

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20502

研究課題名（和文） 5 3インテグリンを介した癌進展メカニズムの解明と増殖抑制法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the cancer progression through the $\alpha 5\beta 3$ integrin pathway for establishment of a novel treatment for tumor growth

研究代表者

皆川 康之（MINAKAWA, YASUYUKI）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30639787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ANGPTL3遺伝子は口腔癌由来細胞株および口腔癌臨床サンプルにおいて発現増強しており、その発現を抑制した形質転換細胞株を用いた検証から、MAPK経路を介した細胞周期調節によって原発腫瘍の増殖能に強く影響を及ぼすことが示唆された。さらに、ANGPTL3の発現抑制に伴い、様々なインテグリン関連遺伝子が影響を受けることが確認され、ANGPTL3の制御により、口腔癌の進展に関与する可能性が示された。したがって、本研究結果は、ANGPTL3を分子標的とした新たな治療の礎となると考えられ、今後の臨床応用の際に有益なデータになると思われる。

研究成果の概要（英文）：Significant ANGPTL3 up-regulations were found in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines and primary OSCC patients compared with normal counterparts. Using ANGPTL3 knockdown cells, we revealed that decreased tumoral growth was closely correlated with cell-cycle arrest at the G1 phase via MAPK signaling cascades. In addition, ANGPTL3 controlled $\alpha 5\beta 3$ integrins in OSCCs, indicating that ANGPTL3 may play an important role in OSCC progression and diagnostic/therapeutic targets for the patients with OSCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：5 3integrin Angiotensin-like3 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

癌細胞における増殖、浸潤、転移などの性質を決定するシグナル伝達経路に作用する様々な因子や遺伝子に関する研究が盛んに行われており、このシグナル伝達経路とそれに対する作用因子や遺伝子の組み合わせが明らかになれば、癌の性質（悪性度）や治療上の注意点を事前に予測診断することが可能である。また、これらの系における要となる因子・遺伝子は癌治療における分子標的となり、これに作用する薬剤は分子標的治療薬として癌治療に大きな進歩をもたらす可能性がある。本研究ではインテグリンに着目した。インテグリンは癌細胞の転移に関与していると既に報告されている重要な接着因子であるが、非常に複雑な癌細胞転移メカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。また、インテグリンは単なる接着因子であるだけでなくシグナル伝達に重要な役割を担い、癌細胞の性質決定に大きな影響を与えることが知られている。さらにインテグリンは、一言にインテグリンと呼称されるがその構成ドメインにより、インテグリンへの結合因子やシグナル伝達経路、さらにはその細胞活動への影響などが異なっている。

本研究に先立ち、口腔癌細胞株 2 種に対する microarray 解析を行い、以下の結果を得た。i) 口腔癌細胞において発現増強している遺伝子群の中で、最も発現増強しているインテグリンの構成ドメインは $\alpha 5$ と $\beta 3$ であることを明らかにした。ii) $\alpha 5\beta 3$ タイプのインテグリンに作用する遺伝子群の中でもっとも発現増強している遺伝子が Angiotensin-like 3 (ANGPTL3) 遺伝子であることを明らかにした。

本研究ではインテグリンを単なる接着因子ではなく、複雑な機能を有するシグナル伝達系の受容体として位置付け、既に同定した ANGPTL3 についてターゲット遺伝子や細胞周期への影響等を含めて詳細に解析することで、新たな癌治療を開発するためのシーズ研究となり、臨床的にも社会的にも重要な研究であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では既に同定した ANGPTL3 について、口腔癌における ANGPTL3 の発現状態やその臨床的・分子生物学的意義について、*in vitro*, *in vivo* の両面から明らかにすることを目的とする。さらには ANGPTL3 が作用するシグナル伝達経路について明らかにし、

ANGPTL3 制御により癌細胞の進展を抑制する治療法の開発について検討する。

3. 研究の方法

(1) 多くの口腔癌由来細胞株および臨床サンプルに関して、ANGPTL3 が高発現している

ることを確認する。

① 口腔癌由来細胞株における ANGPTL3 の mRNA、タンパクレベルの発現状態について、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析する。

