

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463044

研究課題名(和文) 2-アンチプラスミンのNaked DNA直接注入法による口腔癌遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy for oral cancer with direct injection of Naked DNA of alpha2-antiplasmin gene

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞をヌードマウス背部皮下に移植し、形成した腫瘍を免疫組織化学染色にて検索した。遺伝子導入細胞による形成腫瘍は、親株での形成腫瘍と比較し、細胞膜上でE-カドヘリンの高い染色性を認めた。さらに、E-カドヘリンの裏打ち蛋白であるβ-カテニンの細胞膜での発現が、遺伝子導入細胞による形成腫瘍では亢進していた。これらの結果は、2-アンチプラスミン蛋白によるプラスミン活性の阻害が、口腔扁平上皮癌細胞の分散能を低下させる可能性を示唆している。したがって、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。

研究成果の概要(英文)：SCCKN and alpha2-AP transfectants were subcutaneously inoculated into the nude mice. E-cadherin on cell membrane of xenograft from alpha2-AP transfectants was increased compared to SCCKN. Moreover, beta-catenin increased on cell membrane of xenograft from alpha2-AP transfectants. These findings suggest that the suppression of the plasminogen activator/plasmin system by alpha2-AP might reduce the dissemination of OSCC cells. Therefore, it could be expected the development of gene therapy for invasiveness and metastasis of OSCC cells with induction of alpha2-AP into OSCC tissue.

研究分野：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。プラスミノゲン/プラスミン系は細胞外基質蛋白に対し強い分解活性を有し、がんの浸潤・転移を制御している。一方、E-カドヘリンは上皮細胞の悪性化に伴い発現や機能が低下することや、癌細胞の E-カドヘリンの発現低下と浸潤・転移や予後との関連性が数多くの研究によって確認されている。また、ある種のがん患者血清中では E-カドヘリンの細胞外ドメイン量が上昇しており、その予後との相関性が報告されている。

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、癌細胞膜上の 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、細胞遊走能を亢進させることを示した (Int.J.Oncol. 2005)。また、プラスミンが扁平上皮癌細胞の増殖能を亢進することを示した。次に、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を用い、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)。さらに、2-アンチプラスミンの遺伝

子導入細胞は、*in vitro* および *in vivo* での増殖能が低下しており、特に *in vivo* では造腫瘍能が著しく抑制されていることを示した。これらの研究結果から、申請者はプラスミンが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癌細胞の分散増殖能を制御し、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、癌細胞の蛋白分解活性を抑制するだけでなく、分散能と増殖能を低下させ、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、癌細胞の分散能を亢進することを報告し、さらに、プラスミンが癌細胞の増殖能を亢進することを示してきた。

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で、*in vivo* において 2-アンチプラスミン蛋白の発現を誘導し、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・転移を制御する、新しい *in vivo* 遺伝子治療の開発研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

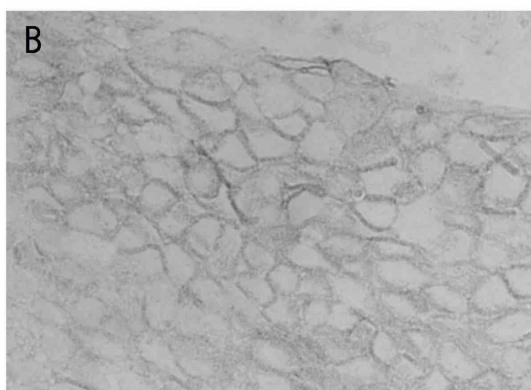
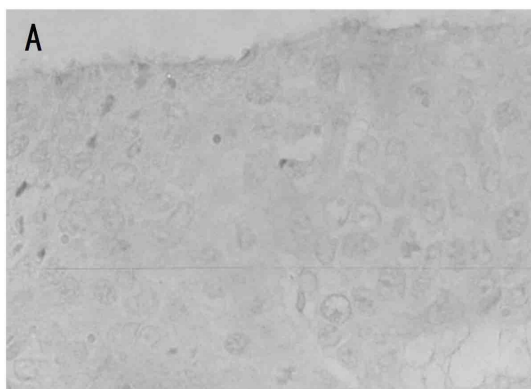
本研究では、2-アンチプラスミン遺伝子を導入した口腔扁平上皮癌細胞の *in vivo* での転移能を検討し、さらに形成した腫瘍での E-カドヘリン蛋白および増殖関連蛋白の発現を検

索した。つぎに， α 2-アンチプラスミン遺伝子を Naked DNA の形状でヌードマウスの正常組織に注射し， α 2-アンチプラスミン蛋白の発現効率を検索した。その後，ヌードマウス形成腫瘍に α 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 α 2-アンチプラスミン蛋白の発現とその増殖能に与える影響および転移抑制効果を検討した。

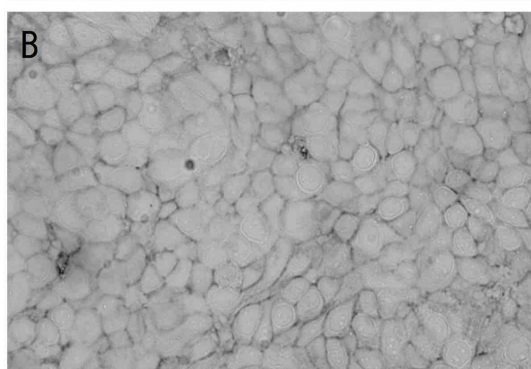
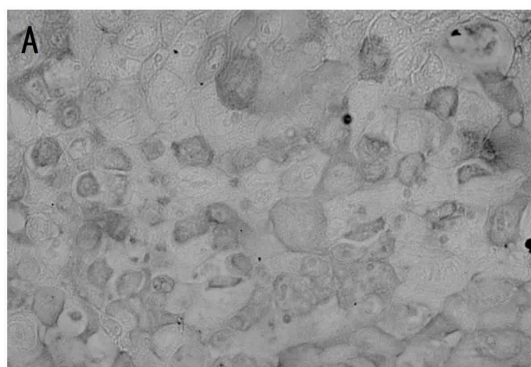
4. 研究成果

実験には口腔扁平上皮癌細胞株と，その細胞株に α 2-アンチプラスミン遺伝子を導入した細胞を用いた。 α 2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞をヌードマウス背部皮下に移植し，形成した腫瘍組織を免疫組織化学染色および Western Blot にて検索した。遺伝子導入細胞によるヌードマウス形成腫瘍は，親株での形成腫瘍と比較し，細胞膜上で E-カドヘリンの高い染色性を認めた。さらに，E-カドヘリンの裏打ち蛋白である β -カテニンの細胞膜での発現が，遺伝子導入細胞による形成腫瘍では亢進していることが確認された。

これらの結果は， α 2-アンチプラスミン蛋白によるプラスミン活性の障害が，口腔扁平上皮癌細胞の分散能を低下させる可能性を示唆している。したがって， α 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。



口腔癌細胞 (A) および α 2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞 (B) をヌードマウスの背部皮下に接種し，形成した腫瘍の E-カドヘリンの発現を検索した。
遺伝子導入細胞による形成腫瘍は，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。



β -カテニンは口腔癌細胞 (A) では細胞膜および細胞質で染色されているのに対し， α 2-アンチプラスミン遺伝子導入細胞 (B) では細胞質での染色性が低下し，細胞膜で亢進していた。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

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：40397922

(2)研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・

教授

研究者番号：00169153

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)

広島大学・病院・講師

研究者番号：70243251