

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K11875  
 研究課題名(和文) 2-アンチプラスミン遺伝子搭載センダイウイルスベクターによる新規口腔癌治療研究  
  
 研究課題名(英文) Development of gene therapy for oral cancer using Sendai virus vector with alpha2-antiplasmin gene  
  
 研究代表者  
 浜名 智昭(hamana, tomoaki)  
  
 広島大学・医系科学研究科(歯)・助教  
  
 研究者番号：40397922  
 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)：口腔扁平上皮癌細胞のプラスミノゲン処理によりE-カドヘリンの裏打ち蛋白であるβ-カテニンの細胞膜から核内への移行が示唆された。さらにサイクリンD1の発現亢進も認めたことから、プラスミンによるE-カドヘリンの切断・断片化に伴いβ-カテニンが細胞核内に移行することで細胞増殖を亢進している可能性が示された。これらの結果は、2-アンチプラスミン蛋白によるプラスミン活性の阻害が、口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能を低下させる可能性を示唆している。したがって、2-アンチプラスミン蛋白発現誘導は口腔癌の浸潤・転移を抑制する、新しい遺伝子治療の開発につながる事が期待できる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにプラスミンが、E-カドヘリンを切断することで、口腔扁平上皮癌の細胞間接着を抑制し、分散能を亢進することを報告し、さらに、癌細胞の増殖能の亢進も認めることを示してきた。今回、プラスミンによるE-カドヘリンのプロセッシングに伴いβ-カテニンが細胞質に蓄積することで核内に移行し、細胞増殖を亢進している可能性が示されたことから、高い遺伝子導入効率で、安全なセンダイウイルスベクターを用い、2-アンチプラスミン遺伝子を腫瘍組織へ直接投与することで、癌の浸潤・転移を抑制しようとする本研究は、従来の外科手術や放射線治療にかかわる安全性の高い口腔癌のin vivo遺伝子治療法の開発へ発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：It was indicated that β-catenin which bind to cytodomain of E-cadherin translocated from the plasma membrane to the nucleus by treatment of squamous cell carcinoma cells with plasminogen. Furthermore, upregulation of cyclin D1 was also observed. Therefore, it was suggested that it might promote cell proliferation by the translocating β-catenin into the nucleus associated with the cleavage of E-cadherin by plasmin. These findings suggest that the suppression of the plasminogen activator/plasmin system by alpha2-antiplasmin might reduce the proliferation of OSCC cells. Therefore, it could be expected the development of gene therapy for invasiveness and metastasis of OSCC cells with induction of alpha2-antiplasmin into OSCC tissue.

研究分野：外科系歯学

キーワード：2-アンチプラスミン プラスミン E-カドヘリン センダイウイルスベクター 口腔癌遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療を行う上で最大の障害は遠隔臓器への転移巣形成である。口腔癌は手術や放射線治療により原発巣が制御されているにもかかわらず、所属リンパ節への転移により予後不良となる症例が数多く見受けられる。プラスミノゲン/プラスミン系は細胞外基質蛋白に対し強い分解活性を有し、がんの浸潤・転移を制御している。一方、E-カドヘリンは上皮細胞の悪性化に伴い発現や機能が低下することや、癌細胞の E-カドヘリンの発現低下と浸潤・転移や予後との関連性が数多くの研究によって確認されている。また、ある種のがん患者血清中では E-カドヘリンの細胞外ドメイン量が上昇しており、その予後との相関性が報告されている。

本研究者はこれまでに、プラスミンが細胞間接着分子である E-カドヘリンを細胞外ドメインで切断し、癌細胞膜上の E-カドヘリン発現を低下させることをみだし、プラスミンが E-カドヘリンの重要なプロセッシング調節因子であることを明らかにした。さらにプラスミンによる E-カドヘリンの切断は扁平上皮癌の細胞間接着を抑制し、細胞遊走能を亢進させることを示した (Int. J. Oncol. 2005)。また、プラスミンが扁平上皮癌細胞の増殖能を亢進させることを示した。次に、プラスミン阻害物質である 2-アンチプラスミンの遺伝子導入細胞を用い、2-アンチプラスミンによるプラスミン活性の阻害が、E-カドヘリンのプロセッシングを抑制し、扁平上皮癌の細胞分散能を抑制していることを報告した (Oncology Reports, 2007)。さらに、2-アンチプラスミンの遺伝子導入細胞は、*in vitro*での増殖能が低下しており、*in vivo*では造腫瘍能が著しく抑制されていることを示した。また、2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞のヌードマウス形成腫瘍は E-カドヘリン蛋白の発現が亢進していた。これらの研究結果から、プラスミンは細胞外基質蛋白分解系の中心的な役割を果たすほか、E-カドヘリンをプロセッシングすることで癌細胞の分散能を亢進させ、さらに増殖能を制御し、がんの浸潤・転移を促進していると思われる。従ってプラスミン活性の阻害は、癌細胞の蛋白分解活性を抑制するだけでなく、分散能と増殖能を低下させ、がんの浸潤・転移を抑制すると推測される。そこで、プラスミン活性の阻害によるがんの浸潤・転移抑制を目的とした *in vivo* 遺伝子治療の開発を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

