

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792218

研究課題名(和文) E-カドヘリンプロセス分子の Naked DNA を用いた口腔癌遺伝子治療法の開発研究

研究課題名(英文) Development of gene therapy for oral cancer mediated by Naked DNA of molecule processing E-cadherin

研究代表者

浜名 智昭 (HAMANA, TOMOAKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：40397922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プラスミン阻害物質である 2-アンチプラスミンの遺伝子導入細胞の、in vivoでの造腫瘍能の著しい低下と形成腫瘍におけるE-カドヘリン発現の抑制を認めた。このことから 2-アンチプラスミン蛋白の発現誘導が、in vivoでの扁平上皮癌における蛋白分解活性のみならず分散能と増殖能を低下させることで、口腔癌の浸潤・転移を抑制すると推測された。したがって、2-アンチプラスミン蛋白の発現を誘導することは、新しい遺伝子治療の開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study showed that oral cancer cells transferred gene of alpha2-antiplasmin (alpha2-AP) which is plasmin inhibitor were remarkably suppressed in vivo tumor formation and expression of E-cadherin increased in the formed tumor. The results suggest that inducing of alpha2-AP protein suppresses tumor invasion and metastasis by increasing not only proteolytic activity but also cell migration and proliferation. Therefore, it is expected the development of novel gene therapy by inducing of alpha2-AP for oral cancer.

研究分野：臨床腫瘍学，口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード： 2-アンチプラスミン プラスミン E-カドヘリン Naked DNA 口腔癌遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

がん治療を行う上で最大の障害は遠隔臓器への転移巣形成である。口腔癌は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、所属リンパ節への転移により予後不良となる症例が数多く見受けられる。がんの浸潤・転移の制御分子としてプラスミンが知られている。プラスミンは細胞外基質蛋白に対し強い分解活性を示すほか、他の不活性型蛋白分解酵素を活性化し蛋白分解カスケードの中心的な役割を果たし、がんの浸潤・転移を制御していると報告されている。

本研究者はこれまでに、プラスミンが細胞間接着分子である E-カドヘリンを細胞外ドメインで切断し、がん細胞膜上の E-カドヘリン発現を低下させることをみだし、プラスミンが E-カドヘリンの重要なプロセッシング調節因子であることを明らかにした。さらにプラスミンによる E-カドヘリンの切断は扁平上皮癌の細胞間接着を抑制し、細胞遊走を亢進させることを示した (Int. J. Oncol. 2005)。また、プラスミン阻害物質である  $\alpha 2$ -アンチプラスミンの遺伝子導入細胞を用い、 $\alpha 2$ -アンチプラスミンによるプラスミン活性の阻害が、E-カドヘリンのプロセッシングを抑制し、扁平上皮癌の細胞分散能を抑制していることを報告した (Oncology Reports, 2007)。

これらの研究結果から、申請者はプラスミンががんの浸潤・転移において、細胞外基質蛋白分解系の中心的な役割を果たすほか、E-カドヘリンをプロセッシングすることで、がん細胞の分散能を亢進させ、がんの浸潤・転移を促進していると考えている。

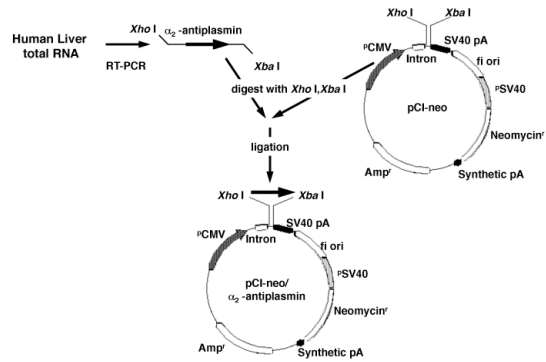
従ってプラスミン活性の阻害は、がん細胞の蛋白分解活性を抑制するだけでなく、分散能を低下させ、がんの浸潤・転移を抑制すると推測される。

