

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15495

研究課題名（和文）胆管癌における、in vivo増殖能を指標とした新規癌幹細胞関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of a novel cancer stem cell-related gene in cholangiocarcinoma

研究代表者

藤盛 春奈（Fujimori, Haruna）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・研究員

研究者番号：80882935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：不均一な腫瘍組織には、再発や転移の主因となる高い腫瘍再構築能をもつ癌細胞が存在するとされるが、その詳細な維持機構は不明である。そこで胆管癌で、腫瘍再構築に重要な新規遺伝子を探索した。マウス皮下での腫瘍増大を指標に探索した結果、機能未知だったfailed axon connections homolog (FAXC)遺伝子を見出した。FAXCは胆管癌の腫瘍形成に必要な分子であり、ミトコンドリア上でがん悪性化因子であるANXA2およびc-SRCと複合体を形成し、ANXA2のリン酸化を亢進させた。さらに、FAXCは低酸素環境への応答を制御する可能性が示され、腫瘍形成を制御する新たな機構を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FAXCはこれまで一切報告のなかった機能未知遺伝子で、癌との関連報告も初めてである。そのため、今回見出した現象はすべてがん生物学的に新しく、また新規の治療標的として期待される。

研究成果の概要（英文）：Tumor heterogeneity is a well-known characteristic of cancer. Some cancer cells that survive after therapy are highly tumorigenic and contribute to metastasis and recurrence. To develop a therapeutic strategy targeting the highly tumorigenic cancer cells, we screened for a novel gene associated with tumorigenicity in cholangiocarcinoma (CCA). As a result, we identified a failed axon connection homolog (FAXC), whose function is unknown in mammals, by analyzing serially passaged CCA xenograft models. Knockdown of FAXC reduced subcutaneous tumorigenicity in immunodeficient mice. In addition, FAXC bound to the tumor-promoting genes annexin A2 (ANXA2) and c-SRC at the mitochondria and enhanced SRC-dependent ANXA2 phosphorylation. Transcriptome data from a xenografted CCA cell line revealed that FAXC correlated with hypoxia-related genes. Taken together, these findings further our understanding of CCA tumorigenesis.

研究分野：がん生物学、分子生物学

キーワード：PDX FAXC ANXA2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織は不均一な細胞集団である。なかにはわずかな細胞数から腫瘍を再構築できる造腫瘍能の高いがん細胞が存在し、転移や再発を引き起こす。そのため造腫瘍能の高いがん細胞を標的とした新たな治療法が望まれる。しかし、がん細胞がどのように造腫瘍能を発揮するか、詳細な機構はいまだ不明である。また、実験室で用いる培養皿上のがん細胞では、がん組織の不均一性を十分に反映していない。そのため、造腫瘍能の高いがん細胞を解析するには、がん組織の不均一性を再現する必要がある。

そこで本研究では、難治性である胆管癌に着目し、腫瘍の不均一性を考慮した系で、腫瘍能に重要な新規遺伝子を探索した。

腫瘍の不均一性を再現するには、腫瘍微小環境が重要である。マウスモデルはヒトの微小環境を模し、実際のヒト腫瘍組織を再現するのに適している。そのため、まずはヒト胆管癌の手術検体を免疫不全マウス皮下に異種移植し、patient-derived xenograft (PDX) を作製、すなわち移植片から腫瘍組織を再構築した。この胆管癌PDXを19代にわたり免疫不全マウス皮下で継代すると、継代に伴い腫瘍の増大が早くなり、造腫瘍能が高いがん細胞を濃縮できた。さらに、各継代の移植片についてマイクロアレイ解析を行った結果、継代に伴い発現量が上昇する遺伝子群を見出した。これらの遺伝子群は、造腫瘍能に寄与すると予想された。

2. 研究の目的

難治性の胆管癌において、造腫瘍能に重要な新規遺伝子を探索する。これにより造腫瘍の制御機構の詳細を明らかにし、新たな治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

当研究室で樹立した連続継代の胆管癌PDXをマイクロアレイ解析することで、造腫瘍能に重要だと予想される遺伝子群をすでに絞っていた。これらのうち、これまでがんとの関連が報告されていない遺伝子を解析対象とした。該当した候補遺伝子について、胆管癌細胞株でそれぞれ siRNA を用いてノックダウンし、造腫瘍能が抑制されるか調べた。ここで該当した遺伝子について、①共免疫沈降法と mass spectrometry (MS) 解析による会合分子の決定、②結合パートナー分子の機能的な相互作用の検討、③該当遺伝子のタンパク質の細胞内局在解析、④RNA-sequencing 解析による該当遺伝子の下流経路の探索を主に行った。

4. 研究成果

候補遺伝子について、胆管癌細胞株でそれぞれ siRNA を用いてノックダウンし、免疫不全マウス皮下に移植して造腫瘍能が抑制されるか調べた。その結果、これまで全く機能がわかっていなかった Failed Axon Connections Homolog (FAXC) 遺伝子が、胆管癌の形成に重要あることを見出した。FAXC はヒトやマウスでも先行研究がなく、がん生物学的にも新しい、完全新規の分子である。

FAXC は細胞内での動態も不明であったため、FAXC と相互作用する分子を探索した。Flag タグを融合させた FAXC を胆管癌細胞株に過剰発現させ、Flag 抗体で共沈降した分子について、MS 解析した。その結果、がん悪性化因子として知られる AnnexinA2 (ANXA2) と会合することが分かった。さらに FAXC は、ANXA2 をリン酸化するキナーゼである SRC とも相互作用することも判明した。SRC による ANXA2 のリン酸化は、癌悪性化を亢進させることが報告されていたため、SRC 依存的な ANXA2 リン酸化を FAXC が増強するか、*in vitro* キナーゼアッセイで検証したところ、FAXC の濃度依存的に SRC による ANXA2 リン酸化が増強された。FAXC はデータベース上、キナーゼドメインを持たないことが予測されたため、足場タンパク質のような役割を果たすと考えられた。また、共免疫沈降法にて、FAXC と ANXA2 の結合ドメインを探索した結果、FAXC の C 末端領域が ANXA2 の会合に必要であることが判明した。さらに、FAXC が細胞内の局在を蛍光免疫染色で調べたところ、主にミトコンドリアに局在することが分かり、ウエスタンブロット解析では、FAXC、ANXA2、SRC はミトコンドリア画分で検出された。

以上のことから、胆管癌において FAXC は、ミトコンドリア上で

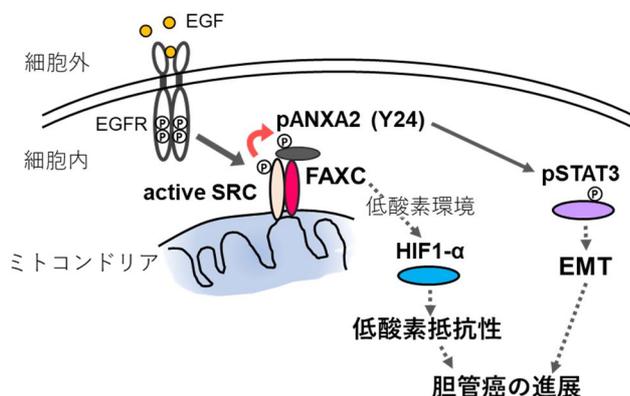


図1. 本研究より明らかになったFAXC動態のモデル図。
(Fujimori H et al. *Cancer Sci.* 2024. 一部改変)

ANXA2/SRC と相互作用し、ANXA2 リン酸化を増強することで、腫瘍進展を促進することが示唆された (図 1)。

また、免疫不全マウス皮下に移植した胆管癌細胞株について、RNA-sequencing 解析を行ったところ、FAXC ノックダウンにより低酸素応答、および上皮間葉転換関連の遺伝子セットが有意に抑制された (図 1)。このことより、FAXC が制御する下流経路は低酸素応答や上皮間葉転換の誘導と予想され、FAXC/ANXA2/SRC 複合体と関連するか、今後さらなる検証が必要である。

本研究では、機能未知だった FAXC 遺伝子を、造腫瘍に必要な遺伝子であることを見出した。FAXC の細胞内の動態についても解析を進め、また胆管癌の臨床検体においても、パラフィン包埋ブロック上で腫瘍部に FAXC が発現することが確認できている。今後は、FAXC の機能を阻害する化合物の探索や、他がん種での機能も調べることで、FAXC の治療標的としての有望性を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakazato Akira, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Fujimori Haruna, Fujii Keitaro, Saijoh Satoshi, Morita Shinkichi, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Sato Ikuro, Satoh Kennichi, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Yasuda Jun, Matsuura Kazuto, Shojaku Hideo, Asada Yukinori, Tamai Keiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 RELA is required for CD271 expression and stem-like characteristics in hypopharyngeal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22736-6	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 Tamai Keiichi, Fujimori Haruna, Mochizuki Mai, Satoh Kennichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cancer Stem Cells in Intrahepatic Cholangiocarcinoma; Their Molecular Basis, and Therapeutic Implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 824261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.824261	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 -

1. 著者名 Yasumoto Akihiro, Fujimori Haruna, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Shindo Norihisa, Yamaguchi Kazunori, Fukushi Daisuke, Wakui Yuta, Sugai Takahiro, Iwai Wataru, Abue Makoto, Sato Ikuro, Satoh Kennichi, Katayose Yu, Yasuda Jun, Shibata Chikashi, Tamai Keiichi	4. 巻 655
2. 論文標題 BEX2 is poor prognostic factor and required for cancer stemness in gastric cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.025	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 -

1. 著者名 Fujimori Haruna, Shima Nakamura Mao, Kanno Shin Ichiro, Shibuya Takahashi Rie, Mochizuki Mai, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Wakui Yuta, Abue Makoto, Iwai Wataru, Fukushi Daisuke, Satoh Kennich, Yamaguchi Kazunori, Shindo Norihisa, Yasuda Jun, Tamai Keiichi	4. 巻 115
2. 論文標題 <sc>FAXC</sc> interacts with <sc>ANXA2</sc> and <sc>SRC</sc> in mitochondria and promotes tumorigenesis in cholangiocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1896 ~ 1909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16140	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤盛春奈、高橋-渋谷莉恵、菅野新一郎、望月麻衣、進藤軌久、山口壹範、安田純、玉井恵一
2. 発表標題 胆管癌を進展させる新規遺伝子Xの同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤盛春奈、菅野新一郎、高橋-渋谷莉恵、望月麻衣、進藤軌久、山口壹範、安田純、玉井恵一
2. 発表標題 FAXCは胆管癌の腫瘍形成に寄与する
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤盛春奈、高橋-渋谷莉恵、菅野新一郎、望月麻衣、進藤軌久、山口壹範、安田純、玉井恵一
2. 発表標題 "胆管癌進展に寄与する新規分子FAXCの細胞内動態
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤盛春奈、高橋-渋谷莉恵、菅野新一郎、望月麻衣、進藤軌久、山口壹範、安田純、玉井恵一
2. 発表標題 胆管癌を進展させる新規遺伝子FAXCは、SRCによるANXA2リン酸化を増強する
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年
4. 発表年 2023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
---------	---------