

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11719

研究課題名(和文) Ciz-RANKLシグナル機構の解明と癌骨転移に対する新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Elucidation of Ciz-RANKL signaling mechanism and search for novel therapeutic target molecules for cancer bone metastasis.

研究代表者

佐久間 朋美 (Sakuma, Tomomi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70633733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫細胞株B16と、転移能が高いB16F10との比較から細胞の遊走性と接着性およびRANKLに対するCizの役割を検証した。また他の腫瘍細胞のCizの発現量についてRNA・タンパク質レベルにおいて解析し、悪性度の違いにより発現量や性質の違いが認められるか検証した。CizはRas/MEK/MAPK経路を介した細胞骨格制御や生存維持への関与が推定されるが、Cizノックダウンおよび強制発現細胞におけるERK1/2、MAPK、p130cas等のタンパク質レベルを解析し、Ciz発現による影響を明らかにした。細胞接着と遊走性に着目し、細胞接着面におけるポドソーム発現の経時的変化について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はCiz (Cas Interacting Zinc Finger Protein)発現の寄与を検証しCiz - RANK (NFκB 活性化受容体リガンド) 関係シグナルの分子機構を解明し、骨転移に関する新たなメカニズムを解明し、その予防や治療の創薬の標的開発・同定を目的とした。

腫瘍細胞の悪性度の違いと、Ciz発現量の関連を悪性黒色腫だけでなく他の細胞でも検証することにより、腫瘍細胞の骨転移のメカニズムの要所である、細胞の遊走性と接着性のメカニズムを解明する一助となる知見を示せた。また、さらなるターゲットとしてポドソームの発現変化の検証は今後さらに本研究の意義を興味深いものにしていけると考える。

研究成果の概要(英文)：From the comparison between the malignant melanoma cell line B16 and B16F10, which has high metastatic potential. The role of Ciz on tumor cell migration and adhesion and RANKL was examined. In addition, we analyzed the expression level of Ciz in other tumor cells at the RNA and protein levels, and proceeded to verify whether differences in the expression level and properties were observed as in malignant melanoma depending on the difference in malignancy. Although Ciz is presumed to be involved in cytoskeletal regulation and survival maintenance via the Ras / MEK / MAPK pathway, protein levels of ERK1 / 2, MAPK, p130cas, and phosphorylated p130cas in Ciz knockdown and forced expression cells were estimated. Analysis was performed to clarify the effect of Ciz expression. Focusing on cell adhesion and migration, we analyzed changes over time in podosome expression depending on the migration stage on the adhesion surface of tumor cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：Ciz 腫瘍転移能 RANKL 悪性度 ポドソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

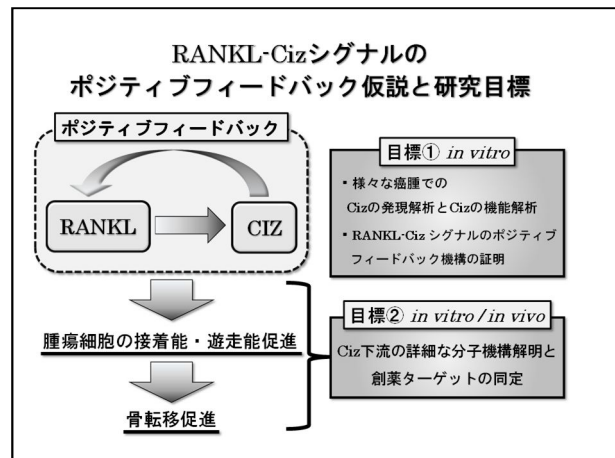
### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療成績は先進医療の進歩により改善されてきた。しかし骨転移の強い疼痛と骨欠損や麻痺による機能障害は患者のQOLを著しく低下させるため、その予防法と治療法の確立が強く望まれている。顎顔面外科領域においても腫瘍骨転移は重要課題である。骨転移頻度の高い悪性腫瘍として、肺癌・乳癌・前立腺癌に加えて、口腔内では悪性黒色腫の発生頻度が高い(顎口腔領域に発生する全悪性腫瘍の約1%)。悪性黒色腫の骨転移発症率は比較的高く、骨転移例における5年生存率は著しく低下する。口腔内に生じた悪性黒色腫細胞は顎骨へ転移・浸潤すると広範切除手術の適応となるが、放射線治療や化学療法の効果を得にくい。骨髄への薬剤移行が悪く抗癌剤が効きにくいと考えられる。癌の骨転移には多段階の複雑な要因が関わり、各要因には骨吸収性サイトカイン、インテグリンシグナル、接着分子、細胞骨格、骨リモデリング制御因子などが関与する。とりわけ接着関連分子は癌細胞同士、異種細胞間の接着や、細胞外基質との相互作用によって、転移における重要な役割を果たす。本研究は、癌骨転移に重要な細胞接着と液性因子を介したシグナルが、細胞形態の変化を介して腫瘍遊走性と接着性を獲得する機構に関わる新規分子 Ciz に注目した。