2. 研究の目的

申請者は、プラスミンが、細胞間接着分子である E-カドヘリンを切断し、がん細胞の分散能を亢進することを明らかにしてきた。本研究では、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子を、病原性のない安全なプラスミド DNA すなわち Naked DNA の形状で腫瘍組織内へ直接注入することにより、プラスミン阻害物質である  $\alpha 2$ -アンチプラスミン蛋白の *in vivo*での発現を誘導し、扁平上皮癌における蛋白分解活性のみならず細胞分散能を低下させることで、口腔癌の浸潤・転移を抑制する、新しい遺伝子治療の開発を目的とする。

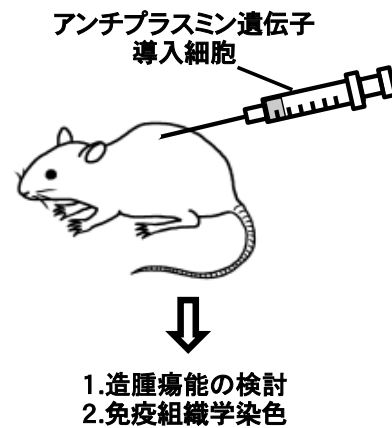
3. 研究の方法

実験には口腔扁平上皮癌細胞株と、その細胞株に  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子を導入した細胞を用いた(図 1)。



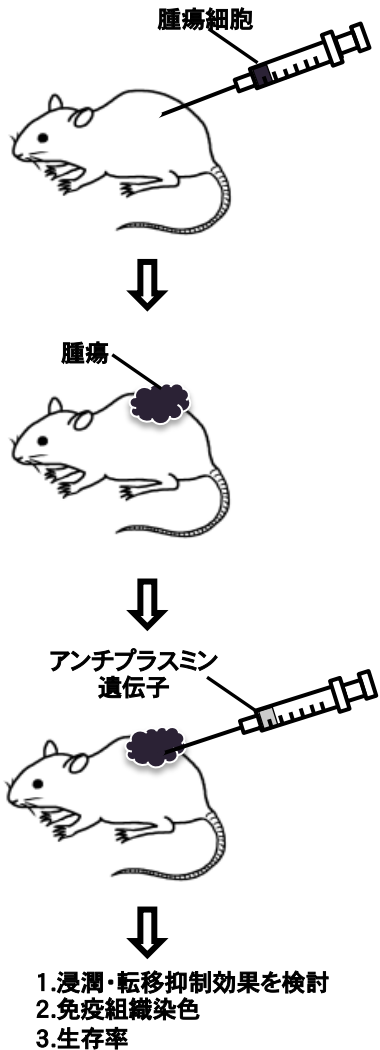
(図 1)

$\alpha 2$ -アンチプラスミンの発現誘導が、*in vitro*での扁平上皮癌細胞の細胞増殖に与える影響について検討するために、まずプラスミノーゲンを含む培地で各細胞を培養し、経時的に増殖細胞数を算定した。口腔癌細胞および  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞において、細胞増殖制御因子の一つであるサイクリン D1 の遺伝子発現を RT-PCR 法で検索した。つぎに  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞の *in vivo*での造腫瘍能について検索するため、1000 万個の各細胞を 0.1ml の培地に浮遊させ、4 週齢ヌードマウスの背部皮下に接種し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。さらに、形成した腫瘍における E-カドヘリンの発現を免疫組織化学的に検索した(図 2)。



(図 2)

また、ヌードマウスに形成させた口腔扁平上皮癌に  $\alpha 2$ -アンチプラスミンの Naked DNA を直接注入し、腫瘍組織中での  $\alpha 2$ -アンチプラスミンの発現を解析と  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入による扁平上皮癌の *in vivo*における浸潤・転移抑制効果を検討した(図 3)。

