

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19791530
研究課題名（和文） 癌転移抑制因子 CD82 による口腔癌の細胞間接着制御機構の解析と臨床応用
研究課題名（英文） The analysis and clinical applications of cellular adhesion control mechanisms by a metastasis suppressor CD82 in an oral cancer
研究代表者
 高橋 美穂（TAKAHASHI MIHO）
 松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00444795

研究成果の概要(和文)：癌転移抑制因子 CD82/ KAI-1 はカベオリン-1の存在下で細胞膜表面タンパクとの相互作用により生物学的活性を調節する。DPP4 はフィブロネクチンと結合する 2 型細胞膜貫通型タンパク質で、DPP 遺伝子ファミリーのメンバーとして知られており、接着分子として働き、細胞骨格構成成分を調節する。そこで本研究では CD82 発現に伴う DPP 遺伝子ファミリー酵素の発現を検討した。ヒト肺非小細胞癌由来 CD82 低発現細胞株 h1299 に CD82 遺伝子を導入し、CD82 強制発現細胞株を樹立した。CD82 導入株では DPP 遺伝子のほか浸潤転移関連蛋白の発現に変動がみられた。DPP9 は CD82 強制発現によって減少し、細胞骨格分画に局在する傾向がみられた。また、DPP9 の減少によって細胞接着関連蛋白の発現が上昇した。DPP9 は同じ酵素活性を有する DPP4 遺伝子ファミリーの中でも機能が異なること、さらに DPP9 は細胞骨格蛋白および細胞接着関連蛋白の発現と関連して癌浸潤・転移を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD82 is a member of the tetraspanin superfamily, regulates biological activity by associating with cell surface proteins in the presence of Caveolin-1. Dipeptidyl peptidase (DPP) 4 is a type II transmembrane protein that binds fibronectin and Caveolin-1, suggesting that members of the DPP gene family act as adhesion molecule and modulate a component of the cytoskeleton. We focused on the effect of CD82 on the DPP gene family enzyme expression. CD82 gene transfected h1299 (h1299/CD82) was generated by transfection of h1299 cells with pZeoSV / CD82. Indirect immunofluorescence staining, immunoblot analysis, Real-time polymerase chain reaction have been performed. h1299/CD82 cells decreased DPP9 expression. Caveolin-1 was expressed in cytoskeletal fraction of h1299/CD82 cells. Moreover, the amino terminal region of DPP9 was slightly and the catalytic domain of DPP9 was remarkably expressed in the cytoskeletal fraction. The present study suggests that CD82 induced DPP9-relocalization in the cytoskeletal fraction and co-expression with Caveolin-1 was associated with a mechanism for altering cell adhesion and migration.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

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、遺伝子、細胞・組織、シグナル伝達、CD82

1. 研究開始当初の背景

(1) テトラスパニンとは4回膜貫通型糖蛋白質の総称で、接着因子であるインテグリンなどと複合体を形成し、“Tetraspanin Web”という分子間ネットワークを形成している。近年、テトラスパニンファミリーである癌転移抑制因子 CD82/KAI-1 が高発現している癌細胞では、細胞膜に存在するカベオラの主要な構成タンパク質である Caveolin-1 の存在下で EGFR と複合体を形成し EGFR シグナル伝達を抑制することや CD82 の発現が癌患者の良好な予後と相関することが明らかにされている。最近、申請者は CD82 低発現細胞株 h1299 に CD82 を遺伝子導入した CD82 高発現細胞株を用いて、CD82 が c-Met と複合体を形成して糸状突起や葉状突起の形成を阻害して癌細胞遊走を抑制することを明らかにした。これらの結果は、CD82 が癌細胞の浸潤転移を抑制している可能性を示唆しているが、CD82 発現による癌細胞浸潤転移酵素の変動については未だ明らかにされていない。

(2) DPP4 (CD26) は細胞膜に存在する膜結合蛋白質の CD26 であり、生理活性物質のペプチドの N 末端にある X-Ala および X-Pro を加水分解する膜結合蛋白質である。本酵素は細胞外基質やケモカインなどの生理活性物質に作用することから、癌細胞の浸潤・転移や遊走に関与していることが示唆されている。最近、DPP4 活性を有し、DPP4 と約 60% の相同性を持つ新たなペプチダーゼ (DPP8, DPP9) がクローニングされ DPP4 遺伝子ファミリーとして分類され、その生理的役割が研究されつつある。現在までの研究では、DPP4 は Caveolin-1 と嵌合して細胞間結合に関与すること、さらに SDF-1 α /CXCR4 axis による癌細胞遊走を抑制することが知られている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では CD82 低発現細胞株に転移抑制遺伝子 (CD82 遺伝子) を導入した h1299/CD82 transfectant を用いて CD82 の発現を伴う Caveolin-1 と浸潤転移関連酵素の変動を検討した。

