

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791524
 研究課題名 (和文) 超効率型 CXCR4 siRNA を用いた口腔癌のリンパ節転移抑制療法の開発
 研究課題名 (英文) Development of inhibition therapy for lymph node metastasis in oral cancer, using super-effective siRNA against CXCR4.
 研究代表者
 内田 大亮 (UCHIDA DAISUKE)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：20335798

研究成果の概要：本研究は、small interfering RNA (siRNA) を用いたCXCR4の発現抑制により口腔癌のリンパ節転移抑制が可能であるか検討するために以下の実験を行った。すなわち、CXCR4を高発現しており、ヌードマウス同所性移植モデルにてリンパ節転移能を有する口腔扁平上皮癌細胞株B88に対して、CXCR4 に対するshRNA発現ベクター導入し、3種類のCXCR4ノックダウン細胞 (siCXCR4細胞) を樹立した。その結果、siCXCR4細胞においては、SDF-1誘導性に生じる細胞内カルシウム流入量が著明に減少しており、細胞遊走能も有意に低下していた。この中で、CXCR4の発現レベルが最も低下していたsiCXCR4-17細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植したところ、リンパ節転移のみならず、原発巣のサイズ、マウスの体重減少が有意に抑制された。

以上より、CXCR4 に対する siRNA がリンパ節転移を抑制する可能性が示唆されたため、siRNA オリゴによる transfection の至適条件を luciferase 活性を指標に検討した。この条件下に、合成した3種類のCXCR4 siRNA オリゴをCXCR4高発現株であるB88細胞にtransfectionしたが、CXCR4の発現は50%程度しか減弱させることができなかった。この条件下に、リガンドSDF-1を用いたmigration assayを行ったが、CXCR4特異的阻害剤であるAMD3100を用いた実験系と比較して、CXCR4 siRNAによる細胞遊走の抑制効果は50%程度しか得られなかった。そこで、AMD3100をB88細胞の同所性移植モデルに使用したところ、B88細胞のリンパ節転移は著明に抑制された。以上より、siRNAを用いた実験系では導入効率の改善と配列特異性が極めて重要であり、核酸薬品としてのCXCR4 siRNAの使用は困難であること、CXCR4特異的阻害剤AMD3100はCXCR4を発現している口腔癌のリンパ節転移抑制に有効である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,300,000 | 0 | 2,300,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 300,000 | 3,600,000 |

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：癌、核酸、トランスレシヨナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の予後不良因子は、所属リンパ節転移である。そのため、われわれの研究室では、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移機構について研究を行ってきた。その中で、癌細胞をヌードマウス咬筋内に移植する同所性移植モデルシステムを構築し、従来の背部皮下移植系ではリンパ節転移しないが、同所性移植にてリンパ節転移する細胞株を分離・樹立した (Int J Cancer 70:120, 1997)。われわれは、リンパ節自身が産生するケモカインと癌細胞自身の発現するケモカインレセプターの結合が癌細胞をリンパ節へ誘導する要因になりうると予想し、各種ケモカインレセプターの発現と口腔癌細胞におけるリンパ節転移の相関性について検討した。その結果、リンパ節転移株にのみ CXCR4 mRNA, 蛋白の発現を認めること (図 1)、口腔癌の所属リンパ節であるヒト顎下リンパ組織は CXCR4 のリガンド SDF-1 を発現しており、SDF-1 処理すると CXCR4 発現株だけが細胞遊走能を亢進させることを報告した (Exp Cell Res 290:289, 2003)。さらに、われわれはリンパ節転移しない CXCR4 低発現株に CXCR4 を過剰発現させると、リンパ節転移をおこすこと (Lab Invest 84:1538, 2004)、口腔扁平上皮癌患者の原発巣における CXCR4 の発現が、リンパ節転移と相関していること (Int J Oncol 25:65, 2004)、口腔扁平上皮癌の遠隔転移には SDF-1/CXCR4 autocrine loop が重要であること (Mol Cancer Res 5:685, 2007) を見いだしている。これらの結果は、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移過程において、CXCR4 を発現している口腔扁平上皮癌細胞がリンパ節間質の産生するリガンド SDF-1 に引き寄せられながら、転移していることを強く示唆するものである (図 2)。従って、CXCR4 の発現抑制または機能抑制法を探索することは口腔癌のリンパ節転移抑制療法の開発につながると考えられる。以上の背景に基づき、われわれは CXCR4 およびそのシグナル伝達分子阻害剤を探索してきた。しかしながら SDF-1/CXCR4 シグナル伝達分子である extra cellular regulated kinase (ERK) 1/2, Akt/protein kinase B (PKB) のリン酸化阻害剤の投与は、マウスに重篤な体重減少を及ぼすこと (Lab Invest 84: 1538-1546, 2004)、CXCR4 の発現抑制作用を有する新規抗癌剤ベスナリノンの投与は効果的である反面、臨床