### 2. 研究の目的

口腔腫瘍骨転移に対する治療は顎顔面外科領域における解決すべき重要課題の1つである。本研究は、「腫瘍細胞に発現する Cas 結合ジンクフィンガー蛋白質 (Ciz) が骨と免疫系に大きく関与する RANKL とポジティブフィードバックを形成して、腫瘍細胞の遊走能・接着能を促進することで転移巢形成に寄与する」という報告 (Sakuma T, et.al. *J Cell Physiol.* 2012) に基づき、腫瘍の転移に Ciz 発現が寄与する事実を検証し Ciz-RANKL 関連シグナルの分子機序を解明することで腫瘍転移に寄与する Ciz のターゲット分子を標的とした治療応用の可能性へ発展させることを目的とする。

中でも右図に示すように、Ciz と RANKL との間のポジティブフィードバック機構の詳細な分子機序を解明し、さらに転移能促進に関わる Ciz 下流のシグナル分子機序を推定し、創薬のターゲットとなるような Ciz の標的分子を同定することを目標とする。



### 3. 研究の方法

#### [in vitro 培養系での解析]

- Cizの発現解析 (RNA レベル、タンパク質レベル)

口腔癌を含む様々な癌腫における Ciz の発現レベルを各癌腫の細胞株を用いて解析する。

- Cizの機能解析 (細胞遊走能とマトリックス分子分解活性の解析)

Ciz は転写因子として MMP の遺伝子発現を制御する (Hayata T, et.al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008) ため、この制御側面も重要な転移促進機構として働く可能性が考えられる。そこで、Trans-well の上部チャンバーの膜をマトリゲルコーティングして B16 細胞の膜貫通性を比較検討することで、Ciz 発現の相違が基質分解能に影響するか否かについて検討する。

- Ciz 下流分子の検索

Ciz は p130cas と接して細胞内局在することから、Ras / MEK / MAPK 経路を介した細胞骨格制御や生存維持への関与が推定される。そこで Ciz ノックダウン細胞および Ciz 強制発現細胞における ERK1/2、MAPK、p130cas、リン酸化 p130cas のタンパク量レベルをウェスタンブロットティング法により解析し、Ciz 発現による影響を明らかにする。

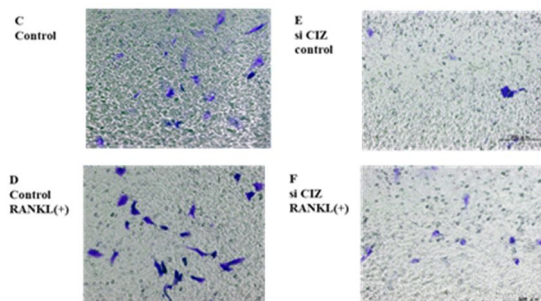
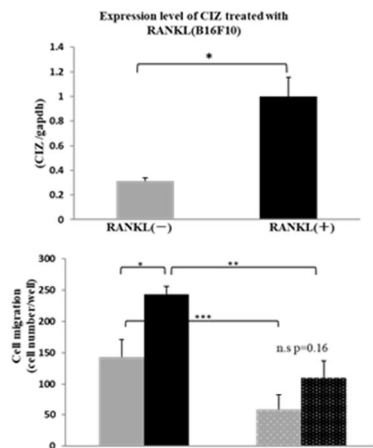
- Ciz 発現の有無による遺伝子発現プロファイル変化の解析

Ciz 遺伝子ノックアウト B16F10 と野生型 B16F10 の腫瘍関連遺伝子の発現量をマイクロアレイで比較する。また RANKL 添加による遺伝子発現変化を時系列で解析し、Ciz-RANKL ポジティブフィードバック機構を介した細胞遊走性亢進に関わる Ciz 下流の分子経路を推定し創薬ターゲットとなる分子を同定する。

#### 4. 研究成果

メラノーマ細胞株におけるCIZ発現レベルはメラノーマ転移能およびインビトロでの細胞遊走性・接着性と相関したことから、Cizはこれらの機能を介して転移に関与すると推測されるRANKLによってCIZ発現が誘導されたことから、骨におけるRANKL存在下でCIZはメラノーマ細胞の細胞接着能と転移能をさらに高めて骨転移に関与する機構が推察され、先の研究で明らかにされなかったRANKLによる腫瘍細胞の転移促進機構の一部が明らかにされた。RANKLによってCIZ発現が誘導されたことから、骨におけるRANKL存在下でCIZはメラノーマ細胞の細胞接着能と転移能をさらに高めて骨転移に関与する機構が推察され、先の研究で明らかにされなかったRANKLによる腫瘍細胞の転移促進機構の一部が明らかにされた。

CizはRas/MEK/MAPK経路を介した細胞骨格制御や生存維持への関与が推定されるが、Cizノックダウン細胞およびCiz強制発現細胞におけるERK1/2、MAPK、p130cas、リン酸化p130casのタンパク量レベルをウェスタンブロッティング法により解析し、Ciz発現による影響を明らかにした。さらなる追加情報を得て確実な解析を行いたい。細胞の接着及び遊走性について再度着目し、腫瘍細胞接着面の遊走ステージに応じたポドソーム発現の経時的変化について解析し、興味深いデータを得た。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐久間 朋美
2. 発表標題 Oxidative stress partially induces tendon cell ossification via the ATP metabolite adenosine
3. 学会等名 アメリカ骨代謝学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特記なし
------

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
研究協力者	江面 陽一  (Ezura Yoichi)		
研究協力者	梶川 修平  (kajikawa Shuhei)		