

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22831

研究課題名（和文）細胞接着分子に注目した胃癌進展機序解明と革新的治療戦略の構築

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of gastric cancer progression and development of innovative therapeutic strategies focusing on cell adhesion molecules

研究代表者

中澤 信博（Nakazawa, Nobuhiro）

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60881290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞質にCx26を高発現する腸型/混合型胃癌症例は有意に予後良好であり、また再発症例も有意に少なかった。Cx26強制発現細胞株（MKN7,45）では有意な増殖能の低下を認め、Western blottingでは核内  $\beta$ -catenin発現が低下していた。また近接ライゲーションアッセイでは、細胞質Cx26と  $\beta$ -cateninの結合を認め、共免疫沈降でも同様の事象を認めた。細胞質へのCx26局在変化は、細胞質  $\beta$ -cateninと結合することで、 $\beta$ -catenin核内移行を抑制すると考えられた。MKN74を使用したCage解析においてもWnt/ $\beta$ -catenin経路と関連することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌、大腸癌、肺癌、膵癌や、われわれが以前に報告した食道扁平上皮癌において、細胞質でのCx26発現が予後や遠隔転移に関与しているなどの報告がある。胃癌においては癌化に伴うCx26の細胞膜から細胞質内への局在変化や、細胞質におけるCx26の機能的意義についてはほとんど明らかにされていなかった。今回Intestinal and mix typeの胃癌において、本来細胞膜に位置するCx26が癌化の過程で細胞質に局在変化を起こし、 $\beta$ -cateninの核内移行を抑制することを証明し、治療予後との相関も示した。今後胃癌においてCxをターゲットとした全く新たな治療戦略の開発を目指せる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, high cytoplasmic Cx26 expression was associated with favorable prognosis in intestinal- and mix-type gastric cancer and could be an independent prognostic factor for overall survival. In terms of the mechanism, in vitro experiments changes in Cx26 localization to the cytoplasm were shown to suppress the change of localization of  $\beta$ -catenin to the nucleus by binding to it in the cytoplasm. Cytoplasmic Cx26 was found to be a prognostic factor in intestinal- and mix-type gastric cancer. Regarding the mechanism, in vitro studies revealed that cytoplasmic Cx26 inhibits the translocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus.

研究分野：消化管外科

キーワード：胃癌 コネキシン26（Cx26） 腸型胃癌  $\beta$ -catenin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界中において最も頻度の高い消化器癌の一つであり、部位別がん死亡数第3位の疾患である (Torre LA, Bray F, et al. CA Cancer J Clin 2015)。胃癌に対する分子生物学的理解は徐々に深まりつつあるが、いまだ解明されていない部分も多い。本研究では、細胞間の接着分子、特にコネキシン (Cx) に注目した。コネキシンはギャップ結合を構成する基本分子で、20を超えるコネキシンが同定されている。癌研究におけるコネキシンの作用として細胞増殖抑制、原発巣からの離脱や浸潤抑制、血管外遊出の制御などの可能性が注目されている。われわれは食道癌と Cx26 の関係について検討し報告してきたが (Inose T, Kuwano H, et al. Ann Surg Oncol 2009) その分子機序の解明には至っていない。また様々な癌腫において癌化の過程で、Cx の異常発現や細胞内局在の変化について報告を認めるものの、一定の見解は得られていないのが現状である。そこで今回、胃癌における Cx の発現意義と機能を明らかにし、革新的胃癌治療への臨床応用の橋渡しを目指し検討を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究によって胃癌における Cx26 をはじめとする Cx ファミリーの機能的意義を検討し、これまでにない新たな分子機序を解明することを目的とした。さらには胃癌において Cx をターゲットとした全く新たな治療戦略が開発される可能性が考えられ、Cx の発現局在に注目し、本来ギャップ結合を構成する基本分子である Cx が、Wnt/  $\beta$ -catenin 経路などに関与している可能性を明らかにし、その治療標的としての可能性について明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 【対象】

(1)胃癌切除例における Cx26 細胞質局在：根治手術を施行した腸型・混合型 87 例/びまん型 111 例  
(2)胃癌細胞における Cx26 機能解析：胃癌細胞株 MKN7, MKN74, MKN45

