

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792011

研究課題名（和文） ベータ4インテグリン及び関連タンパク質を標的とした新規口腔癌治療法の開発

研究課題名（英文） A development of new treatment for oral cancer with beta4 integrin and associated proteins.

研究代表者

荒本 孝良 (ARAMOTO TAKAYOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00380220

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌細胞株において、細胞接着因子である integrin family のうち beta4 integrin の発現を阻害することにより細胞形態、運動性、浸潤能が変化することが今回の実験により判明した。このことから integrin family である beta4 integrin が癌細胞において浸潤に大きく関与している可能性が示唆された。今後 beta4 integrin の発現を阻害することにより、生体内において癌細胞の浸潤を抑制し得る可能性があり、今後インテグリン阻害剤を用いた新規治療法の開発が望まれる。

研究成果の概要（英文）：

We concluded that the inhibition of beta4 integrin which is the member of integrin family, can interaction with ECM, changed cell morphology, cell motility, and decreased cell invasion in oral squamous cell lines. Our data suggested that beta4 integrin is greatly taken part in cancer cell invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：beta4 integrin, ヘミデスモゾーム, siRNA

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は高頻度に頸部リンパ節に転移することが知られている。またフィブロネクチン、コラーゲンといった細胞外接着因

子のレセプターであるインテグリンファミリーは口腔癌細胞に多く発現しており、浸潤転移過程で重要な役割を果たしていることが知られている。近年の報告では、インテグ

リンファミリー、及び上皮成長因子受容体 (EGFR) が協調することによって癌細胞自身の細胞運動、浸潤、増殖シグナル発現を増強させることが知られている。しかしながら、口腔扁平上皮癌細胞株において、上記タンパク質の相互作用はまだ報告例は少なく、どのような機構によって制御されているのか依然不明である。

2. 研究の目的

本研究はインテグリンファミリーの細胞膜表面からのエンドサイトーシス機構及び細胞浸潤性との関係をさらに解析することによって、新たなインテグリン阻害治療法を確立することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) [beta4 integrin 及びヘミデスモゾーム関連タンパク質を標的とする siRNA の同定及び機能解析]

beta4 integrin 及び関連タンパク質を標的となる効果的な siRNA を同定することにした。その結果、Dharmacon beta4 integrin siRNA が優秀なタンパク質発現抑制効果を認めた。口腔扁平上皮癌細胞株に導入し、beta4 integrin 及びヘミデスモゾームの形成が抑制されることをウェスタンブロッティング法、及び蛍光免疫染色法にて再検討を行った。具体的には抗体を用いて FACS 及びウェスタンブロッティング法にて行った。また、マトリジェル内での培養を行った結果、siRNA を transfection した口腔扁平上皮癌細胞において、浸潤能の抑制を認めた。

(2) [クラステリンタンパク質の発現及び

siRNA の効果]

患者から抽出した口腔癌組織をマイクロレイ解析を行った所 mRNA レベルにおいて高発現を認めた。さらに口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3) に Clusterin siRNA を導入したところタンパク質レベルで発現の抑制を認め、細胞運動性の減少を認めた。その際、インテグリンの発現には相関関係を認めなかった。

4. 研究成果

siRNA を用いて HSC-3 (口腔扁平上皮癌細胞株) 細胞の形態を確認したところ、図 1 の如く、細胞の形態が紡錘状に変化することが判明した。このことは細胞の細胞接着面積が減少しており、beta4 integrin によって構成される hemidesmosome の形成が阻害されている可能性を示唆するものであった。

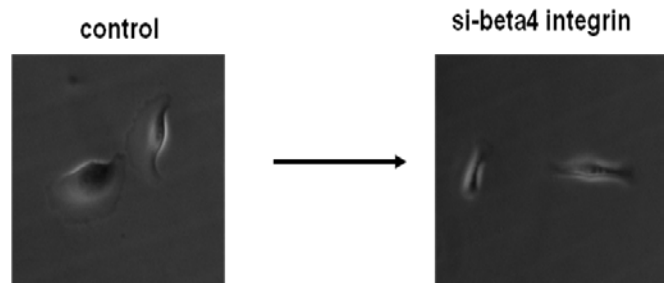


図 1 細胞形態変化

その後、にマトリジェル内の HSC-3 細胞による cell invasion assay を行った。その結果 beta4 integrin の発現を抑えた細胞において浸潤性の減少を認めた (図 2)。

