

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590069

研究課題名(和文) 新規メラノーマ転移遺伝子プロテオリピドプロテインの解析

研究課題名(英文) Analysis of melanoma metastasis gene, proteolipid protein

研究代表者

園田 よし子(SONODA YOSHIKO)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：30050743

研究成果の概要(和文)：プロテオリピドプロテイン 2(PLP2)を過剰発現させたメラノーマ細胞は *in vitro* において接着能、運動能、浸潤能を上昇させ、さらに *in vivo* において転移能を上昇させた。逆に PLP2 を siRNA 法で低下させたメラノーマ細胞は *in vitro* において接着能、運動能、浸潤能を低下させ、*in vivo* において転移能を低下させた。PLP2 は PI3K と会合し Akt の活性化を促進すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established melanoma cells overexpressing proteolipid protein 2 (PLP2). We found that PLP2 enhanced adhesion, motility, and invasion *in vitro*, and tumor metastasis *in vivo*. PLP2 siRNA treatment remarkably inhibited adhesion, motility, and invasion *in vitro*, and prevented tumor metastasis *in vivo*. Furthermore, we showed that PLP2 binds PI3K, thus activating Akt.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：メラノーマ、転移、接着斑キナーゼ、プロテオリピドプロテイン

1. 研究開始当初の背景

我々はFAKおよびその変異体3種(Y397F、Y925FおよびK454R)をメラノーマ細胞に導入した細胞株を樹立し、マウス肺転移モデルを用いて転移能を調べた。その結果、変異体3種を導入したメラノーマ細胞は親細胞や空ベクター細胞より転移能が大きく低下することを見いだした。特に、Y925F細胞は空ベクター細胞の約20%に低下していることを見いだした。

次に空ベクター細胞とY925F細胞で発現している遺伝子の違いをDNAチップで調べたところ、PLP2がY925F細胞で発現低下していることを見いだした。以上の結果よりFAKの下流分子であるPLP2は、がん治療のターゲットとなりうると考えて実験を開始した。

2. 研究の目的

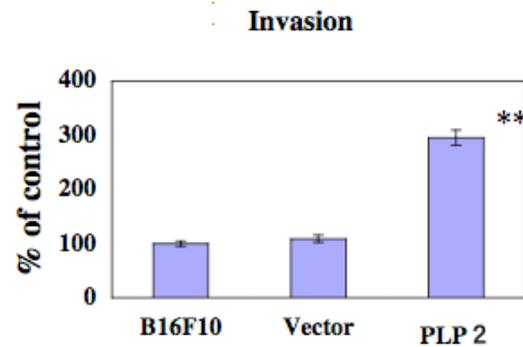
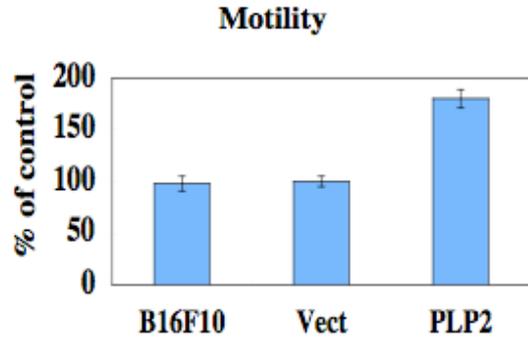
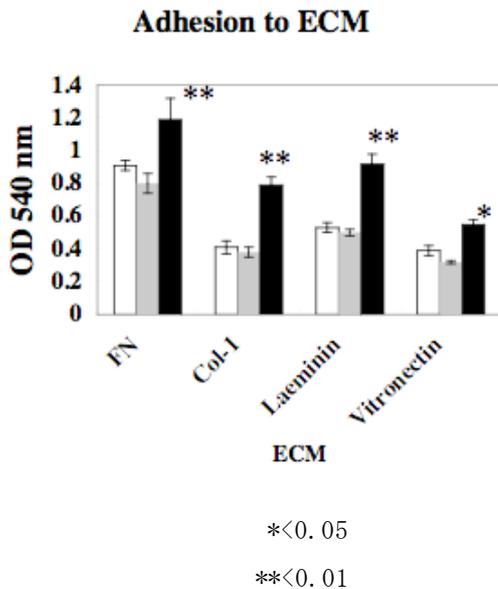
FAKの下流分子PLP2が真に転移遺伝子であることを証明する。

