

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20592360  
 研究課題名（和文） WNTシグナル系伝達因子群を標的とした口腔癌の分子診断・治療法の開発研究  
 研究課題名（英文） Development research into molecular diagnosis and treatment method of carcinoma of the oral cavity targeting WNT signal system transfer factor group  
 研究代表者  
 小泉 浩一（KOIZUMI KOICHI）  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：30335682

## 研究成果の概要（和文）：

Wnt シグナル系伝達因子の一つである癌遺伝子 $\beta$ -カテニンは、培養口腔癌細胞において細胞質や核への異常蓄積を示すものとそうでないものいずれも存在した。また、 $\beta$ -カテニンが細胞質や核へ異常蓄積している細胞においては、 $\beta$ -カテニンの GSK3 によってリン酸化される部位で遺伝子変異の有るものとないものが存在した。

現在は $\beta$ -カテニンの異常集積とその病態や予後との相関性について検討中である。

## 研究成果の概要（英文）：

Oncogene  $\beta$ -katenin that was one of the Wnt signal system transfer factors had both the one to show the irregular accumulation to the cytoplasm and the nucleus in the culture oral carcinoma cell and the one not so. Moreover, the one in the part phosphorylated by GSK3 of  $\beta$ -katenin with the gene mutation and the one that not was existed in the cell that had abnormally accumulated  $\beta$ -katenin in the cytoplasm and the nucleus. Abnormal accumulation of  $\beta$ -katenin and the correlativity of the condition and the prognosis are being examined now.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：WNT、 $\beta$ -カテニン、口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

我々は FGF および FGF 受容体の研究を長年行っている。また、これまでに我々は新規の FGF 結合蛋白質 HBp17(FGF-BP)を見出し、その機能を明らかにし、また口腔癌との関連も

明らかにしてきた。これらの我々の研究成果は世界的にも確認され、高い評価を得ている。またさらに FGF や KGF などのシグナル伝達経路と口腔癌の関連を明らかにし、種々の症候群や癌の遺伝子診断に応用している。また、近年は Wnt シグナル経路における Duplin の

機能を解析することにより、 $\beta$ -カテニンの抑制機構の一端を解明し、報告してきた（第23, 24回分子生物学会年会、日本組織培養学会第75回大会・学会奨励賞、第55回日本口腔科学会総会、第38回日本口腔組織培養学会）。この研究成果においても世界的に評価されている。Duplinは癌遺伝子と考えられている $\beta$ -カテニンを制御していることから、今後の癌治療の遺伝子治療開発において注目される因子のひとつである。このように我々は口腔癌とシグナル伝達経路の関連の研究およびWntシグナル伝達経路の研究において成果を上げている。口腔癌の診断、治療法のめざましい進歩に関わらず、依然として口腔癌が致死性の疾患として恐れられており、また顔面の病変であることからQOLに大きな支障を与えると考えられる。 $\beta$ -カテニンは癌遺伝子の一つと考えられ、種々の癌において発生に関与していることが示唆されており、大腸癌においてはその癌化モデルにおいて重要な役割を果たすことが解明されているにも関わらず、口腔癌とWntシグナル伝達経路の関連の報告は見られず、研究はほとんど進んでいない。我々は口腔癌およびWntシグナル伝達経路の研究を即座にできる準備があり、口腔癌の早期克服のために本研究を緊急に推進する必要があると考える。

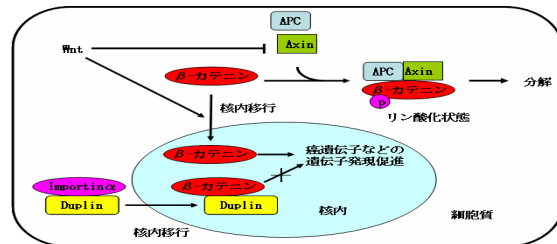
## 2. 研究の目的

最近10年間の研究の進展によって、癌は遺伝子の疾患であり、その進展に関与する遺伝子は癌遺伝子と癌抑制遺伝子の二群に大別されることが明らかになった。現在では癌関連遺伝子の異常を検索することにより、癌の悪性度や進展度、治療への抵抗性を判定することが可能になりつつある。これまでに知られている癌関連遺伝子の中にはかなりの割合で細胞内シグナル伝達分子をコードするものが含まれている。これはシグナル伝達分子の多くが細胞増殖や細胞周期を制御しているために、異常を生じると細胞増殖が無秩序になり、癌が発生するからであると考えられている。従って、細胞内シグナル伝達分子の機能を明らかにして、ヒト癌における異常を解析することが本研究分野の重要な研究課題となってくる。