3. 研究の方法

(1) CD82 低発現細胞株であるヒト肺非小細胞癌由来 h1299 に CD82 を導入し、CD82 強制発現細胞株 h1299/CD82 transfectant を樹立して以下の実験に用いた。

(2) CD82 の発現に伴う遺伝子の挙動をマイクロアレイでスクリーニングし、DPP4 遺伝子ファミ

リや浸潤転移関連蛋白質の挙動を Real-time PCR と Western blot で検討した。

(3) CD82 発現に伴う Caveolin-1 と DPP4 の局在をみるために、細胞質分画と細胞膜分画を抽出し、Western blot で比較した。

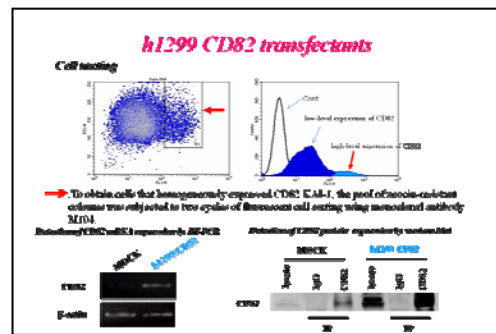
(4) CD82 発現に伴う DPP9 および DPP8 の局在をみるために、細胞質分画と細胞膜分画を抽出し、認識部位の異なった3種類の抗体を用いて Western blot で検討した。

(5) 細胞質分画と細胞膜分画を抽出した後に酵素活性を測定した。

(6) CD82 発現に伴う DPP9 と Caveolin-1 の局在を細胞免疫蛍光染色で検討した。

4. 研究成果

(1) CD82 強制発現細胞株 h1299/CD82 transfectant の樹立



(2) h1299/CD82 transfectant を用いて CD82 発現に伴う遺伝子の挙動をマイクロアレイでスクリーニングした。CD82 導入株では、テトラスパニン 7, 6 の他、タンパク質分解酵素であるジペプチジルペプチダーゼ (以下 DPP) 4 と結合する isomerase や caveolin-1 が誘導された。

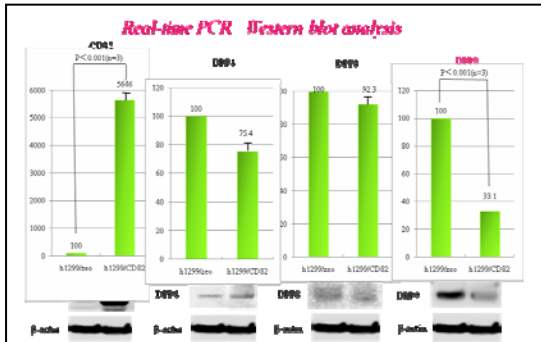
一方、MMP1, MMP-10 のほか、DPP4 ファミリーである DPP9 の発現が抑制された。

Comprehensive analysis of mRNA by microarray in MOCK and h1299/CD82 cell lines

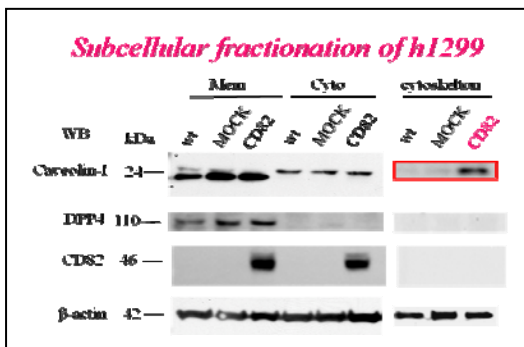
Public ID	Gene Title
Induced gene (p<0.001)	
NM_002231	CD82 molecule
NM_004615	tetraspanin 7
AF053453	tetraspanin 6
AU340788	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin 1)
NM_001783	caveolin 1, caveolin protein
Inhibited gene (p<0.001)	
AC085594	dipeptidyl peptidase 9 (DPP9)
NM_002425	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
AU158388	Actinin, alpha 1 (ACTN4)
NM_000388	transforming growth factor, beta 1 (TGF β 1)
NM_002421	matrix metalloproteinase 1 (MMP1)
NM_004464	fibroblast growth factor 5 (FGF5)
D50683	transforming growth factor, beta receptor II

次に、h1299/CD82 transfectant を用いて CD82 発現に伴う DPP4 遺伝子ファミリーや浸潤転移関連蛋白の挙動を Real-time PCR と WB で検討した。

