

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07564

研究課題名（和文）新規接着斑構成因子 FAP1 依存的ながん転移メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of FAP1-dependent cancer metastasis

研究代表者

辻岡 政経（Tsujioka, Masatsune）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト講師

研究者番号：60442985

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）：申請者は、接着斑構成因子FAP1が、がんの悪性化に関与することを事前に見出していた。本研究の目的は、FAP1の機能と発現制御機構を明らかにすることにより、がんの新たな悪性化機構を解明すること、FAP1を標的とした抗がん剤候補化合物を同定すること、である。FAP1は、既に知られていた接着斑因子FRNKと同一であった。本研究により、生体中のがん細胞は常時DNA損傷ストレスに晒されており、これに反応して発現したFRNKが細胞接着を増強することにより、がんの悪性化を促進することが示唆された。また、FRNKの発現を阻害する化合物ML385を見出し、これを抗がん剤候補の一つとして注目している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FRNKは、その欠損マウスに顕著な欠陥が見られないなど、これまで機能がほとんど分かっていなかった。本研究により、DNA損傷ストレスにおけるFRNKの機能と、それを介した新たな細胞ストレス応答の存在が明らかになった。DNA損傷ストレスは、紫外線や放射線など日常にありふれており、様々な疾患とも関連している。本研究結果が、これらの疾患メカニズムの解明や治療法の確立に繋がることが期待される。特に、がん治療においては、正常組織ではFRNKの機能抑制による影響がほとんど見られないため、副作用の少ない抗がん治療の標的として有望である。

研究成果の概要（英文）：I have already demonstrated that FAP1 is involved in cancer progression. In the present study, therefore, I investigated the functions of FAP1 and the regulation of its expression to clarify the FAP1-involved mechanism of cancer progression. Furthermore, I tried to identify candidate chemical compounds to develop anti-cancer drugs targeting to FAP1. FAP1 proved to be identical to FRNK, a known component of focal adhesions. I found that FRNK was expressed in response to genotoxic stress and strengthened cell-matrix adhesion. I also found that several cancer cells concomitantly expressed FRNK and a genotoxic stress marker in their tissues. Since firm cell attachment is an important element of cancer progression, I propose that cancer progression is facilitated by the FRNK-mediated adhesion of cancer cells continuously exposed to genotoxic stress in their tissues. I identified ML385, which inhibited the expression of FRNK, as a candidate anti-cancer compound.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん 接着斑 FRNK FAK FAP1 DNA損傷ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、以下のような特徴を持つ、新規の接着斑構成タンパク質を見出し、FAP1と命名した。すなわち、通常培養下のがん細胞では発現しておらず、これをマウスに移植した腫瘍塊で特異的に発現する、通常条件下のマウスにおいても、主要組織・器官での発現は検出されない、遺伝子欠損により、がん転移が大幅に抑制される、培養下でも低酸素ストレスにより発現が誘導される、などである。これらの特徴から、FAP1を、がん悪性化に特異的に関与する分子と考え、解析を進めるに至った。

### 2. 研究の目的

- (1) FAP1の発現制御機構とその機能を明らかにすることにより、がん悪性化の新たなメカニズムを解明する。
- (2) FAP1を標的とした抗がん剤候補化合物を同定する。

### 3. 研究の方法

- (1) FAP1 発現制御機構の解明は、培養細胞を用いた FAP1 の発現誘導の系と、FAP1 遺伝子プロモーター解析を組み合わせて行う。明らかになった発現制御機構をもとに、FRNK の発現を抑制する化合物を探索し、抗がん剤候補化合物を同定する。
- (2) FAP1 の接着斑における機能、がんにおける機能は、FAP1 関連の変異細胞を作製・解析することにより解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) FAP1 発現制御機構の解明