上無顆粒球症発症のリスクがあること (第 65 回日本癌学会にて発表) の理由から、臨床応用可能な阻害剤は同定できなかった。

2. 研究の目的

一方、標的遺伝子のノックダウン法として、近年 small interfering RNA (siRNA) を用いた方法が哺乳動物細胞でも効率よくおこることが確認され、核酸医薬品として siRNA を用いた治療戦略が開発されつつあるが、その問題にされているのは、siRNA の標的遺伝子に対する特異性と抑制効率である。すなわち、標的遺伝子を効率よくノックダウンできたとしても、随伴する非特異的なインターフェロン応答や protein kinase R (PKR) の活性化などのオフターゲット効果が生じることがあげられる。また、市販の siRNA は、特異性の高い siRNA と保証されていても、3 種類の配列を混合したものであったり、その使用推奨濃度が高濃度であったりすることが多い。近年、27 塩基の平滑末端 siRNA が、従来効果的とされていた 21 塩基 (19 塩基+2 塩基のオーバーハング) よりも低濃度でかつ長期間、標的遺伝子のノックダウン効果を有し、オフターゲット効果も有しない「超効率型」であることが報告された (Nat Biotechnol 23: 222-226, 2005)。現在のところ、CXCR4 に関しては、この 27 塩基 siRNA の至適配列は確立されていない。従って、将来的に CXCR4 を核酸医薬品として使用するためには、27 塩基配列を利用した CXCR4 の「超効率型」siRNA 配列を同定することが重要であると考えられる。以上の背景に基づき、本研究では 27 塩基型の超効率型 CXCR4 siRNA 配列の同定とその核酸医薬品としての可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CXCR4 shRNA 導入によるノックダウン細胞の樹立

CXCR4 shRNA 発現ベクター (ミシガン大学、Russell Taichman 教授より供与) とコントロールベクターを CXCR4 高発現株である B88 細胞にトランスフェクション後、geneticin にて非導入細胞を排除し、出現したコロニー 24 個を無作為に拾い上げ増殖させた。CXCR4 ノックダウン細胞の選別を、mRNA レベルでは定量性 RT-PCR 法により、蛋白レベルではフローサイ

トメーターにより行った。

(2) 樹立細胞におけるCXCR4の機能的ノックダウンの確認

得られた細胞におけるCXCR4の機能的ノックダウンの確認を、100 ng/mlのリガンドSDF-1添加後のカルシウムフルックス法とtranswellを用いたmigration assay法により検討した。なお、migration assay時の27塩基型CXCR4 siRNA (配列A) は最終濃度1 nMで、CXCR4特異的阻害剤であるAMD3100は最終濃度1 μg/mlで使用した。