3. 研究の方法

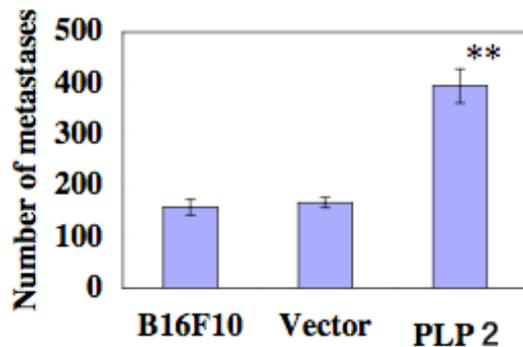
実験的転移モデルに使用されるB16F10および自然転移モデルに使用されるB16BL-6メラノーマ細胞を用い、PLP2 過剰発現、PLP2 発現低下細胞を作製しこれらのメラノーマ細胞の性質を調べるとともに、動物実験における転移に及ぼす影響について調べる。FAKについても同様に調べる。

4. 研究成果

(1) B16F10における PLP2過剰発現細胞は *in vitro*において接着能、運動能、浸潤能が上昇した。



(2) 尾静脈からB16F10を注入する実験的肺転移モデル系において、PLP2は転移を促進することがわかった。

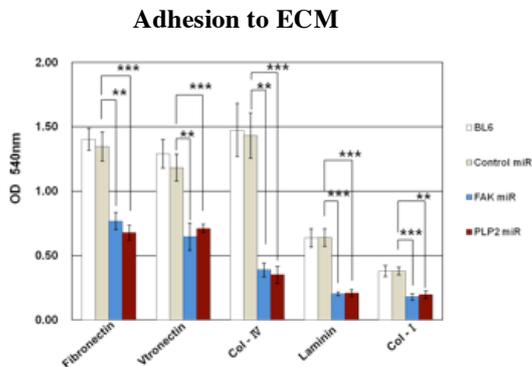


**P < 0.01

以上の結果より、PLP2は転移促進因子である可能性が高いと考えられる。

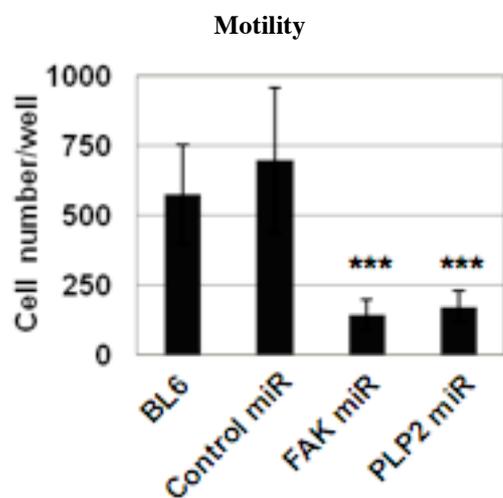
(3) PLP2の転移促進因子としての機能を確認するために、PLP2 および FAK の発現を

siRNA法により低下させたBL6細胞を作製した。
 (これらの細胞をcontrol miR, PLP2miR,
 FAKmiRと記す) PLP2miR, FAKmiRは
 controlmiRに比し接着能、運動能、浸潤能が
 低下した。