FAP1 は、既に知られていた接着斑構成因子 FRNK と同一であった。FRNK は数種類の培養細胞において、低酸素ストレスによって発現が誘導されることを見出していたが、DNA 損傷ストレスによってさらに強く発現誘導されることが分かった。FRNK 遺伝子の上流には、転写因子 NRF2 の結合配列が存在したため、クロマチン免疫沈降法により、この領域と NRF2 との結合を調べたところ、DNA 損傷ストレス依存的な両者の結合が検出された。また、NRF2 の核移行阻害剤である ML385 を、DNA 損傷ストレスと共に培養細胞に加えると、FRNK の発現が顕著に抑制された。したがって、DNA 損傷ストレス依存的な FRNK の発現を誘導する転写因子は、NRF2 であることが明らかとなった。また、ML385 を、FRNK を介したがん悪性化機構を標的とした抗がん剤候補として同定した。

#### (2) FAP1 (FRNK) の機能解明

FRNK は接着斑構成因子であるため、MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞を用いて接着斑の解析を行った。すると、FRNK の類似分子で、接着斑の中心的なタンパク質である FAK が、DNA 損傷ストレスによって FRNK と入れ替わることを見出した。また、FRNK の欠損細胞は、その親株に比べて、DNA 損傷ストレス下で顕著に脱接着しやすかった。FAK のみを発現する細胞と FRNK のみを発現する細胞を作製し、原子間力顕微鏡を用いた物理的測定により細胞接着力を比較すると、両タンパク質の発現レベルは同等であったにもかかわらず、FRNK 発現細胞の方が接着力が強かった (図 1A)。また、個々の接着斑を観察すると、FRNK 発現細胞の接着斑は、安定

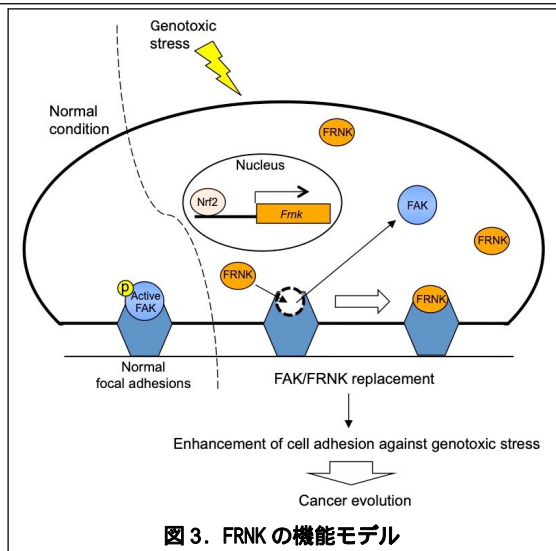
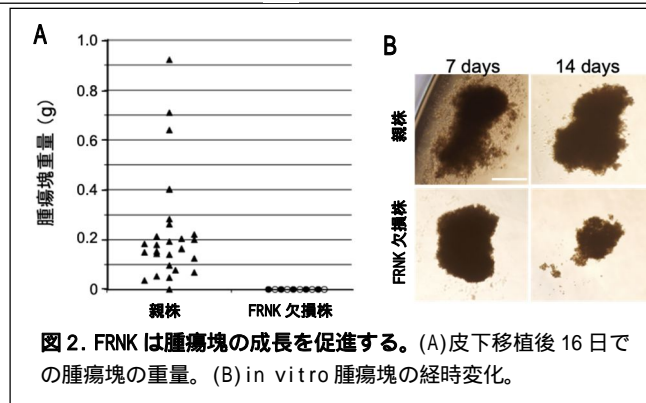
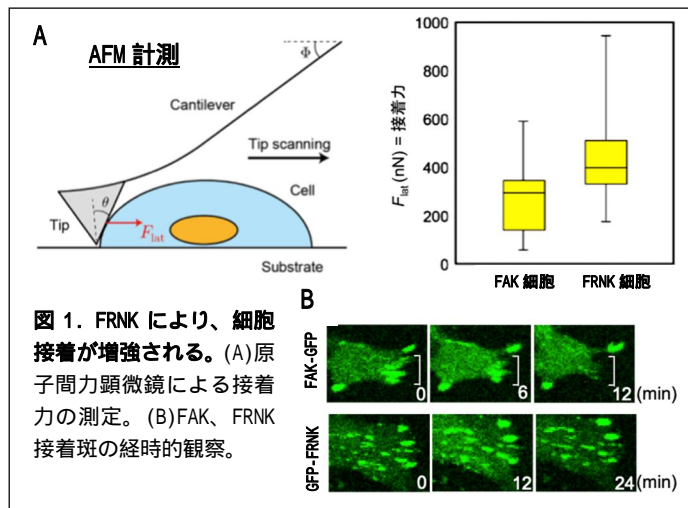
で寿命が長かった(図1B)。以上から、細胞にDNA損傷ストレスが加わると、FRNKの発現が誘導されてFAKと入れ替わり、細胞接着力が増強されることが示唆された。