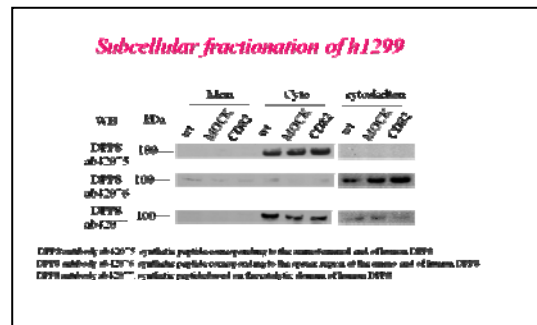
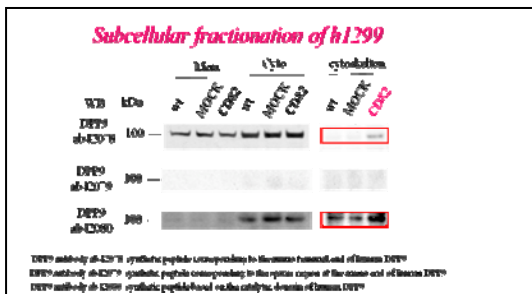
CD82 導入により、DPP4 と DPP8 には明らかな変化はみられなかったが、DPP9 では mRNA と蛋白の発現に減少が見られた。



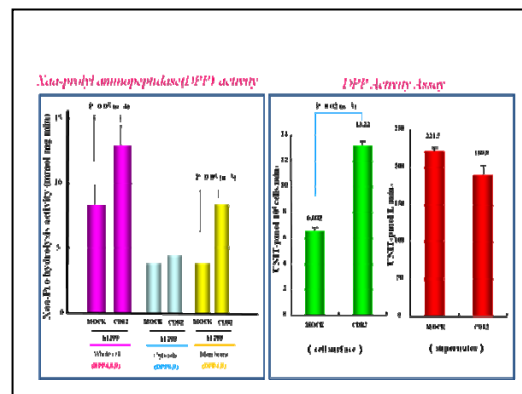
(3)h1299/CD82 transfectant を用いて CD82 と複合体を形成する Caveolin-1 と DPP4 の局在を Western blot で比較した。CD82 導入株の細胞骨格分画に Caveolin-1 の強発現が認められた。



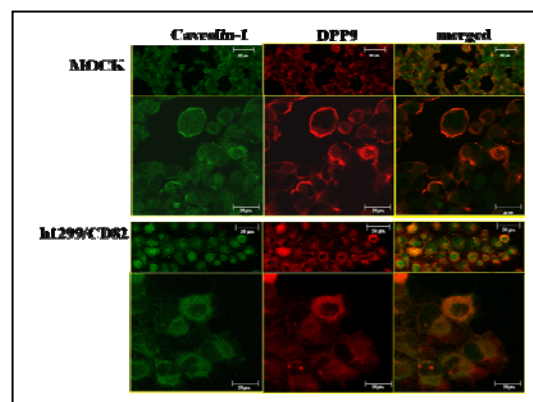
(4)DPP9,DPP8 の局在を認識部位の異なった3種類の抗体を用いて WB で検討した。CD82 導入株において、N 末端領域ではわずかに、触媒領域では著しい発現を細胞骨格分画に認めた。一方、DPP8 の発現はすべての分画で有意な差は認められなかった。



(5)細胞質分画と細胞膜分画を抽出した後に酵素活性を測定した。細胞抽出液の酵素活性は、CD82 導入株では有意に高値を示した。細胞質分画では有意な差はみられなかったが、膜分画では CD82 導入株で活性が有意に上昇していた。膜分画には DPP4 が存在することから、この活性は DPP4 活性である考えられる。

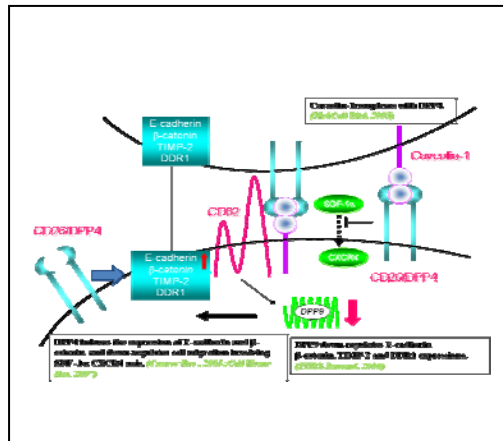


(6)CD82 発現に伴う DPP9 と Caveolin-1 の局在を免疫蛍光染色で検討した。MOCK では DPP9 は主に糸状突起および葉状突起に局在を認め、Caveolin-1 は細胞膜に局在を認めた。一方、CD82 導入株では細胞膜と細胞質に局在を認めた。これは WB の結果と同様の結果で、このことは CD82 発現により DPP9 と Caveolin-1 は細胞質へ移行することが示唆された。