(3) CXCR4ノックダウンによる転移抑制効果の検討

2x10⁶個のノックダウン細胞(clone17)細胞を咬筋内に同所性移植し、28日後に屠殺し、リンパ節転移の有無を病理組織学的に解析した。なお、AMD3100(Sigma社)は、B88細胞を移植した翌日より2.5 mg/kgの濃度で連日皮下投与した。摘出した頸部リンパ節は、個数および重量により転移を評価した。

(4) 超効率型CXCR4 siRNAの導入条件の検討

すでに我々が分離しているluciferase遺伝子を恒常的に発現する B88細胞(B88-luc)にB-Bridge社製luciferase GL3 siRNAを導入し、luciferase活性が80%以上減弱する最適条件を定量的に評価した。3種類の27塩基型CXCR4 siRNAはB-Bridge社より購入した。

4. 研究成果

(1) CXCR4 shRNA導入によるノックダウン細胞の樹立

CXCR4を高発現しており、ヌードマウス同所性移植モデルにてリンパ節転移能を有する口腔扁平上皮癌細胞株B88に対して、CXCR4に対するshRNA発現ベクター導入し、3種類のCXCR4ノックダウン細胞(siCXCR4-16, 17, 21細胞)を樹立した。これらの細胞におけるCXCR4 mRNA (図1a)、タンパク (図1b) の発現は、コントロールベクターを導入したmock細胞と比較して、約50-60%程度低下していた。

図1a

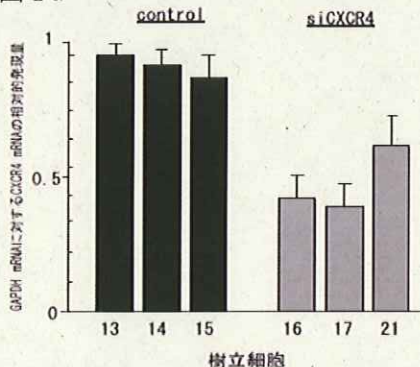
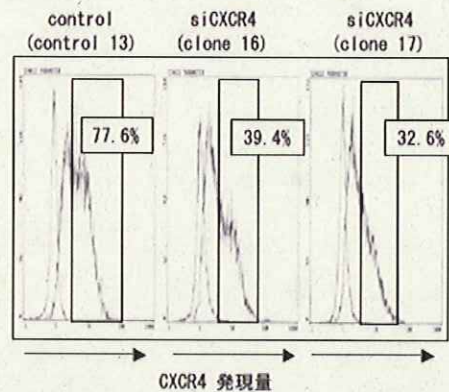


図1b



siCXCR4細胞のin vitroにおける細胞増殖能は、コントロール細胞、親株B88細胞と比較して変化を認めなかった (データは示していない)。しかしながら、siCXCR4細胞においては、SDF-1誘導性に生じる細胞内カルシウム流入量が著明に減少しており (図2a)、細胞遊走能も有意に低下していた (図2b)。

図2a

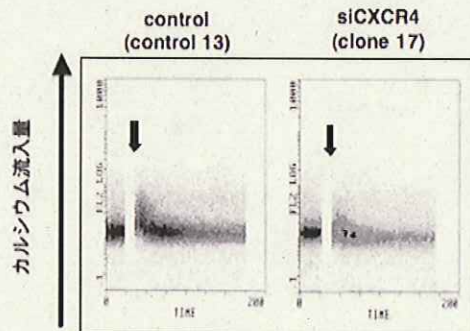
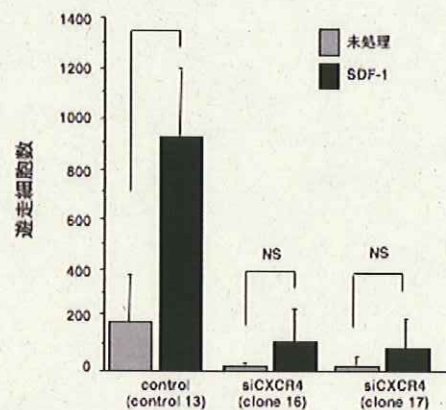