② 臨床サンプルにおける ANGPTL3 の発現状態について、リアルタイム PCR、免疫組織化学染色法を用いて解析する。

③ 臨床諸指標と ANGPTL3 の発現状態との関係を検討しその臨床的意義を明らかにする。

(2) ANGPTL3 の遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製し、それをもちいた機能解析およびマウス移植実験を行い、増殖・浸潤・転移における ANGPTL3 の役割を明らかにする。

① 培養細胞に ANGPTL3 遺伝子の shRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製する。

② 形質転換細胞を用いた増殖能試験、浸潤能試験、遊走能試験により ANGPTL3 が増殖、浸潤、遊走に与える影響を検討する。

③ 形質転換細胞を用いたマウス移植実験により、*in vivo* における腫瘍の増殖・転移に関する ANGPTL3 の役割を明らかにする。

(3) 形質転換細胞と親株の発現状態の比較により、作用するターゲット遺伝子や細胞周期への影響を明らかにする。

① ANGPTL3 の $\alpha 5\beta 3$ インテグリンのシグナル伝達経路への影響を明らかにする。

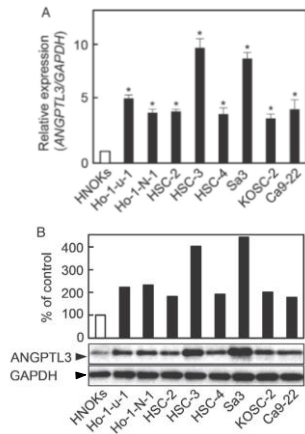
② 形質転換細胞と口腔癌由来細胞株（親株）の発現状態を microarray 解析にて網羅的に解析し、どのようなターゲット遺伝子に作用するかを検討する。

③ 同様に、その比較から細胞周期への影響を明らかにする。

4. 研究成果

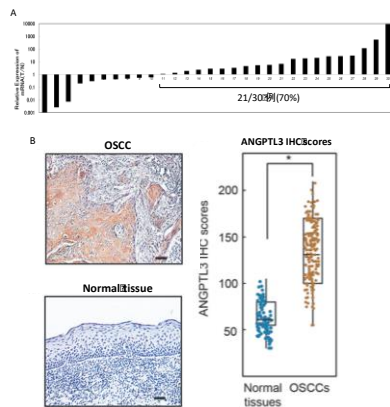
(1) 多くの口腔癌由来細胞株および臨床サンプルに関して、ANGPTL3 が高発現していることを確認する。

① 口腔癌由来細胞株における ANGPTL3 の mRNA、タンパクレベルの発現状態について、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析したところ、いずれも有意な発現亢進を認めた。(図 1)



(図 1:ANGPTL3 の発現確認 A:リアルタイム PCR、B:ウエスタンブロット法)

② 臨床サンプルにおける ANGPTL3 の発現状態について、リアルタイム PCR、免疫組織化学染色法を用いて解析したところ、リアルタイム PCR では 70%のサンプルで発現亢進を認めた。また、免疫組織化学染色では正常組織部に比較して腫瘍部において有意な発現亢進を認めた。(図 2)



(図 2: 臨床サンプルにおける ANGPTL3 の発現状態 A:リアルタイム PCR B:IHC)

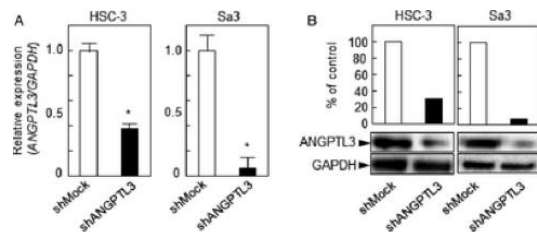
③ 臨床諸指標と ANGPTL3 の発現状態との関係を検討したところ、腫瘍径に有意な相関を認めた。(表 1)

