

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791508

研究課題名（和文） 口腔癌に対するゲルダナマイシンを用いての分子標的治療について
の基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research of molecular therapy for oral squamous cell carcinoma with geldanamycin.

研究代表者

山田 慎一（SHINICHI YAMADA）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：83864335

研究成果の概要：

口腔癌において予後を左右する因子とし癌細胞の転移・浸潤が大きな因子の一つとして挙げられる。この転移・浸潤に関して足場蛋白として種々の癌腫において発現し予後と相関すると報告されている α -actinin-4、EMS1 について病理組織学的因子との関連、細胞生物学的特性について検討した。その結果、前者は浸潤型と、後者は腫瘍サイズ、所属リンパ節転移、浸潤型と相関し、また、各について siRNA により浸潤能の低下がみられ、分子標的治療のターゲットに成りうることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	900,000	0	90,0000
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

癌細胞において多数の情報伝達経路を調節しているタンパク質を阻害できれば効果的な癌治療法になる。特にストレスタンパクの1種であるHSP90は多様な機能タンパク質、とりわけシグナル伝達系に関わるプロテインキナーゼや転写調節因子と複合体を形成し、その構造や機能をモデュレートしている。一つの例として、細胞外に分泌されたHSP90 がマトリックスメタロプロテアーゼ2（MMP2）を活性化させ浸潤・転移にも関わっていると

されている。また、細胞の放射線感受性を増大させることも報告されている。

現在、口腔癌に対しては手術療法に加えて放射線化学療法が実施される場合も多く、化学療法においてはCDDP、5-FUなどが用いられているが、副作用や治療抵抗性が認められる場合もあり問題も多い。一方、他の固形癌に対しては細胞内のシグナル伝達を標的とし発癌遺伝子産物の活性を阻害することで抗腫瘍作用を得る分子標的治療薬が開発され臨床に応用されている。その一方でHSP90 特異的阻

害剤であるゲルダナマイシン誘導体17-AAGはHSP90と結合することによりHSP90とその結合タンパク質との結合を阻害し発癌遺伝子産物の成熟の阻害や分解を促進することで効果を発現し、現在、第 相臨床試験が行われている。しかしながら、ゲルダナマイシンが腫瘍細胞HSP90に特異的に作用するメカニズムは明らかでない。加えて、口腔癌領域においては応用されておらず、一般的に化学療法に使用されることが多いシスプラチン(CDDP)はHSP90のC末端領域に結合し機能を阻害するが、他方、ゲルダナマイシンはHSP90のN末領域にあるATP結合領域に結合することから、現在行われているCDDPを中心とする化学療法において、ゲルダナマイシン誘導体17-AAGを加えることで、より効果的にHSP90の作用を阻害し腫瘍細胞の増殖・浸潤・転移を抑制し、また薬剤の用量を少なくすることで副作用の出現を抑えることが可能となる分子標的治療薬の創薬が期待できる。

2. 研究の目的

口腔癌において予後を左右する因子とし癌細胞の転移・浸潤が大きな因子の一つとして挙げられる。この転移・浸潤に関して足場蛋白として種々の癌腫において発現し予後と相関すると報告されている -actinin-4、EMS1 について病理組織学的因子との関連、細胞生物学的特性について検討した。分子標的治療のターゲットと成りうるかについて検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)口腔扁平上皮癌の生検材料収集および組織切片の作成

口腔扁平上皮癌の生検病理標本を約 70 症例収集し、パラフィン包埋標本から薄切切片を作成する。そして -actinin-4、EMS1 の抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、発現を検討し臨床病理学的因子との関連を検討した。

(2)口腔扁平上皮癌細胞株での遺伝子発現の検討

口腔扁平上皮癌細胞株培養細胞について、それぞれ -actinin-4、EMS1 の TaqMan PCR でのmRNA を定量し、細胞生物学的特性について検討した。