以上、本研究と現在までの報告をまとめると、CD82 は DPP4 発現を介して

- ① DPP9 の発現を抑制し、E-cadherin、 β -catenin などの発現を促進し細胞間接着を亢進させること、
 - ②さらに、caveolin-1 と DPP9 タンパクを細胞骨格分画に誘導することにより癌細胞遊走を抑制すること、
- によって癌の浸潤・転移を制御していることが示唆された。



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3件)

- ① Sugiura T, Inoue, Y, Matsuki, R, Ishii, K, Takahashi, M, Abe, M, Shirasuna, K.
VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker.
Int J Oncol, 34,673-80,2009
査読あり
- ② Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M, Shirasuna K
A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of Cancer cells.
Cancer Lett, 266, 163-70, 2008
査読あり
- ③ Takahashi M, Sugiura T, Abe M, Ishii K, Shirasuna K
Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration
Int J Cancer, 1;121(9), 1919-29, 2007
査読あり

[学会発表](計12件)

- ① 丹羽 崇、上松 隆司、高橋 美穂、堂東亮輔、丸川 和也、李 憲起、杉浦 剛、古澤清文

培養癌細胞におけるDPP4 遺伝子ファミリーの発現

2009年10月9日 第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 札幌コンベンションセンター

- ② 高橋 美穂、上松 隆司、丹羽 崇、杉浦 剛、山岡 稔、古澤 清文

Alteration in the expression of dipeptidyl peptidases in tetraspanin-expressed cancer cells.

2009年10月3日 第68回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜

- ③ 千北 さとみ、杉浦 剛、安部 正和、高橋 美穂、石井 広太郎、下田 みゆき、小林 洋輔、白砂 兼光

シアリルルイス A_x を介した癌細胞の血管内皮細胞への接着に対する CD82/KAI1 の影響

2009年4月16日 第63回日本口腔外科学会学術集会 アクトシティ浜松

- ④ 丹羽 崇、上松 隆司、高橋 美穂、杉浦 剛、白砂 兼光、古澤 清文

癌細胞における DPP4 遺伝子ファミリーの発現

2009年4月16日 第63回日本口腔外科学会学術集会 アクトシティ浜松

- ⑤ T. NIWA, T. UEMATSU, M. TAKAHASHI, T. SUGIURA, K. SHIRASUNA, M. YAMAOKA and K. FURUSAWA

Cell migration and enzyme expression in Tetraspanin-expressing cancer cells

第 87 回国際歯科学研究会議 (IADR) 2009 年 4 月 2 日 マイアミ

- ⑥ 高橋 美穂、上松 隆司、丹羽 崇、杉浦 剛、白砂 兼光、古澤 清文

Phenotypical change in the tetraspanin CD82/KAI-1-expressed cancer cells.

癌細胞における Tetraspanin CD82/KAI-1 の発現と形質変化

2008年10月30日 第67回日本癌学会学術総会 名古屋

- ⑦ 丹羽 崇、上松 隆司、高橋 美穂、杉浦 剛、白砂 兼光、古澤 清文

癌細胞における Tetraspanin CD82/KAI-1 の発現と形質変化

2008年10月20日 第53回口腔外科学会総会学術集会 徳島

- ⑧ M. TAKAHASHI, T. UEMATSU, T. SUGIURA, K. SHIRASUNA, M. YAMAOKA¹, K. FURUSAWA¹.

Tetraspanin KAI-1 / CD82 affects cancer cell migration and enzyme expression

2008年7月3日 第86回国際歯科学研究会議 (IADR)

カナダ・トロント Metro Toronto Convention Centre

- ⑨安部 正和、杉浦 剛、高橋美穂、石井 広太郎、下田 みゆき、白砂 兼光

癌細胞の細胞間接着における CD82/KAI1 の機能解析

2008年4月17日 第62回日本口腔科学会学術集会 福岡

⑩高橋 美穂、上松 隆司、松浦 隆、堂東 亮輔、寺本 祐二、小野 祐輔、大石 めぐみ、竹林 秀人、都築 甲、横森 宏司、古澤 清文

当科における口腔癌治療と今後の課題

2007年11月17日 第8回長野県口腔外科談話会 諏訪湖畔病院内小ホール

⑪高橋 美穂、上松 隆司、杉浦 剛、白砂 兼光、古澤 清文

テトラスパニン CD82/KAI1 による c-Met シグナル伝達の制御が癌細胞遊走に影響を与える

2007年10月5日 第66回日本癌学会学術総会 横浜

⑫高橋 美穂、上松 隆司、杉浦 剛、内橋 隆行、白砂 兼光、古澤 清文

癌細胞における tetraspanin KAI1/CD82 の発現と形質変化

2007年9月29日 第52回日本口腔外科学会総会 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 美穂(TAKAHASHI MIHO)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号:00444795

(2)研究分担者

(3)連携研究者