Clinical classification	Total	Results of immunostaining on patients (%)		P value ¹
		ANGPTL3 negative	ANGPTL3 positive	
Age at surgery (years)				0.367
<65	30	13 (43)	17 (57)	
≥65	26	13 (50)	13 (50)	
276	53	18 (33)	35 (66)	
Gender				0.697
Male	74	31 (42)	43 (58)	
Female	35	13 (36)	22 (63)	
Primary tumor				0.017
T1	8	6 (75)	2 (25)	
T2	38	26 (68)	12 (32)	
T3	20	6 (30)	14 (70)	
T4	23	6 (26)	17 (74)	
T1 + T2	46	32 (69)	14 (31)	
T3 + T4	43	12 (28)	31 (72)	
Receptor lymph node				0.627
N (-)	63	26 (41)	37 (59)	
N (+)	46	18 (39)	28 (61)	
Stage				0.067
I	7	5 (71)	2 (29)	
II	45	19 (42)	26 (58)	
III	18	6 (33)	12 (67)	
IV	39	11 (28)	28 (72)	
Vascular invasion				0.967
V (-)	79	32 (40)	47 (60)	
V (+)	30	12 (40)	18 (60)	
Histopathologic type				0.787
Well	61	24 (39)	37 (61)	
Modestly	42	17 (40)	25 (60)	
Poorly	6	3 (50)	3 (50)	
Tumoral site				0.197
Oral cavity	35	10 (28)	25 (72)	
Tongue	61	29 (48)	32 (52)	
Buccal mucosa	7	3 (43)	4 (57)	
Oral floor	6	2 (33)	4 (67)	
Total	109	44 (40)	65 (60)	

(表 1:ANGPTL3 の発現と臨床指標の相関)

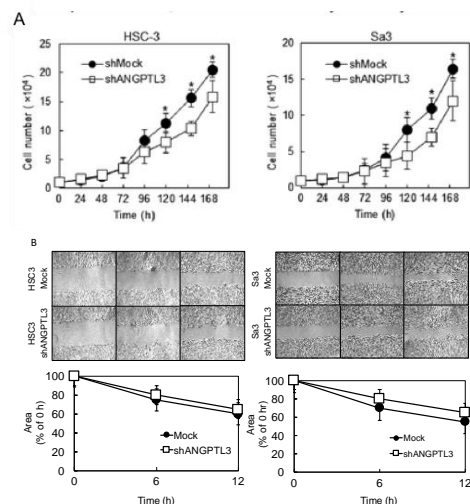
(2) ANGPTL3 の遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製し、それをもちいた機能解析およびマウス移植実験を行い、増殖・浸潤・転移における ANGPTL3 の役割を明らかにする。

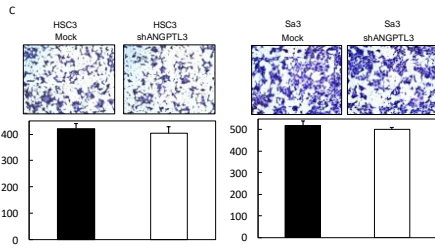
① 培養細胞に ANGPTL3 遺伝子の shRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した形質転換細胞を作製し、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法にて ANGPTL3 の発現減弱を確認した。(図 3)



(図 3: 形質転換細胞株の樹立 A:リアルタイム PCR、B:ウエスタンブロット法)

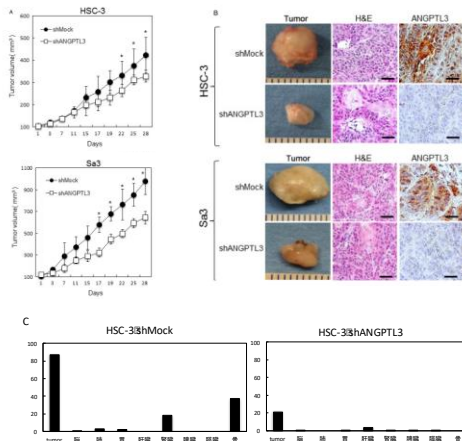
② 形質転換細胞を用いて増殖能試験、浸潤能試験、遊走能試験を行ったところ、shMock に比べて shANGPTL3 では増殖能に有意な差を認めた。浸潤能、遊走能には有意な差を認めなかった。(図 4)





(図4：機能解析 A：増殖能試験 B：遊走能試験 C：浸潤能試験)

