The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PLXND1/SEMA3E Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Partly via the PI3K/AKT- Signaling Pathway and Induces Heterogenity in Colorectal Cancer
Author(s)	萩原, 清貴
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91766
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	萩原　清貴
論文題名 Title	PLXND1/SEMA3E Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Partly via the PI3K/AKT-Signaling Pathway and Induces Heterogenity in Colorectal Cancer (PLXND1/SEMA3Eは、PI3K/AKTシグナル経路を一部経由して上皮間葉移行を促進し、大腸癌の多様性を誘導する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

癌細胞の特性には、無限増殖能と転移能などが挙げられるが、その中でも、癌の遠隔転移は、癌の予後に直結する最大の障壁である。癌細胞の浸潤および転移には、上皮間葉移行（epithelial-mesenchymal transition；EMT）が重要な働きを担っており、その最も強力な誘導因子は、transforming growth factor-beta (TGF-beta)であることが数多く報告されている。しかし、EMTが誘導された細胞集団内における多様性（heterogeneity）や、EMTを構成する亜細胞集団におけるEMTの誘導機序の差異などに関しては未だ不明な点が多い。今回、われわれは、先行して行なってきた治療抵抗性癌幹細胞様集団の網羅的遺伝子解析の結果を元に、SEMA3EのレセプターであるPLXND1に着目し、大腸癌におけるPLXND1誘導性のEMT現象の存在と、その誘導機序、さらに、EMT細胞集団における多様性形成への寄与の解析を行うことを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

大腸癌細胞株を用いてPLXND1の発現の確認を行った。PLXND1が高発現しているSW480とRKOを選定し、PLXND1の発現抑制系(si-PXND1およびsh-PLXND1)を作成し、上皮系(E-cadherin)ならびに間葉系マーカー(Snail, Vimentin, ZEB1)の発現をWestern blottingで確認した。また、細胞遊走能、浸潤能、抗癌剤感受性の評価を行った。PLXND1発現抑制により、上皮系マーカーの発現の増加と間葉系マーカーの発現の低下が認められ、細胞遊走能、浸潤能はともに低下し、抗癌剤感受性は亢進した。さらに、PLXND1の発現の抑制によりリン酸化PI3K/AKTシグナルは低下していた。PLXND1の利用可能なブロッカーは存在しないため、PLXND1のリガンドであるSEMA3Eの阻害剤であるFurin阻害剤に着目した。SEMA3Eの不活性型であるFull length SEMA3EはFurinによる修飾を受け、p61-SEMA3Eに変換され、PLXND1と結合する。SEMA3E/PLXND1シグナルが実際に上皮間葉移行を誘導しているのかを検討するために、Furin阻害剤処理下での、EMTマーカー発現、細胞遊走能、浸潤能、抗癌剤感受性の検討を行った。Furin阻害剤を用いることで、上皮系マーカーの発現亢進と間葉系マーカーの発現低下、細胞遊走能、浸潤能の低下、抗癌剤感受性の亢進を認めた。多重蛍光免疫染色では、間葉系マーカーであるZEB1発現細胞の中にPLXND1発現細胞とPLXND1非発現細胞が存在しており、PLXND1発現に依存するEMT細胞集団内の多様性が存在することが示された。BALB/cマウスにRKO細胞(controlとsh-PLXND1)を皮下投与し、EMTマーカーの発現をWestern blotting、免疫染色で確認したところ、sh-PLXND1群でのEMTの阻害（上皮系マーカーの発現増加と間葉系マーカー発現の低下）と、リン酸化PI3K/AKTシグナルの低下を認めた。TGF-beta誘導性EMTの中核となるリン酸化Smad2/3シグナルの変化を認めなかった。最後に、PLXND1と予後の相関を大腸癌182例症例でのRT-PCRで検討した。全生存率、無再発生存率はいずれもPLXND1高発現群の方が低発現群に比較して低く、特に全生存率は有意に低かった(p=0.0352)。また全生存率の多変量解析を行い、PLXND1高発現は独立した予後規定因子であった。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、p61-SEMA3E/PLXND1シグナルが、 PI3K/ AKT経路を介してEMTを誘導し、細胞浸潤、遊走、そして抗癌剤に対する抵抗性を促進することを明らかにした。Furinは、TGF-beta前駆体をTGF-betaに変換する働きも有している。Furin阻害剤を用いることにより、SEMA3E/PLXND1シグナル依存性EMTのみでなく、TGF-beta依存性のSmadを介したEMTも阻害可能となり、さらなるEMTの抑制効果が期待される。さらに本研究では、間葉系細胞がPLXND1の発現状態に依存した多様性を形成することを見出した。PLXND1の機能はまだ十分に解明されておらず、PLXND1発現状態に依存する各細胞分画の特性（転移能や腫瘍再形成能など）の、さらなる研究が必要である。化学受容体とメカノセンサーとして働くPLXND1の機能解析が進めることで、癌の転移機構の解明につながる可能性がある。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）萩原　清貴

論文審査担当者		（職）	氏　名	
	主　査	大阪大学教授	土岐 祐一郎	署名
	副　査	大阪大学教授	新谷 隆	署名
	副　査	大阪大学教授	谷内田 真一	署名

論文審査の結果の要旨

癌細胞の特性には無限増殖能と転移能などが挙げられるが、その中でも癌の遠隔転移は、癌の予後に直結する最大の障壁である。癌細胞の浸潤および転移には、上皮間葉移行が重要な働きを担っている。この論文では、細胞膜貫通型受容体であるPLXND1とリガンドであるSEMA3Eが結合することで、PI3K/ AKT経路を介して上皮間葉移行を誘導することを示した。PLXND1発現を抑制することで上皮間葉移行が抑制され、細胞浸潤能、遊走能の低下、抗癌剤に対する感受性の亢進を認めた。また、間葉転化した細胞にはPLXND1陰性、陽性細胞が存在し、PLXND1の発現状態による多様性を形成していることを見出した。本研究はAnnals of Surgical Oncologyに掲載され、学位の授与に値すると考えられる。