申請者は、プラスミンが、細胞間接着分子である E-カドヘリンを切断し、癌細胞の分散能を亢進することを報告し、さらに、プラスミンが癌細胞の増殖能を亢進することを示してきた。

本研究では、プラスミン阻害物質である 2-アンチプラスミンの遺伝子を、高い遺伝子発現能を有し、かつ遺伝毒性がないセンダイウイルスベクターに搭載し、腫瘍組織内へ直接投与することで、*in vivo*において 2-アンチプラスミン蛋白の発現を、高効率で安全に誘導し、扁平上皮癌における蛋白分解活性のみならず分散能と増殖能を低下させることにより、口腔癌の浸潤・転移を制御する、新しい *in vivo* 遺伝子治療の開発を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、センダイウイルスベクターを用いて、2-アンチプラスミン遺伝子を口腔扁平上皮癌細胞に導入して、2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞の *in vitro*での細胞分散能、細胞増殖能、E-カドヘリンおよび細胞増殖関連蛋白発現を検討する。つぎに、*in vivo*での造腫瘍能と転移能を検討し、さらに形成した腫瘍での E-カドヘリン蛋白および増殖関連蛋白の発現を検索する。その後、扁平上皮癌細胞のヌードマウス形成腫瘍に、2-アンチプラスミン遺伝子搭載センダイウイルスベクターを直接注入し、腫瘍組織中での 2-アンチプラスミン蛋白の発現とその増殖能に与える影響および転移抑制効果を検討する。

## 4. 研究成果

これまでの研究で、2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞をヌードマウス背部皮下に移植し、形成した腫瘍組織を免疫組織化学染色にて検索した結果、遺伝子導入細胞によるヌードマウス形成腫瘍は、E-カドヘリンの裏打ち蛋白である  $\beta$ -カテニンの細胞膜での発現が亢進していることが確認された。

細胞質内の  $\beta$ -カテニンの大部分は Axin, APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) と複合体を形成し、GSK-3 によりリン酸化をうけ、ユビキチン-プロテアソーム系を介してすみやかに分解されることが知られている。癌細胞では APC または  $\beta$ -カテニン自身の変異のため、分解されずに細胞内に蓄積した  $\beta$ -カテニン

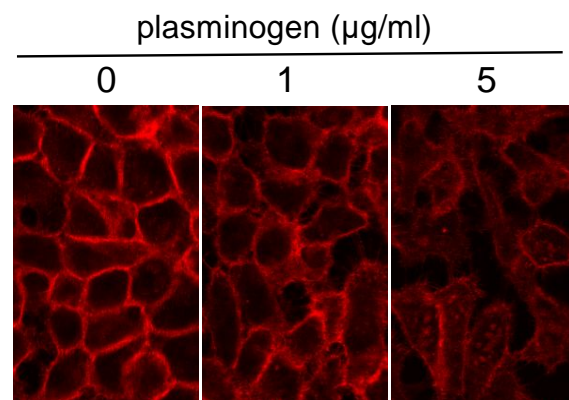


図1  
各濃度のプラスミノゲン存在下で12時間培養した口腔癌細胞の  $\beta$ -カテニンを、間接蛍光抗体法にて染色した。プラスミノゲン添加により細胞膜の  $\beta$ -カテニンの発現が低下し、細胞質内の  $\beta$ -カテニンの発現が増加した。

が核内に移行し、恒常的に核内シグナルを伝達する。その結果、種々の標的遺伝子の発現が誘導され、細胞増殖や浸潤・転移を調節していることが報告されている。

そこで、プラスミノゲン/プラスミン系が口腔扁平上皮癌細胞の  $\beta$ -カテニンの局在変化に及ぼす影響を間接蛍光抗体法にて検索した。プラスミノゲン処理により  $\beta$ -カテニンが細胞膜から細胞質への移行する所見が認められた(図1)。また、各濃度のプラスミノゲンを添加した培地で培養した口腔癌細胞から細胞膜、細胞質、核、細胞骨格の各分画を抽出し、細胞核画分中の  $\beta$ -カテニンの発現を Western Blot 法にて解析した。プラスミノゲン添加により核内の  $\beta$ -カテニンの発現が亢進していた(図2)。さらに、プラスミノゲン/プラスミン系の細胞増殖への影響について検討した結果、プラスミノゲン処理により細胞増殖制御因子のひとつであるサイクリンD1の蛋白発現の亢進を認めた(図3)。