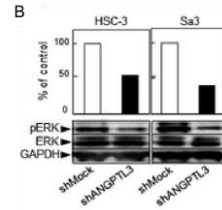
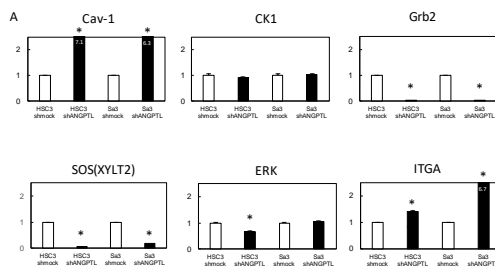
③ 形質転換細胞を用いたマウス移植実験を行なったところ、*in vivo*において shMock に比べて shANGPTL3 では腫瘍増殖能に有意な差を認めた。臓器別に行なった転移評価実験では、shMock に比べて shANGPTL3 において、原発腫瘍だけでなく各臓器への腫瘍転移率においても有意な低下を認めた。(図5)



(図5：マウス移植実験 A：腫瘍増殖試験 B：腫瘍における IHC C：転移評価実験)

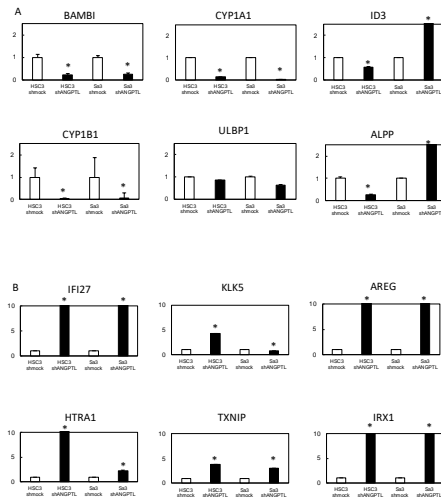
(3) 形質転換細胞と親株の発現状態の比較により、作用するターゲット遺伝子や細胞周期への影響を明らかにする。

① ANGPTL3 の $\alpha 5\beta 3$ インテグリンのシグナル伝達経路への影響をリアルタイム PCR にて検討した。(図6)



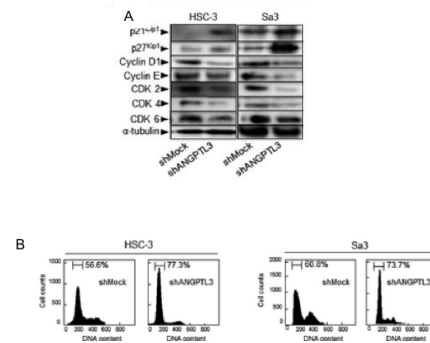
(図6：インテグリン関連遺伝子群の解析 A：リアルタイム PCR B；ウエスタンブロット)

② 形質転換細胞と口腔癌由来細胞株(親株)の発現状態を microarray 解析にて網羅的に解析し、どのようなターゲット遺伝子に作用するかを検討した。(図7)



(図7 共通変動遺伝子の解析 A：発現亢進遺伝子群 B：発現減弱遺伝子群)

③ 同様に、その比較から ANGPTL3 は細胞周期のうち特に G1 期に参与することで、腫瘍増殖へ影響を及ぼすことを明らかにした。(図8)



(図8：細胞周期関連解析 A：ウエスタンブロット法 B：フローサイトメトリー)

[まとめ]

本申請研究期間において、口腔癌細胞において発現増強している $\alpha 5\beta 3$ タイプのインテグリンに作用する遺伝子群の中でもっとも発現増強している Angiotensin-like3(ANGPTL3) 遺伝子の臨床的・分子生物学的意義について、*in vitro*, *in vivo* の両面から明らかにした。ANGPTL3 遺伝子は口腔癌由来細胞株、口腔癌臨床サンプルにおいて発現増強しており、その発現を抑制した形質転換細胞株を用いた検証から、特に MAPK 経路を介した細胞周期調節によって原発腫瘍の増殖能に強く影響を及ぼすことが示唆された。さらに、ANGPTL3 の抑制に伴い、様々なインテグリン関連遺伝子、ターゲット遺伝子が影響を受けることが確認され、 $\alpha 5\beta 3$ タイプインテグリン、特に ANGPTL3 の制御により、口腔癌の進展を制御する可能性が示された。したがって、本研究結果は、ANGPTL3 を分子標的とした新たな分子標的治療の礎となると考えられ、今後の臨床応用の際に有益なデータになると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

皆川 康之 (MINAKAWA, Yasuyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：30639787

(2) 研究分担者：なし

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

研究者番号：

(4) 研究協力者：なし