我々は細胞内シグナル伝達機構の中でも、Wntシグナル伝達経路を解析している。Wntシグナル伝達経路は初期発生における体軸形成や器官形成、出生後の細胞増殖、分化を制御し、その構成分子の異常により癌が生じることが示唆されている。 $\beta$ -カテニン、APC、AxinなどのWntシグナル伝達経路構成因子の遺伝子異常が大腸癌をはじめとする種々の癌で見いだされているが、これは $\beta$ -カテニ

ンが細胞質や核に異常に蓄積し、その結果、異常な遺伝子発現が誘導されるために癌化が引き起こされると考えられている。

我々は、 $\beta$ -カテニンと結合し、その機能を抑制する蛋白質 Duplin の結合蛋白として Importin  $\alpha$  を酵母 two-hybrid 法により同定し、Duplin の核内輸送には Importin  $\alpha$  との結合が必須であることを生化学的および細胞生物学的に解明した。そして、核内での Duplin と  $\beta$ -カテニンの結合が Duplin の  $\beta$ -カテニンの抑制作用に非常に重要であることを明らかにした。



現在、大腸癌をはじめとする種々の癌で $\beta$ -カテニンが癌遺伝子と機能することが示唆されているが、口腔癌においては $\beta$ -カテニンとの関連性の報告はほとんどない。そこで、本研究では、 $\beta$ -カテニンの蓄積と口腔癌の発生および悪性度との関連性、また、その $\beta$ -カテニンの蓄積へのWntシグナル伝達系因子の関連を明らかにすることを目的として、第一に、口腔癌における $\beta$ -カテニンの細胞質や核への異常蓄積を検討し、遺伝子変異による蛋白変異体の機能を生化学的および細胞生物学的に解析する。第二に、口腔癌細胞にWntシグナル伝達抑制因子 (Duplin, Axin) を遺伝子導入し、口腔癌細胞の増殖能を抑制することが可能かをin vivoおよびin vitroで評価する。第三に、手術時に採取した口腔癌組織においても $\beta$ -カテニンの異常蓄積を検討し、その病態 (TMN分類、山本・小浜分類に基づく浸潤状態、転移能) や予後との相関性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 培養口腔癌細胞中の $\beta$ -カテニンと結合し制御するWntシグナル伝達因子 (Axin, Duplin) の遺伝子変異の検討

$\beta$ -カテニンが細胞質や核への異常蓄積した培養口腔癌細胞の $\beta$ -カテニンそのものの変異についてはすでに検討済みであるが、変異のなかった細胞については、その結合蛋白の変異に依存していると考えられるため、細胞質内で結合し、 $\beta$ -カテニンの分解を促進するAxinおよび核内で結合しその機能を抑制するDuplinの遺伝子変異を検討する。

- ①培養扁平上皮癌細胞の RNA を抽出する。
- ②抽出した微量の RNA 中の Wnt シグナル伝達因子領域を PCR サーマルサイクラー (Complete Mastercycler ep package) を用いて増幅する。
- ③SSCP 法にて遺伝子の変異・多型の有無を検索する。
- ④direct sequence 法にて遺伝子変異の位置を決定する

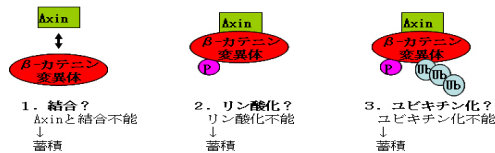
(2) 口腔癌組織における Wnt シグナル伝達因子の遺伝子変異の有無およびβ-カテニンの異常蓄積とその病態 (TMN 分類、浸潤状態、転移能) や予後との関連性の検討

- ①手術時に採取した口腔癌組織を固定、切片作成後、抗β-カテニン抗体を用いて免疫染色を行い、β-カテニンが細胞質や核へ異常蓄積しているか否か検討する。
- ②β-カテニンの異常蓄積を①蓄積なし②細胞質に蓄積③核に蓄積に分類し、採取した組織の TMN 分類、山本・小浜分類に基づく浸潤状態、転移能および予後との関連性を検討する。
- ③口腔癌組織より RNA を抽出し、β-カテニン、Axin および Duplin の遺伝子変異の有無を検討する。
- ④β-カテニン、Axin および Duplin の遺伝子変異を①変異なし②変異ありに分類し、採取した組織の TMN 分類、浸潤状態、転移能および予後との関連性を検討する。