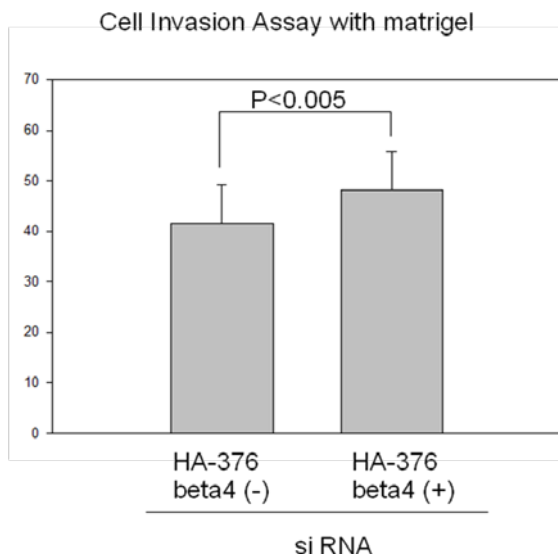


図2 Cell Invasion Assay

さらに、ラミニンマトリックス上にて beta4 integrin を阻害した所、図3の如く ECM 上の beta4 integrin の発現が低下することが判明した。

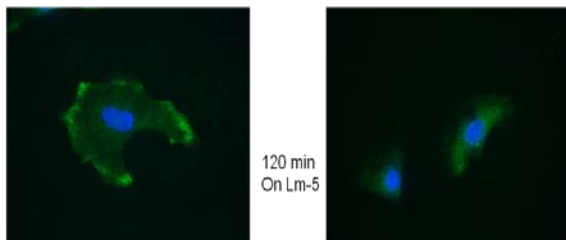


図3 細胞蛍光免疫染色 (beta4 integrin ラミニンマトリックス上)

ついで、beta4 integrin の発現を阻害し細胞運動性を確認したところ、ラミニン上にて運動性の低下を認めた。また EGFR cascade の阻害剤である AG1478 によって control 細胞においては運動性が低下するものの、beta4 integrin の発現を阻害した細胞においては運動性の低下を認めなかった (図4)。

このことから、beta4 integrin と EGFR cascade が協調して細胞運動性を制御することが判明した。

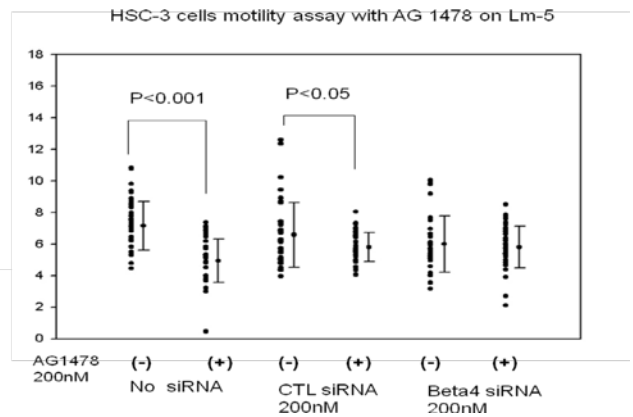


図4 beta4 integrin の発現による細胞運動性

U0126(ERK1/2 inhibitor) induced hemidesmosome assembly on laminin-332

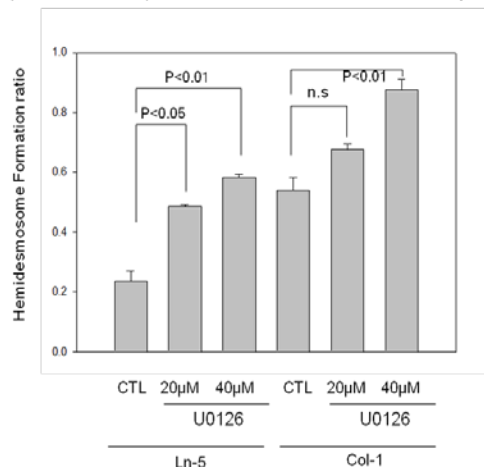


図5 U0126 によるヘミデスモゾームの形成能の変化

ERK1/2 inhibitor である U0126 によって hemidesmosome の形成が増大することが判明した。

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. 荒本孝良, Randall H Kramer, 浜川裕之 :
 $\beta 4$ インテグリンによる口腔扁平上皮癌細胞の運動制御機構(総説) 口腔組織培養学会誌
査読あり 18(2): 15-20, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒本 孝良 (ARAMOTO TAKAYOSHI)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 00380220