#### 【方法】

(1)胃癌切除標本における Cx26 細胞質局在を免疫組織化学染色にて評価し Allred score を用いて低発現群、高発現群の2群に分け (カットオフ6点) 臨床病理学的因子、予後との相関を解析した。(2) In vitro における検討では、胃癌細胞株 MKN7, MKN74, MKN45 を使用し、Cx26 強制発現を通し、WST assay にて細胞増殖能の評価や、Cx26 と  $\beta$ -catenin の関係について近接ライゲーションアッセイ (PLA assay) や共免疫沈降を行い検討した。さらに Cage 解析にて機能解析を施行した。

### 4. 研究成果

本研究では胃癌における細胞間接着分子、特にコネキシン 26 (Cx26) に注目し検討を行っている。研究成果として、胃癌症例において、本来細胞膜でギャップ結合を形成する Cx26 は細胞質に染色され、癌化に伴い細胞膜から細胞質への局在の変化を認めた。また腸型・混合型胃癌において、Cx26 発現症例では有意に予後良好に対し、びまん型胃癌ではこの差を認めなかった。上皮間葉転換の誘導、がん幹細胞性に関連することが報告されている Wnt/  $\beta$ -catenin 経路と Cx26 の関係に着目し諸検討を行うこととし以下の研究を遂行した。

・細胞質の Cx26 と  $\beta$ -catenin の関係を検討：In situ Proximity Ligation Assay (PLA) で検討を行ったところ、細胞質 Cx26 と  $\beta$ -catenin の結合所見を認めた。また MKN7, MKN74, MKN45 を使用し共免疫沈降 (Co-IP) を施行したところ、Co-IP でも細胞質 Cx26 と  $\beta$ -catenin の結合所見を認めた。細胞質に局在変化を起こした Cx26 は  $\beta$ -catenin と結合することで、 $\beta$ -catenin の核内移行を抑制している可能性が示された。胃癌症例で  $\beta$ -catenin の免疫染色を追加検討したところ、腸型・混合型胃癌において、Cx26 低発現と核内  $\beta$ -catenin 高発現は統計学的有意差を認め、臨床検体においても同様の結果が得られた。

・上記詳細検討のため、MKN7, MKN74, MKN45, GCIY を使用し Cx26 強制発現細胞株を樹立し、いずれの細胞株においても Cx26 高発現は WST-assay にて増殖能の低下を認め、Western blotting での検討では核分画の  $\beta$ -catenin 発現は低発現となった。

・MKN74 を使用し Cage 解析を施行した。Cx26 過剰発現群では Wnt/  $\beta$ -catenin 経路の抑制を示し、Wnt/  $\beta$ -catenin 経路下流遺伝子発現の低下を認めた。

Wnt/  $\beta$ -catenin 経路 (Wnt3a) は腸型胃癌でより活性化されていることが報告されており、今回腸型・混合型胃癌において、細胞膜 Cx26 の細胞質への局在変化により、 $\beta$ -catenin と結合することでその核内移行を阻害し、治療成績の向上に寄与している可能性が考えられた。コネキシンはプロテオソームで分解されるため、今後はプロテオソーム阻害剤を使用し、Cx26 が新たな治

療標的となるか検討を行いたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Nobuhiro Nakazawa, Makoto Sohda, Takehiko Yokobori, Navchaa Gombodorj, Akihiko Sano, Makoto Sakai, Tetsunari Oyama, Hiroyuki Kuwano, Ken Shirabe, Hiroshi Saeki	4. 巻 early view
2. 論文標題 Cytoplasmic localization of connexin 26 suppresses transition of - catenin into the nucleus in intestinal- and mix-type gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12552	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中澤信博
2. 発表標題 胃癌におけるconnexin26細胞質局在の意義についての検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中澤信博
2. 発表標題 胃癌における細胞質connexin26局在の機能的意義についての検討
3. 学会等名 第18回日本消化管学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤信博
2. 発表標題 細胞接着分子に注目した胃癌進展機序解明と革新的治療戦略の構築
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------