図2b



(2) CXCR4のノックダウンによるリンパ節転移抑制

CXCR4の発現レベルが最も低下していたsiCXCR4-17細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植したところ、リンパ節転移のみならず、原発巣のサイズ、マウスの体重減少が有意

に抑制された (表 1)。

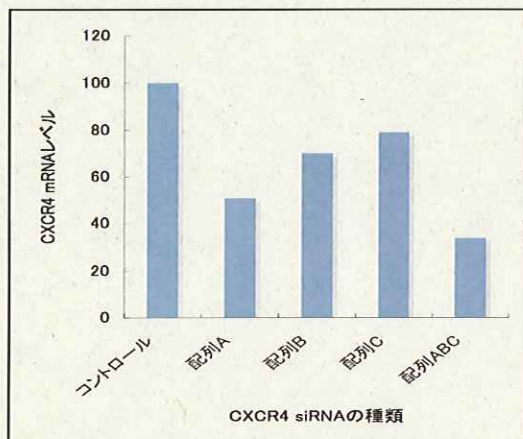
表 1 腹腔内同所性移植モデルにおける CXCR4 siRNA のリンパ節転移抑制効果

| マウス番号 | 転移リンパ節数 | 転移リンパ節重量 (mg) | 腫瘍体積 (mm ³) | 体重 (g) |
|---------|--------------|---------------|-------------------------|--------------|
| 1 | 1 | 13.8 | 406.3 | 20 |
| 2 | 0 | 0 | 405.0 | 20 |
| 3 | 0 | 0 | 392.9 | 19 |
| 4 | 1 | 9.50 | 208.3 | 22 |
| mean±SD | 0.500±0.577* | 5.825±6.951* | 353.1±96.75* | 20.25±1.258* |
| 1 | 1 | 12.4 | 515.0 | 19 |
| 2 | 2 | 18.8 | 814.1 | 18 |
| 3 | 2 | 23.1 | 565.4 | 15 |
| 4 | 3 | 18.0 | 550.0 | 18 |
| 5 | 2 | 19.1 | 526.5 | 15 |
| mean±SD | 2.000±0.707 | 18.28±3.835 | 600.2±123.5 | 17.00±1.871 |

*P<0.05 (one-way ANOVA)

(3) CXCR4 siRNA の至適導入条件の決定

以上より、CXCR4 に対する siRNA がリンパ節転移を抑制する可能性が示唆されたため、siRNA オリゴによる transfection の至適条件を検討した。すなわち、すでに我々が分離している luciferase 遺伝子を恒常的に発現する B88 細胞 (B88-luc) に B-Bridge 社製 luciferase GL3 siRNA を導入し、luciferase 活性が 80%以上減弱する最適条件を定量的に評価した。その結果、2 μl の Lipofectamine 2000 を 48 μl の Opti-MEM で希釈し、60 pmol の GL3 siRNA と混合したものを transfection することで、luciferase 活性が最も減弱することが明らかとなった (データは示していない)。この条件下に、合成した 3 種類の CXCR4 siRNA オリゴ (A, B, C) を CXCR4 高発現株である口腔癌細胞 B88 に transfection した。その結果、配列 A を用いた場合に CXCR4 mRNA の発現はリアルタイム RT-PCR にて 50%程度減弱したが、配列 B, C においてはそれぞれ 30%, 20%の発現抑制しか得られなかった (図 3 a)。

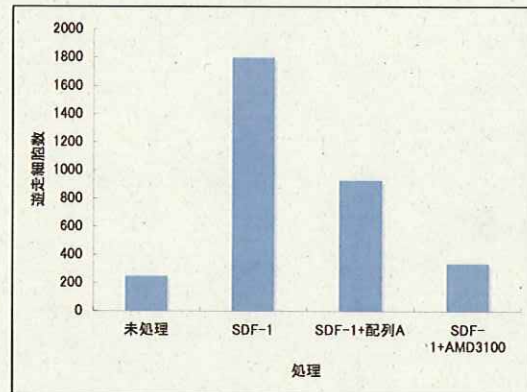


配列 A を用い CXCR4 の発現が 50%程度抑制された条件下で、リガンド SDF-1 を用いた migration assay を行った。しかしながら、CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 を用いた実験系と比較して、CXCR4 siRNA による細胞