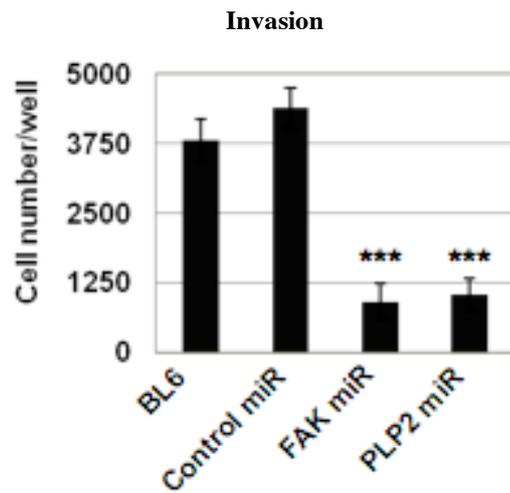


**P<0.01

***P<0.001

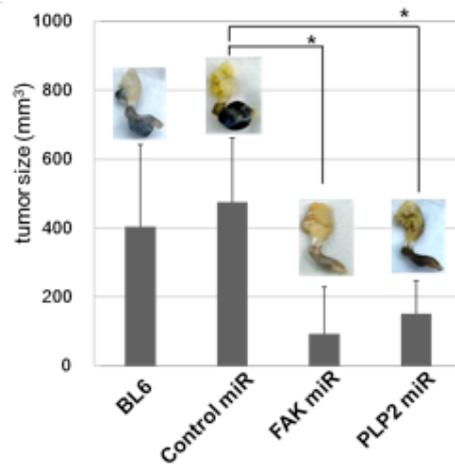


***P<0.001



***P<0.001

(4) さらにこれらの細胞をマウス足腫に注入し、自然転移に及ぼす影響を調べた。その結果、コントロールに比べ、PLP2発現が抑制されたメラノーマ細胞は、膝下リンパ節への転移が有意に減少した。その減少はFAKとほぼ同程度であった。



	BL6 (n=6)	Control miR (n=9)	FAK miR (n=9)	PLP2 miR (n=11)
popliteal lymph	50%	67%	11%*	9%*
lung	33%	33%	0%	0%

*P<0.05

有意差はないが、肺への転移も減少する傾向が見られた。

以上の結果より、
PLP2はFAK同様、転移促進因子である可能性
が高いと考えられる。

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 5 件)

① Funakoshi-Tago M., Nakamura K, Tsuruya R,
Hatanaka M, Mashino T, Sonoda Y., Kasahara T.
The fixed structure of Licochalcone A by alpha,
beta-unsaturated ketone is necessary for
anti-inflammatory activity through the inhibition
of NF-kappaB activation. Int Immunopharmacol.
査読有、2010 Vol.10:562-71.

② Sonoda Y., Warita M, Suzuki T, Ozawa H,
Fukuda Y, Funakoshi-Tago M., Kasahara T.
Proteolipid protein 2 is associated with
melanoma metastasis. Oncol Rep. 査読有 2010
Vol. 23:371-6.

③ Funakoshi-Tago M., Tanabe S, Tago K, Itoh H,
Mashino T, Sonoda Y., Kasahara T.
Licochalcone A potently inhibits tumor necrosis
factor alpha-induced nuclear factor-kappaB
activation through the direct inhibition of IkappaB
kinase complex activation.
Mol Pharmacol. 査読有、2009 Vol.76:745-53.

④ Kaneda T, Sonoda Y., Ando K, Suzuki T,
Sasaki Y, Oshio T, Tago M., Kasahara T.
Mutation of Y925F in focal adhesion kinase
(FAK) suppresses melanoma cell proliferation
and metastasis.
Cancer Lett. 査読有、2008, Vol.270:354-61.

⑤ Sonoda Y., Hada N, Kaneda T, Suzuki T,
Ohshio T, Takeda T, Kasahara T. A synthetic

glycosphingolipid-induced antiproliferative effect
in melanoma cells is associated with suppression
of FAK, Akt, and Erk activation.

Biol Pharm Bull. 査読有、2008 Vol.31:1279-83.

[学会発表] (計 4 件)

① 小澤広樹、FAK 及び PLP2 ノックダウンによ
るメラノーマ転移抑制について、第 33 回分
子生物学会、第 83 回生化学会大会合同大会、
2010. 12. 7

② 小澤広樹、FAK 及び PLP2 ノックダウンによ
るメラノーマ転移抑制について、日本薬学会
第 130 年会、2010. 3. 28

③ 割田雅子、PLP2 のメラノーマ転移における
機能解析、日本薬学会第 129 年会、2009. 3. 25

④ 笠原忠、接着斑キナーゼ (FAK) のメラノー
マ転移における役割解析、第 52 回日本薬学
会関東支部会、2008. 10. 4, 東京理科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園田 よし子 (SONODA YOSHIKO)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：30050743

(2) 研究分担者

笠原 忠 (KASAHARA TADASHI)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：60049096

多胡 めぐみ (TAGO MEGUMI)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：30445192

(3) 連携研究者

該当なし