「collective invasion」においても腫瘍細胞は PTPN3 および Crb3 の発現を維持していた (図 H)。以上の結果から、Crb3 は PTPN3 と協調して腫瘍の浸潤転移において機能する可能性が示された。



さらに、浸潤転移の制御技術への応用可能性を検証するため PTPN3 のリン酸化酵素としての活性に注目して解析を進めた。*PTPN3* ノックアウト細胞に野生型 PTPN3 タンパク質 (N3WT) または脱リン酸化酵素活性を失活させる変異を導入した変異タンパク質 (N3PN) を安定発現させ、細胞の増殖性を比較したところ、N3PN 発現細胞はコントロール細胞と比較し増殖性に顕著な影響は見られなかった。しかし N3WT を発現させた細胞では増殖性が低下することが判明した (図 I)。それぞれの細胞に発現する PTPN3 の量をウェスタンブロットにより比較したところ、N3PN と比較し、野生型 PTPN3 タンパク質は非常に低いレベルでの発現が検

出された (図 J)。またそれぞれの細胞の転移能を評価したところ、N3WT を発現させた細胞で僅かに転移能が回復することが判明した (図 K)。これらの結果を総合すると、*PTPN3* の過剰発現、及びノックアウトによる発現の除去は細胞の増殖や移動に不利に働くが、*PTPN3* の低レベルの発現・活性は腫瘍の進展に有利な影響を与える可能性がある。以上の結果から、*PTPN3* の阻害剤は転移阻害薬として有望と考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokoyama Yusuke, Iioka Hidekazu, Horii Arata, Kondo Eisaku	4. 巻 23
2. 論文標題 Crumbs3 is expressed in oral squamous cell carcinomas and promotes cell migration and proliferation by affecting RhoA activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、高田尚良、近藤英作
2. 発表標題 非受容体型脱リン酸化酵素PTPN3は、大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第110回 日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるCrumbs3の発現と機能の解析
3. 学会等名 第25回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、高田尚良、近藤英作
2. 発表標題 PTPN3はCrumbs3と協調して大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 新規Crb3結合因子であるPTPN3は、大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 非受容体型脱リン酸化酵素PTPN3はCrumbs3と相互作用し、大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山侑輔、飯岡英和、近藤英作
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌におけるCrumbs3の発現と機能解析
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、近藤英作
2. 発表標題 新規Crumbs3結合タンパク質PTPN3は大腸腺癌の細胞移動を促進する
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、高田尚良、近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3はタンパク質分泌制御を介して大腸癌腺細胞の移動を促進する
3. 学会等名 第111回 日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯岡英和、齋藤憲、高田尚良、近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3結合タンパク質PTPN3は大腸腺癌細胞の移動を促進する
3. 学会等名 第26回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯岡英和、高田尚良、近藤英作
2. 発表標題 Crumbs3は特定のタンパク質の分泌制御を介して大腸腺癌の細胞移動を促進する可能性がある
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	近藤 英作 (Kondo Eisaku) (30252951)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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