以上のことから、プラスミノゲン/プラスミン系は、E-カドヘリンの細胞外ドメインを切断することで、細胞間接着を抑制し細胞凝集能を低下させ、扁平上皮癌の細胞遊走を亢進しているのみならず、E-カドヘリンの切断・断片化に伴う  $\beta$ -カテニンの細胞膜から細胞質への移行・蓄積させることで細胞増殖を亢進する可能性が示唆された。

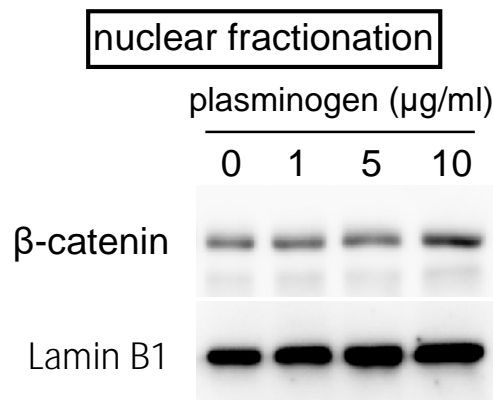


図2  
各濃度のプラスミノゲン存在下で12時間培養した口腔癌細胞の細胞核画分中の $\beta$ -カテニンを、Western Blot法にて検索した。プラスミノゲン添加により核内の $\beta$ -カテニンの発現が亢進した。

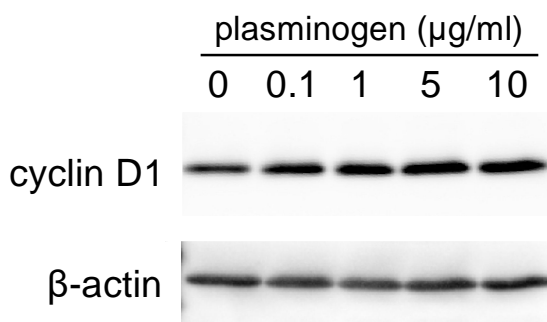


図3  
各濃度のプラスミノゲン存在下で12時間培養した口腔癌細胞のサイクリンD1を、Western Blot法にて検索した。プラスミノゲン添加によりサイクリンD1の発現が亢進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshioka Y, Nakatao H, Hamana T, Hamada A, Kanda T, Koizumia K, Toratani S, Okamoto T	4. 巻 50
2. 論文標題 Suture granulomas developing after the treatment of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 68-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2018.07.021">https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2018.07.021</a>	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 Shimizu Y, Okazaki T, Hamana T, ando Irifune M	4. 巻 76
2. 論文標題 Management of an Internal Carotid Artery Injury Caused by a Displaced Titanium Plate With a Combination of Interventional Vascular Radiology and Surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 1377.e1-1377.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.02.006">https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.02.006</a>	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 Tomoaki Hamana, Takefumi Mishima, Hirotaka Nakatao, Shigeaki Toratani, Tetsuji Okamoto
2. 発表標題 A case of advanced tongue cancer with giant cervical lymph node metastases successfully treated with platinum-based chemotherapy, bio-radiotherapy with cetuximab (Cmab), followed by Cmab and nivolumab monotherapy.
3. 学会等名 第51回広島大学歯学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大林史誠 小泉浩一 浜名智昭 岡本哲治
2. 発表標題 異所性歯を伴う上顎洞に生じた含菌性嚢胞の1例
3. 学会等名 第47回（公社）日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三島健史, 浜名智昭, 中埜洋隆, 松井健作, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 放射線および内科的治療が奏功した巨大な頸部リンパ節転移を伴った進行舌癌の1例
3. 学会等名 第28回日本口腔内科学会・第31回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤成紀, 濱田充子, 櫻井繁, 浜名智昭, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 口腔原発神経内分泌癌由来細胞株の樹立 -初代培養腫瘍細胞の増殖様態から診断されるに至った口腔原発神経内分泌癌-
3. 学会等名 第55回口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田秀政, 谷亮治, 浜名智昭, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 近赤外分光法 (Near-infrared spectroscopy: NIRS) を用いた歯科装具の装着刺激による脳血流動態の解析
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	岡本 哲治  (okamoto tetsuji)  (00169153)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授   (15401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	林堂 安貴  (hayashido yasutaka)  (70243251)	広島大学・病院（歯）・講師       (15401)	