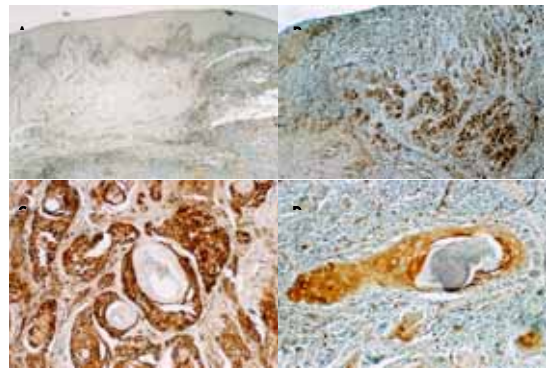
(3)siRNA による遺伝子蛋白発現の抑制

口腔扁平上皮癌細胞株培養細胞株で、-actinin-4、EMS1 の各遺伝子の発現が見られるものについては、それぞれのアン

チセンスオリゴで蛋白発現を抑制し、Matrigel invasion assay を用いて浸潤能への影響を検討するとともに接着分子についての動態について検討を行った。

4. 研究成果

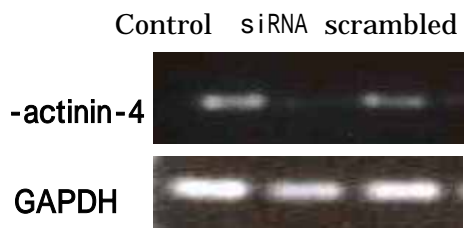
(1) -actinin-4 発現の免疫組織化学的染色による検討と臨床病理学的因子との関連。

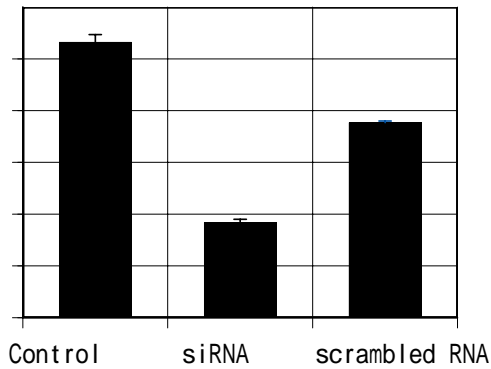


正常口腔粘膜に発現はみられず、扁平上皮癌症例全例に発現がみられたが、び慢性に浸潤する先端部位に強く発現する傾向がみられた。 -actinin-4 の過剰発現は扁平上皮癌症例の 70.4%にみられた。臨床病理学的因子とは浸潤型との間に有意な相関性がみられた。

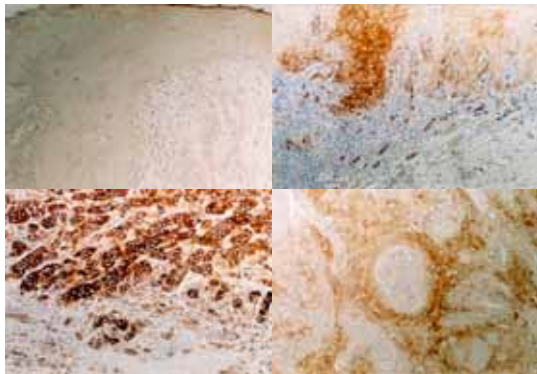
(2)口腔扁平上皮癌細胞株培養細胞について、-actinin-4 の細胞生物学的特性として、増殖能を MTT 法、浸潤能を Matrigel Invasion assay にて検討したところ、浸潤能との間に有意な相関性がみられた。

(3)口腔扁平上皮癌細胞株 OSC20 にて siRNA にて -actinin-4 発現を抑制したところ、浸潤能の有意な低下がみられた。これにより -actinin-4 は口腔扁平上皮癌において浸潤能に関連し分子標的治療のターゲットに成りうる可能性が示唆された。