遊走の抑制効果は 50%程度しか得られなかった (図 3 b)。

(4) AMD3100 による B88 細胞のリンパ節転移

図 3 b



抑制

そこで、AMD3100 を B88 細胞の同所性移植モデルに使用したところ、B88 細胞のリンパ節転移は著明に抑制され、腫瘍随伴性の体重減少も抑制された (表 2)。

本研究結果より、siRNA を用いた実験系で

表 2 腹腔内同所性移植モデルにおける AMD3100 のリンパ節転移抑制効果

| マウス番号 | リンパ節数 | リンパ節重量 (mg) | 腫瘍体積 (mm ³) | 体重 (g) |
|---------|--------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 1 | 3 | 10.1 | 845.0 | 14 |
| 2 | 2 | 8.60 | 1098 | 19 |
| 3 | 2 | 8.60 | 680.5 | 15 |
| 4 | 3 | 7.30 | 283.5 | 21 |
| mean±SD | 2.500±0.577* | 8.650±1.145* | 638.1±360.3 | 17.25±3.304 |
| 1 | 5 | 33.5 | 1125 | 15 |
| 2 | 4 | 23.5 | 620.8 | 20 |
| 3 | 3 | 13.9 | 171.5 | 14 |
| 4 | 4 | 36.0 | 864.0 | 17 |
| mean±SD | 4.000±0.816 | 26.73±10.11 | 578.8±504.9 | 16.50±2.645 |

*P<0.05 (one-way ANOVA)

は導入効率の改善と配列特異性が極めて重要であり、核酸薬品としての CXCR4 siRNA の使用は困難であること、CXCR4 特異的阻害剤 AMD3100 は CXCR4 を発現している口腔癌のリンパ節転移抑制に有効であ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 1 件)

① 内田大亮 : CXCR4 を標的とした口腔扁平上皮癌のリンパ節転移抑制、口腔組織培養学会誌、17 巻、35-40 頁、2008 年、査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① 内田大亮、尾上富太郎、栗林伸行、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二、CXCR4 選択的阻害剤 AMD3100 による口腔癌の転移抑制、第 27 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2009 年

1月30日、栃木県総合文化センター

② 内田大亮、尾上富太郎、栗林伸行、大江剛、玉谷哲也、宮本洋二、CXCR4の発現抑制によるヒト口腔癌細胞のリンパ節転移と癌悪液質の抑制、第67回日本癌学会総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場

③ Daisuke Uchida, Yoshifumi Tomizuka, Nasima-Mila Begum, Tomitaro Onoue, Nobuyuki Kuribayashi, Miyabi Tada, Youji Miyamoto, Vesnarinone downregulates CXCR4 expression via upregulation of kruppel-like factor 2 in oral squamous cell carcinoma cells, AACR Annual Meeting, 2008年4月16日, San Diego Convention Center

④ 内田大亮、尾上富太郎、富塚佳史、多田雅、栗林伸行、宮本洋二、SDF-1/CXCR4 システムを標的とした口腔扁平上皮癌のリンパ節転移抑制の可能性、第44回日本口腔組織培養学会、2007年12月1日、愛媛大学グリーンホール

⑤ 内田大亮、富塚佳史、尾上富太郎、東雅之、ケモカインレセプターCXCR4のノックダウンによる口腔癌細胞のリンパ節転移抑制、第52回(社)日本口腔外科学会総会、2007年9月29日、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 大亮 (DAISUKE UCHIDA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：20335798