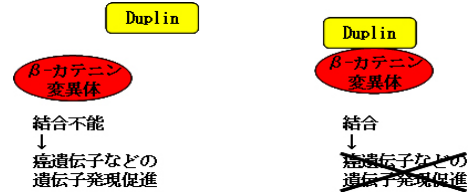
(3) 遺伝子変異により生じたβ-カテニン変異体の機能の検討

β-カテニン分解には Axin との結合後、リン酸化状態でユビキチン化されることが必須であり、いずれを欠いてもβ-カテニンは分解されず蓄積する。そこで、

- ①β-カテニン変異体の Axin との結合能を免疫沈降法にて検討する。
- ②β-カテニン変異体のリン酸化状態を野生型β-カテニンと比較する。
- ③リン酸化β-カテニン変異体がユビキチン化されているか否か検討する。



また、分解から逸脱し核内に移行したβ-カテニンは種々の結合分子によりその機能を制御されている。Duplin は核内でβ-カテニンと結合し、その機能を抑制する。そこで、④β-カテニン変異体のβ-カテニン抑制因子 Duplin と結合するか否かを免疫沈降法にて検討する。



(4) 口腔癌細胞におけるβ-カテニン細胞質内抑制因子 Axin およびβ-カテニン核内抑制因子 Duplin の影響の検討

培養口腔扁平上皮癌細胞にβ-カテニン抑制因子の遺伝子導入し、以下の3点を検討する。

- ①β-カテニン抑制因子蛋白の発現を Western Blotting 法で確認する。
  - ②β-カテニン抑制因子の遺伝子導入した培養口腔癌細胞の増殖能を経時的に計測し、野生型と比較検討する。
  - ③さらに、ヌードマウスの背部皮下にその増殖能および腫瘍性を検討する。
- 以上の動物実験は広島大学大学院生命科学センター、動物実験施設の動物実験規定に従って行う。

#### 4. 研究成果

(1) 培養口腔癌細胞中のβ-カテニンと結合し制御する Wnt シグナル伝達因子 (Axin, Duplin) の遺伝子変異の検討

Axin, Duplin の遺伝子変異はあるものないものいずれも存在

(2) 口腔癌組織における Wnt シグナル伝達因子の遺伝子変異の有無およびβ-カテニンの異常蓄積とその病態 (TMN 分類、浸潤状態、転移能) や予後との関連性の検討。

①培養口腔癌細胞のβ-カテニンの細胞質や核への異常蓄積の検討

→β-カテニンが細胞質や核へ異常蓄積しているもの、蓄積していないものいずれも存在。

②培養口腔癌細胞のβ-カテニンの遺伝子変異の検討

→β-カテニンが細胞質や核へ異常蓄積している培養口腔癌細胞においては、β-カテニンの GSK3 によってリン酸化される部位で遺伝子変異の有るものとなないものが存在。

③β-カテニンの異常蓄積とその病態 (TMN 分

類、浸潤状態、転移能) や予後との相関性については現在検討中であるが、 $\beta$ -カテニンの異常蓄積のある口腔癌は予後不良である。

#### 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 6 件)

1. Mimura S, Kimura N, Okamoto T, Furue MK, et al. Growth Factor-Defined Culture Medium for Human Mesenchymal Stem Cells, Int. Journal of Developmental Biology, in press 2010.
2. Sato GH, Sato JD, Okamoto T, McKeehan WL, Barnes DW. Tissue Culture, the unlimited potential. In Vitro Cell Dev Biol Anim. (査読有) 2010 Jul; 46(7) pp590-594.
3. Furue MK, Na J, Okamoto T, Sato JD. et al., Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium. In Vitro Cell Dev Biol Anim. (査読有) 2010 Jul; 46(7):pp573-576.
4. Matsumoto, S., Okamoto, T., Kikuchi, A.,  $\beta$ -catenin-independent Wnt signaling regulates cell migration, polarity and morphogenesis. Tissue Culture Research (査読有) 2009, Communications 28: pp117-128
5. Hayashi, Y., Kusuda, M., Myoishi, Y., Okamoto, T. Serum-free growth factor-defined cell culture of mouse ES cell. Tissue Culture Research Communications 27: (査読有) 2008, pp107-115
6. Hayashido Y, Hamana T, Ishida Y, Shintani T, Koizumi K, Okamoto T. Induction of alpha2-antiplasmin inhibits E-cadherin processing mediated by the plasminogen activator/plasmin system, leading to suppression of progression of oral squamous cell carcinoma via upregulation of cell-cell adhesion. *Oncol Rep.* (査読有) 2007, Feb, 17(2) pp417-423

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小泉 浩一 (KOIZUMI KOICHI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号 : 30335682

##### (2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号 : 00169153

神田 拓 (KANDA TAKU)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号 : 00423369

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :