

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06879

研究課題名（和文）スキルス胃癌と口唇口蓋裂の発症に関わるPLEKHA5の分子機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular function of PLEKHA5 involved in the onset of scirrhous gastric carcinoma and cleft lip and palate

研究代表者

山口 英樹（Yamaguchi, Hideki）

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長

研究者番号：10345035

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）：家族性スキルス胃癌はE-cadherinの変異により生じるが、変異保有者の一部は口唇口蓋裂を併発する。本研究では、スキルス胃癌の進展に関わる、遺伝性口唇口蓋裂の原因遺伝子産物PLEKHA5の分子機能の解析を行った。PLEKHA5は細胞間接着部位に局在し、E-cadherinを含む様々な細胞間接着分子やシグナル伝達分子と結合した。さらに、PLEKHA5のPHドメインは細胞内輸送に重要なリン脂質であるホスファチジルセリンと結合した。PLEKHA5のノックダウンによりスキルス胃癌細胞において細胞内輸送の異常がみられた。従って、PLEKHA5は細胞間接着と細胞内輸送に関わる分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本に多い難治がんであるスキルス胃癌と、最も多い先天性の形態異常である口唇口蓋裂は、どちらもE-cadherinを介した細胞間接着の異常により生じると考えられている。しかしその詳細な分子機構はほとんど分かっていない。本研究により、遺伝性口唇口蓋裂の原因遺伝子産物PLEKHA5がE-cadherinと結合し、細胞間接着や細胞内輸送に関わることが示唆された。本研究結果は、両疾患の発症機構の解明や診断・治療法の開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Familial scirrhous gastric carcinoma arises from mutations in E-cadherin, with some mutation carriers also presenting with cleft lip and palate. In this study, we analyzed the molecular function of PLEKHA5, a causative gene product of hereditary cleft lip and palate, involved in the progression of scirrhous gastric carcinoma. PLEKHA5 localized to cell-cell adhesion sites and interacted with various cell adhesion molecules, including E-cadherin, as well as signal transduction molecules. Additionally, the PH domain of PLEKHA5 bound to phosphatidylserine, an important phospholipid for intracellular transport. Knockdown of PLEKHA5 resulted in abnormal intracellular transport in scirrhous gastric carcinoma cells. These results suggest that PLEKHA5 is involved in both cell-cell adhesion and intracellular transport.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：スキルス胃癌 口唇口蓋裂 PLEKHA5 E-cadherin

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌はびまん性浸潤、間質増生、腹膜播種を特徴とする予後不良の難治癌である。スキルス胃癌は早期発見が極めて困難であり、未だに有効な治療法は確立されていない。日本人の胃癌の罹患率は欧米と比べ非常に高く、スキルス胃癌の研究はこれまで日本を中心に行われてきた。しかし遺伝子発現解析やゲノム解析などの分子病理学的な解析が主であり、生物学的特性に関する解析は進んでいない。実際に、細胞間接着分子である E-cadherin や低分子量 G タンパク質である RhoA の遺伝子変異がスキルス胃癌のドライバー変異であると報告されているが、詳細な発症メカニズムには不明な部分が多い。

口唇口蓋裂は最も多い先天性異常の 1 つであり、日本では約 500 人に 1 人が発症する。環境要因などが発症に関わることが示唆されているが、その多くは原因不明である。これまでの遺伝学的解析により細胞間接着に関わる原因遺伝子が複数同定されている。口唇口蓋裂は、胎生期に顔の左右から伸びた突起が中央で融合し形成される。従って、細胞間接着の異常はこの融合過程の不全をきたすと考えられるが、その機序と分子機構はほとんど分かっていない。

家族性のスキルス胃癌（遺伝性びまん性胃癌）は E-cadherin の変異により発症することが報告されている (Guilford et al, *Nature* 1998)。また E-cadherin 変異保有者の一部は口唇口蓋裂を併発する (Frebourg et al, *J Med Genet* 2006)。従って、スキルス胃癌と口唇口蓋裂は、E-cadherin の機能喪失による細胞間接着の異常が引き金となり発症すると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

我々は最近、スキルス胃癌細胞の増殖や運動、浸潤転移に関わる、PLEKHA5 というタンパク質を見出した (Nagamura et al., *Oncogenesis* 2021)。PLEKHA5 の細胞内機能は不明であるが、相同性の高いファミリー分子である PLEKHA7 は E-cadherin の裏打ちタンパク質である p120-catenin と結合し、E-cadherin を介した細胞間接着を制御する (Meng et al., *Cell* 2008)。さらに最近、極めて興味深いことに、p120-catenin、PLEKHA5、PLEKHA7 が遺伝性口唇口蓋裂の原因遺伝子であることが報告された (Cox et al, *Am J Human Genet* 2018)。従って、PLEKHA7 と同様に、PLEKHA5 は p120-catenin と結合して E-cadherin を介した細胞間接着に関与し、その異常は口唇口蓋裂を引き起こすと考えられる。一方、スキルス胃癌においては、細胞間接着の破綻に伴い、PLEKHA5 が何らかの癌促進的な機能を獲得している可能性が高い (図 1)。以上の事実より、PLEKHA5 は両疾患の発症機構を理解する上で、鍵となる分子だと考えられた。

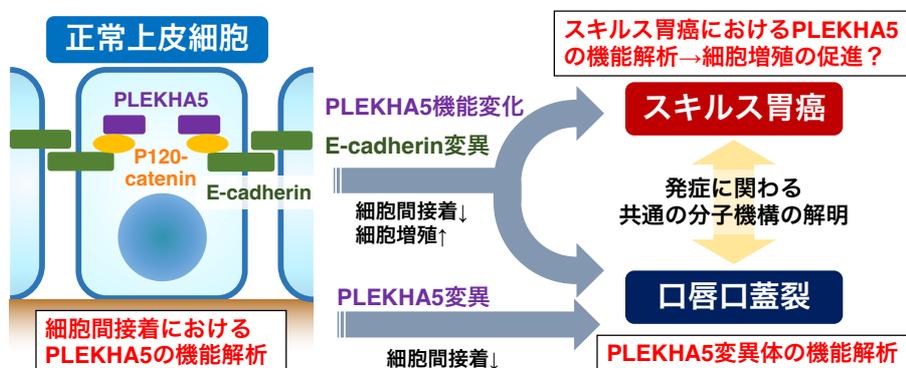


図 1. 細胞間接着の破綻によるスキルス胃癌及び口唇口蓋裂の発症と PLEKHA5 の機能モデル

2. 研究の目的

本研究では、正常上皮の細胞間接着とスキルス胃癌における PLEKHA5 の機能を明らかにすることを目的とする。また PLEKHA5 を糸口として、細胞間接着の破綻により生じる口唇口蓋裂とスキルス胃癌の発症機構のさらなる理解を目指す。