次に、がん悪性化におけるFRNKの機能を検討した。マウス大腸がん細胞CT26の腹腔移植の系において、FRNKの欠損により腹膜播種が顕著に抑制されることを事前に明らかにしていた。本研究では、播種した親株の腫瘍塊において、FRNKとDNA損傷マーカーであるpH2AXの発現を検出した。さらに、p53 K0マウスにおいて自然発症したリンパ系腫瘍細胞(p53K0-T)を用いたマウスへの皮下移植の系においても、FRNKの影響を調べた。移植したp53K0-Tは、皮下で腫瘍塊を形成し、こ

の腫瘍塊においてもFRNKとpH2AXの発現が検出された。一方、FRNKを欠損したp53K0-T細胞では、移植部位における腫瘍塊の形成は全く見られなかった(図2A)。in vitroでの腫瘍塊形成実験では、FRNK欠損細胞は、一旦親株と同様の腫瘍塊を形成するにもかかわらず、後にそれが分散して小さくなるという表現型を観察した(図2B)。また、ヒトの大腸がん臨床サンプルでは、原発巣の組織より転移組織でFRNKの発現頻度が高かった。

先行研究により、生体組織中のがん細胞にはDNA損傷ストレスがかかっていること、がん細胞の接着増強は、がんの悪性化に重要であること、が報告されている(参考文献1,2)。

これらの報告と本研究の結果から、生体中のがん組織では、DNA損傷ストレスによりNRF2を介してFRNKが発現し、がん細胞の接着を増強することにより、がんの転移、生着、腫瘍塊の成長を促進する、というモデルを提唱する(図3)(参考文献3)。



#### <参考文献>

- (1) Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005, **434**(7035): 864-870.
- (2) Sluiter N, de Cuba E, Kwakman R, Kazemier G, Meijer G, Te Velde EA. Adhesion molecules in peritoneal dissemination: function, prognostic relevance and therapeutic options. *Cl in Exp Metastasis* 2016, **33**(5): 401-416.
- (3) Tsujioka M, Miyazawa K, Ohmuraya M, Nibe Y, Shirokawa T, Hayasaka H, et al. Identification of a novel type of focal adhesion remodelling via FAK/FRNK replacement, and its contribution to cancer progression. *Cell Death & Disease* 2023, **14**(4): 256

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 Tsujioka M, Miyazawa K, Ohmuraya M, Nibe Y, Shirokawa T, Hayasaka H, Mizushima T, Fukuma T, Shimizu S	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of a novel type of focal adhesion remodelling via FAK/FRNK replacement, and its contribution to cancer progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	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） 10.1038/s41419-023-05774-4	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻岡 政経
2. 発表標題 接着斑のDNA損傷応答によるがん悪性化機構
3. 学会等名 第3回細胞死コロキウム
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
---------------------------	-----------------------	----

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