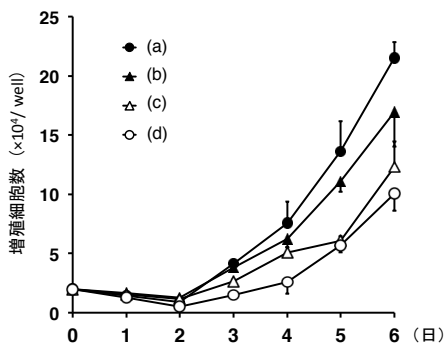


(図 3)

#### 4. 研究成果

(1)  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞の *in vitro* での細胞増殖能

*in vitro* において  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞は口腔癌細胞に比べ、低い増殖能を示し、培養 7 日目の増殖細胞数は口腔癌細胞の約 1/2 であった(図 4)。また、口腔癌細胞と比較し、遺伝子導入細胞はサイクリン D1 mRNA の発現が低下していた。

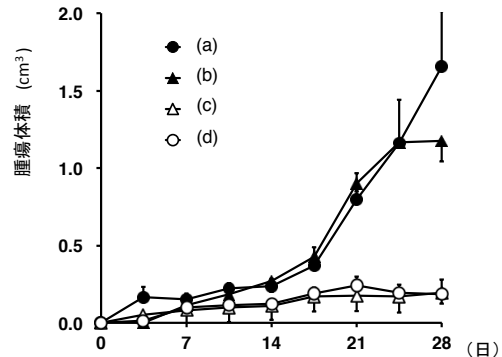


口腔癌細胞 (a, b) および  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞 (c, d) を  $1 \mu\text{g/ml}$  のプラスミノゲンを含んだ培養液で培養し、24 時間ごとに細胞数を測定した。遺伝子導入細胞では細胞増殖能は低下していた。

(図 4)

(2) *In vivo* における  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞の造腫瘍能

*In vivo* において、 $\alpha 2$ -アンチプラスミンの遺伝子導入細胞は腫瘍を形成するものの増大を認めず、口腔癌細胞に比べ増殖能が著しく低下していた(図 5)。

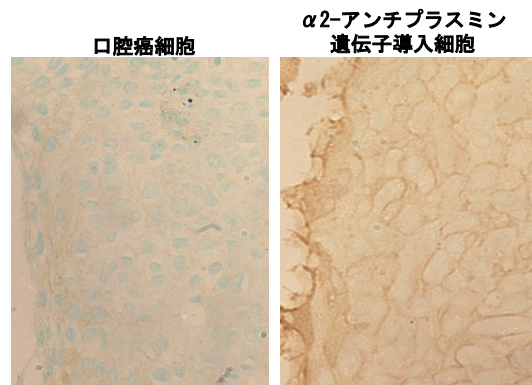


口腔癌細胞 (a, b) および  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞 (c, d) をヌードマウスの背部皮下に接種し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。遺伝子導入細胞では造腫瘍能は低下していた。

(図 5)

(3)  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞の形成腫瘍での E-カドヘリン発現

ヌードマウスに形成した腫瘍における E-カドヘリンの発現を免疫組織化学的に検索したところ、遺伝子導入細胞による形成腫瘍では細胞膜上での E-カドヘリンの発現が亢進していた(図 6)。



$\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞によるヌードマウス形成腫瘍は、口腔癌細胞に比べ、細胞膜上で E-カドヘリンの高い染色性を示した。

(図 6)

これらの結果は、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン蛋白の発現によるプラスミン活性の低下が *in vivo* における E-カドヘリンの発現を亢進し、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤増殖を抑制している可能性を示唆している。したがって、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン蛋白発現誘導は口腔癌の浸潤・転移を抑制する、新しい遺伝子治療の開発につながる事が期待できる。

#### 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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://seeds.hiroshima-u.ac.jp/soran/e5h7e55/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜名 智昭 (HAMANA TOMOAKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院（歯）・

助教

研究者番号：4039722