本研究の独創的な点は、スキルス胃癌と口唇口蓋裂という、一見全く異なる疾患に存在する、分子レベルでの共通点に着目していることである。このような視点から両疾患の研究を行っているグループは世界に存在しない。両疾患に関連する分子の機能が明らかになれば、新たな予防、診断、治療法の開発に繋がる可能性がある。例えば、口唇口蓋裂を発症した患者に対して E-cadherin、PLEKHA5 などの遺伝子検査を行い、家族性スキルス胃癌の罹患リスクを判断することが可能になる。また本研究は、PLEKHA5 という機能未知なタンパク質の解析を行う点でも、独自性が高い。PLEKHA5 は皮膚癌の脳転移に関わることが報告されており (Jilaveanu et al, *Clin Cancer Res* 2015)、癌で重要な役割を担う分子である可能性が高い。また口唇口蓋裂だけでなく、双極性障害との関連も報告されている (Jamain et al, *PLoS one* 2014)。従って本研究の成果は、PLEKHA5 の分子機能の解明だけではなく、PLEKHA5 が関与する他の疾患の理解にも寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 上皮系細胞株を用いて蛍光抗体染色を行い、PLEKHA5 が細胞間接着部位において、E-cadherin や p120-catenin などの細胞間接着分子と共局在するか観察する。PLEKHA5 の免疫沈降を行い、結合タンパク質を質量分析により網羅的に解析し、どのような細胞間接着分子と結合するか調べる。さらに CRISPR-Cas9 により PLEKHA5 遺伝子のノックアウトを行い、細胞間接着への影響を検討する。遺伝性口唇口蓋裂の家系で見つかった PLEKHA5 の変異体を作製する。PLEKHA5 ノックアウト細胞に野生型及び変異体を発現させ、その局在変化や細胞間接着構造への影響を調べる。また変異体の結合タンパク質を網羅的に解析し、E-cadherin や裏打ちタンパク質群との結合能の変化を調べる。

(2) PLEKHA5 は PH ドメインと WW ドメインを持つことから、シグナル伝達に関わるアダプター分子として働くと推測される。スキルス胃癌では E-cadherin の機能喪失に加えて、受容体型チロシンキナーゼ Met や FGFR、低分子量 G タンパク質 RhoA シグナルの活性化異常が起こる。そこで PLEKHA5 がこれらシグナル伝達分子の下流で機能するか検討する。スキルス胃癌細胞株 44As3 や 58As9 において PLEKHA5 の発現を抑制し、癌化シグナルの活性化に変化があるか、ウェスタンブロットや細胞染色により調べる。遺伝子発現解析、抗体アレイ解析なども平行して行い、PLEKHA5 が関わるシグナル伝達経路の同定を試みる。また結合タンパク質の網羅的解析を行い、癌化に伴い結合が失われる、あるいは新たに結合する分子があるか明らかにする。

4. 研究成果

(1) 先ず、間接蛍光抗体法により上皮形質を維持した胃癌細胞における PLEKHA5 の細胞内局在を解析した。その結果、PLEKHA5 は E-cadherin などの細胞間接着分子と共に細胞間接着部位に局在していた (図 2)。次に、Flag-tag を付加した PLEKHA5 を細胞に発現させ、抗 Flag-tag 抗体と抗 PLEKHA5 抗体を用いた Tandem affinity purification 法と質量分析により、PLEKHA5 結合タンパク質の網羅的な探索を行った。その結果、PLEKHA5 は E-cadherin を含むアドヘレンスジャンクションタンパク質、デスモソームタンパク質、シグナル伝達タンパク質などに結合することが明らかになった。従って、PLEKHA5 は E-cadherin などと結合して、細胞間接着を制御する可能性が示唆された。現在、CRISPR-Cas9 により PLEKHA5 のノックアウト細胞を作製し、細胞間接着への影響や、遺伝性口唇口蓋裂の家系で見つかった PLEKHA5 変異の病原性の解析を進めている。

