

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24147

研究課題名（和文）タイトジャンクション構成蛋白を標的とした核酸医薬による口腔癌転移阻止療法の開発

研究課題名（英文）Development of Nucleic Acid Drugs Targeting Tight Junction Constituent Proteins for Metastasis Prevention Therapy of Oral Cancer

研究代表者

信本 忠義（Nobumoto, Tadayoshi）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：80848565

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者は、タイトジャンクションの主要な構成蛋白であるclaudin-1が、癌細胞の運動能と蛋白分解活性を亢進させることをみいだした。これらの結果から、claudin-1発現の抑制は、癌細胞の運動能や蛋白分解活性を低下させ、癌の浸潤・転移を抑制すると推測される。申請者は、claudin-1に対して数種類のsiRNAを設計・作成し、数種類の癌細胞に遺伝子導入し、いくつかのclaudin-1抑制効果を持つ癌細胞の作成を行った。作成したclaudin-1抑制効果を持つ癌細胞の一部では、運動能の変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的遺伝子に対する高い特異性と確実な抑制効果のため、siRNAによるRNA干渉を誘導する方法が広く用いられている。癌関連遺伝子発現を抑制し、腫瘍増殖を阻止する試みが数多く研究されてきたが、これまでに生体での有効な誘導法は確立されていない。効果的で、安全な生体でのRNAi誘導法を確立し、腫瘍のclaudin-1発現を抑制することができれば、癌の浸潤・転移を阻止する新しい口腔癌治療へと発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that claudin-1, a major constituent of tight junctions, increases the motility and proteolytic activity of cancer cells. These results suggest that the suppression of claudin-1 expression decreases the motility and proteolytic activity of cancer cells and inhibits their invasion and metastasis.

We designed and generated several kinds of siRNAs of claudin-1, and introduced them into several kinds of cancer cells to generate cancer cells with several claudin-1 suppressive effects. Some of the generated cancer cells with claudin-1 inhibitory effect showed changes in motility.

研究分野：口腔癌

キーワード：タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

生体への short interfering RNA (siRNA) 導入に関して、数多くの研究がなされているが、臨床応用可能な siRNA のデリバリーシステムは、いまだ確立されていない。本研究で確立をすることを目的としているウイルスベクターを用いない in vivo での siRNA デリバリーシステムは、病原性等の危険性がなく、臨床応用を行う上で極めて有益な方法である。in vivo での claudin-1 発現抑制は、浸潤・転移を阻止する口腔癌の薬物療法開発への発展が期待される。

癌は、癌遺伝子や癌抑制遺伝子等の癌関連遺伝子に変異が起こることにより生じると考えられている。そのため、RNA 干渉 (RNAi) を誘導し、変異が生じた遺伝子の発現を特異的に抑制し、腫瘍の増殖や浸潤・転移の阻止を試みる研究が多くなされている。

RNAi を誘導する基本的な方法として、2つの手法がある。ひとつは直接、細胞に siRNA を導入する方法である。もうひとつは、細胞内で siRNA にプロセシングされる short hairpin RNA (shRNA) を発現するベクターを導入する方法である。shRNA 発現ベクターは、その作用が持続性であるという長所を持つが、in vivo での shRNA の発現効率の低さから、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターが使用されることが多く、突然変異誘発や病原性等の危険性がある。これに対し、siRNA は shRNA 発現ベクターのように核膜を通過し核にアクセスする必要がなく、細胞膜を通過するだけで効果を発現するため、細胞への導入は容易である。また、ウイルスベクターにみられるような病原性等の危険性もない。しかし、組織内や血清中のヌクレアーゼ活性のため、in vivo では速やかに分解受け、作用発現は一過性であるという欠点を持つ。そのため、siRNA の組織内での安定性を向上させ、作用発現を持続させることができれば、siRNA は分子標的治療の有用なツール (核酸医薬) になりうると思われる。

これまでに代表者は、claudin-1 が、口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、遊走能や蛋白分解活性を調節していることに加え、口腔扁平上皮癌患者組織での claudin-1 発現と生存率が相関することをみいだしてきた。本研究で計画している in vivo での siRNA 導入による claudin-1 発現の抑制することにより、癌の増殖抑制とともに浸潤・転移を阻止し、新しい口腔癌治療へ発展させる試みは現在まで行われていない。

in vivo における siRNA 導入方法としては、静脈内に大量の siRNA を投与するハイドロダイナミックス法がよく知られており、特に肝臓において効率よく遺伝子発現抑制を誘導することが報告されている。しかし、このような全身への siRNA 投与は、標的臓器以外の器官においても遺伝子発現を抑制し、生体に対し悪影響を及ぼす可能性があり、臨床応用する場合、予想外の副作用が生じる可能性が考えられる。siRNA を癌治療の核酸医薬として臨床応用するためには、病変部において高い遺伝子抑制効果を示すが、標的部位以外の器官には影響を及ぼさない siRNA を局所投与するためのデリバリーシステムの確立が必要である。口腔癌は他の固形腫瘍とは異なり、直接観察し触れることができることから、内視鏡や特殊なカテーテルを使用しなくても確実に、かつ安全に目的遺伝子を導入することができる腫瘍と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞間接着分子の claudin-1 を標的とした siRNA の in vivo での安全性が高く効率的なデリバリーシステムを確立し、claudin-1 発現を特異的に抑制することで、口腔癌の増殖や浸潤・転移を阻止する新しい口腔癌治療法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 遠隔臓器での転移巣の形成が悪性腫瘍の治療上の最大の障害になっている。口腔扁平上皮癌は、早期から頸部リンパ節に転移することが多く、外科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、転移巣形成により予後不良となる症例が数多く見受けられる。従って、口腔癌の浸潤・転移を阻止することにより、口腔癌治療成績の著しい向上が期待できる。