(4) EMS1 発現の免疫組織化学的染色による検討と臨床病理学的因子との関連。

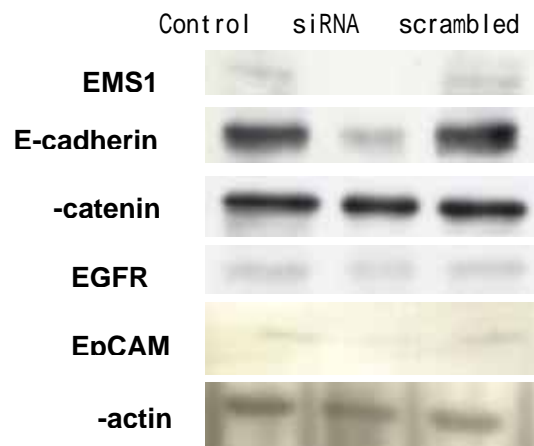
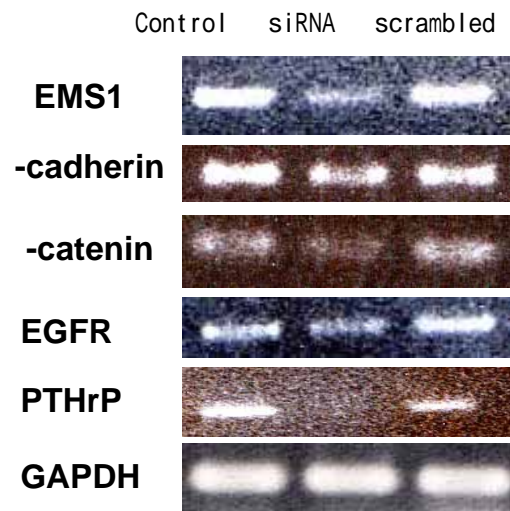


正常口腔粘膜に発現はみられず、扁平上皮癌症例全例に発現がみられたが、び漫性に浸潤する先端部位に強く発現する傾向がみられた。EMS1 の過剰発現は扁平上皮癌症例の 45.7% にみられた。臨床病理学的因子とは腫瘍サイズ、所属リンパ節転移、および浸潤型との間に有意な相関性がみられた。

(5) 口腔扁平上皮癌細胞株培養細胞について、EMS1 の細胞生物学的特性として、増殖能を MTT 法、浸潤能を Matrigel Invasion assay にて検討したところ、いずれとの間にも有意な相関性がみられなかった。

(6) 口腔扁平上皮癌細胞株 SAS にて siRNA にて EMS1 発現を抑制したところ、浸潤能の有意な低下がみられた。

また、E-cadherin、-catenin、EGFR、PTHrP の mRNA の発現低下がみられた。蛋白レベルでは E-cadherin、EGFR、PTHrP、EpCAM の発現の低下がみられ、接着分子や骨転移への関連性も示唆された。



以上の結果より、EMS1 は口腔扁平上皮癌における分子標的治療のターゲットになりうる可能性が示唆された。

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 3件)

Nemoto, T. K., Kobayakawa, T., Ono, T., Yamada, S., Mizuno, A., Baba, T., Ohara-Nemoto, Y.: Aminoacid substitutions observed in human Hsp90 isoforms that impede the dimeric interaction. 2nd World Conference of Stress, including 3rd Cell Stress Society International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2007, Budapest, Hungry.

小早川 健, 山田慎一, 根本優子, 水野野明夫, 根本孝幸: ヒト hsp90 SNP Glu488 > His 変異による Hsp90 ダイマー形成能の低下, 第30回日本分子生物学会総会, 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年, 横浜市。

山田慎一, 柳本惣市, 川崎五郎, 吉富泉, 水野明夫: 口腔扁平上皮癌における actinin4 の発現の意義, 第62回日本口腔科学会学術集会, 2008, 福岡市。

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

6. 研究組織
(1)研究代表者
山田 慎一 (SHINICHI YAMADA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 83864335

(2)研究分担者

(3)連携研究者