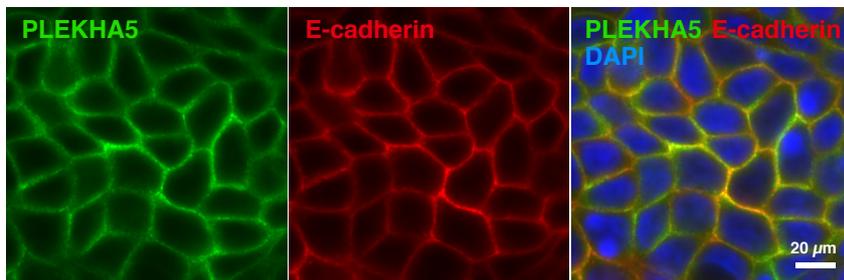


図 2. 細胞間接着における PLEKHA5 と E-cadherin の局在

(2) 間接蛍光抗体法によりスキルス胃癌細胞における PLEKHA5 の細胞内局在を解析したところ、PLEKHA5 が細胞膜や細胞内小胞に局在することが分かった。様々なオルガネラマーカースイグナル伝達分子との共局在について検討した結果、リサイクリングエンドソームに局在することが知られる低分子量 G タンパク質 Rab11 及び Arf6、トランスフェリン受容体と共局在していた。また PLEKHA5 の PH ドメインについて結合脂質の探索を行なったところ、ホスファチジルセリンと強く結合することが明らかになった。ホスファチジルセリンはリサイクリングエンドソームに局在し、細胞内輸送で重要な働きをしている。実際に、PLEKHA5 のノックダウンによりスキルス胃癌細胞において細胞内輸送の異常が確認された。また、詳細に PLEKHA5 の局在機構を解析したところ、受容体型チロシンキナーゼの下流で誘導されるチロシンリン酸化、N 末端部に存在する WW ドメインと PH ドメインが細胞膜や細胞内小胞への局在に重要であることを見出した。

以上の結果から、PLEKHA5 は細胞間接着とシグナル伝達に関わるアダプター分子であり、細胞間接着が喪失した癌細胞においては細胞内輸送に関与する可能性が示唆された。今後は、遺伝性口唇口蓋裂の家系で見つかった PLEKHA5 の変異体を作製し、その局在変化や細胞間接着構造への影響を調べる。さらには PLEKHA5 ノックアウトマウスを作製し、口唇口蓋裂における PLEKHA5 の重要性を個体レベルで明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Hideki, Nagamura Yuko, Miyazaki Makoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Receptor Tyrosine Kinases Amplified in Diffuse-Type Gastric Carcinoma: Potential Targeted Therapies and Novel Downstream Effectors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3750 ~ 3750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14153750	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 -

1. 著者名 Nagamura Yuko, Miyazaki Makoto, Nagano Yoshiko, Yuki Masako, Fukami Kiyoko, Yanagihara Kazuyoshi, Sasaki Kazuki, Sakai Ryuichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 PLEKHA5 regulates the survival and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells with Met gene amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00314-1	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 -

1. 著者名 Shirakihara Takuya, Yamaguchi Hideki, Kondo Tadashi, Yashiro Masakazu, Sakai Ryuichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Transferrin receptor 1 promotes the fibroblast growth factor receptor-mediated oncogenic potential of diffused-type gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2587 ~ 2596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02270-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口英樹、永村ゆう子、宮崎允、永野佳子、結城雅子、深見希代子、柳原五吉、佐々木一樹、堺隆一
2. 発表標題 Met遺伝子増幅を持つスキルス胃癌細胞におけるPLEKHA5の機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口英樹、宮崎允、永野佳子、深見希代子、柳原五吉、佐々木一樹、堺隆一
2. 発表標題 PLEKHA5はMet遺伝子増幅を持つスキルス胃癌細胞の生存及び腹膜播種を制御する
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 山口英樹、永村ゆう子、宮崎允、永野佳子、結城雅子、深見希代子、柳原五吉、佐々木一樹、堺隆一
2. 発表標題 スキルス胃癌細胞の増殖と腹膜播種におけるPLEKHA5の機能解析
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口英樹、永村ゆう子、宮崎允
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼの遺伝子増幅を持つスキルス胃がんにおけるSHP2の機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口英樹、宮崎允、大木理恵子、柳原五吉、堺隆一
2. 発表標題 SHP2は受容体型チロシンキナーゼ依存的なスキルス胃がんの治療標的候補分子である
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〕

所属研究部ホームページ
http://www.sasaki-institute.org/cancer_cell/

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	大木 理恵子 (Ohki Rieko) (70356252)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・独立ユニット長 (82606)	

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