上皮細胞間接着装置は形態的な違いにより、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモゾームとギャップジャンクションに分類され、多細胞生物の形態や組織構造の維持に重要な役割を担っている。タイトジャンクションは、上皮細胞の最もアピカル側に存在する細胞間接着装置で、細胞間のバリア機能や細胞極性の維持に重要な役割を担っており、その発現は癌を含む種々の疾患で特徴的な変化を示す。

これまでに代表者は、タイトジャンクションの主要な構成蛋白である claudin-1 が、口腔扁平上皮癌細胞の運動能と蛋白分解活性を亢進させることをみいだした。

これらの結果から、claudin-1 発現の抑制は、口腔癌細胞の運動能や蛋白分解活性を低下させ、癌の浸潤・転移を抑制すると推測される。

(2) 特定の遺伝子の発現を抑制するために、アンチセンス核酸やリボザイムなど、様々な手法が開発されてきた。標的遺伝子に対する高い特異性と確実な抑制効果のため、siRNA により RNAi を誘導する方法が広く用いられている。そのため siRNA を用いた RNAi 誘導によって、癌関連遺伝子発現を抑制し、腫瘍増殖を阻止する試みが数多く研究されてきたが、これまでに有効な in vivo での siRNA による RNAi 誘導法は確立されていない。効果的で、安全な生体での RNAi 誘

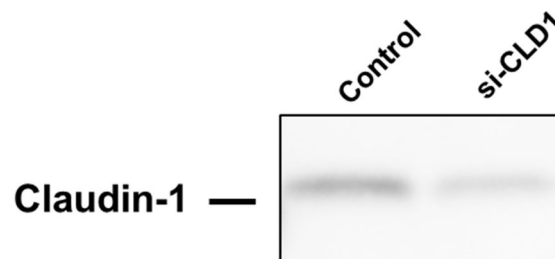
導法を確立し、腫瘍の claudin-1 発現を抑制することができれば、癌の浸潤・転移を阻止する新しい口腔癌治療法へと発展することが期待される。

(3)本研究では、claudin-1 に対して設計・作成した数種類の siRNA を口腔扁平上皮癌細胞に導入し、より強く claudin-1 発現を抑制する siRNA を選択した。選択した siRNA を扁平上皮癌細胞に導入し、扁平上皮癌細胞の増殖能や運動能の変化を検索した。

4. 研究成果

(1)口腔扁平上皮癌株 SCCKN に claudin-1 に対して作成した siRNA を導入した。Western Blot 法にて導入株(si-CLD1)を解析した結果、Control と比較して Claudin-1 蛋白発現が低下していた。

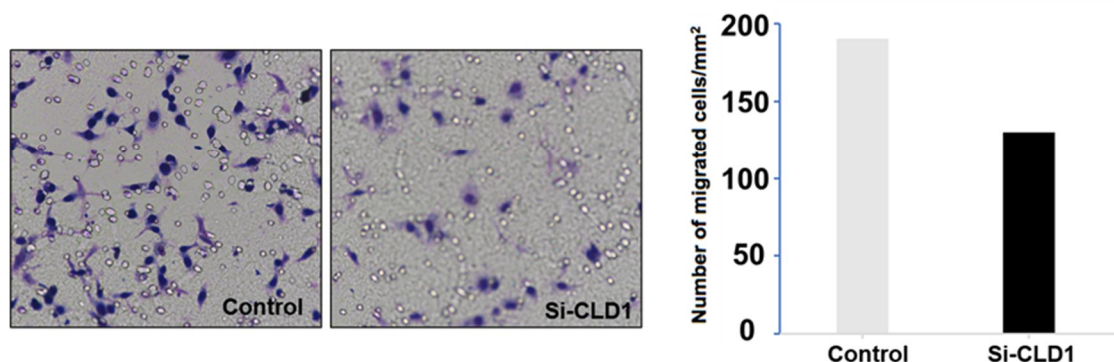
Expression of Claudin-1 in SCCKN Cells and si-RNA Transfectants



(2) 5×10^3 個の各細胞を 16mm 径培養皿に播種し 5 日間培養した。培養 5 日後の si-CLD1 の増殖細胞数は、Control と比べ明らかな変化は認めなかった。

(3)口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に与える影響を、Boyden Chamber の変法にて検討した。si-CLD1 は Control に比べ、細胞遊走能の低下を認めた。

Motility of si-RNA Transfectants on Type I Collagen



今後は、扁平上皮癌細胞をヌードマウスに移植することにより形成された腫瘍組織内に、カチオン性リポソームまたはアテロコラーゲンをデリバリー担体として siRNA を直接導入し、いずれのデリバリー担体が、より効果的に in vivo での claudin-1 発現を抑制するかを解析する予定である。

安全で効率的な siRNA の局所デリバリーシステムを確立することによって、claudin-1 に対する siRNA が、核酸医薬として、口腔癌の浸潤・転移を阻止する薬物療法の重要なツールとなることが期待される。

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 0件）

1. 著者名 信本忠義, 吉岡幸男, 檜垣美雷, 坂本真一, 小川郁子, 虎谷茂昭, 岡本哲治	4. 巻 51
2. 論文標題 頬粘膜に生じた小唾液腺唾石症の1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 広島大学歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 112 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 信本 忠義、神田 拓、林 靖也、谷 亮治、小川 郁子、岡本 哲治	4. 巻 68
2. 論文標題 両側舌下部無痛性腫脹が先行発症した好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 294 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11277/stomatology.68.294	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 信本忠義, 津島康司, 林堂安貴, 岡本哲治
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖におけるClaudin1の機能解析
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 信本忠義, 林堂安貴, 岡本哲治
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖におけるClaudin1 の機能解析
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会・総会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------