

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670858

研究課題名(和文) CD82によるWnt経路・細胞外基質の制御機構解明と癌転移抑制薬の開発

研究課題名(英文) Control mechanism elucidation of the Wnt pathway, extracellular matrix by the CD82 and the development of cancer metastasis inhibitor

研究代表者

椎葉 正史 (SHIIBA, MASASHI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20301096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療における重要課題は、癌の転移、抗癌剤耐性などの制御である。我々は先行実験でCD82の発現制御をするカスケードを見出した。細胞接着機構のうち、CD82は非常に重要であり、Wnt経路を介してtarget genesに作用し、細胞の接着、移動、浸潤に必要な因子の産生を調整している。本研究では細胞接着機構のうち独自に同定した経路を制御することでin vitro, in vivoでの癌転移を抑制できることを明らかにした。さらに、抑制薬剤としてchlorogenic acidを同定し転移抑制治療薬の可能性を明らかにした。本結果は、転移抑制治療薬の新規開発にとって非常に有益なデータと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the cancer therapy, the control of metastasis, anticancer drug resistance, and radiation resistance are very important problems. However, it has not been developed cancer metastasis inhibitor yet. We have found a cascade that control the expression of CD82 in the prior study. CD82 is a very important factor in cell adhesion mechanism. Then, CD82 acts on target Genes via the Wnt pathway, and controls the production of the factors necessary for cell adhesion, movement, invasion and metastasis. In this study, by controlling the own identified pathway, it suggested that the possibility of suppressing the metastases. Furthermore, we have identified the chlorogenic acid as a metastasis suppressor drug candidates. These results are considered to be very useful data for development of metastasis suppressive drugs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発がん がん遺伝子 浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

癌治療における現在の重要課題は、癌の転移、抗癌剤耐性、放射線耐性などの制御である。実際の臨床でこれらの課題を解決・改善できれば飛躍的な治療成績の向上が見込まれる。しかし、未だに癌転移抑制薬は開発されていない。細胞接着機構のうち、CD82 は非常に重要であり、Wnt 経路を介してTarget Genes (Myc, Cyclin D1, TCF-1, PPAR- δ , MMP-7, Axin-2, CD44 等々) に作用し、細胞の接着、移動、浸潤に必要な様々な因子の産生を調整している。さらに、我々は先行実験でCD82 の発現制御をするAly-RRP1B-CD82 カスケードを独自に見出した。このカスケードの異常は、細胞外基質の産生にも影響を与えることが分かり、癌転移機構に重要な役割を果たしていると考えた。

2. 研究の目的

申請者らは、本研究で、細胞接着機構のうち独自に同定した Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM の経路に関し、本経路を制御することで癌転移機構を解明できるだけでなく、この経路上の遺伝子に対する抑制薬剤/増強薬剤を検索・同定できれば、転移抑制治療薬の新規開発へ重要な役割を果たすものと考えた。

3. 研究の方法

(1) Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM 経路の発現解析

多数の臨床サンプルを用いて、Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM 経路の各遺伝子の発現状態をreal time PCR と免疫染色で調べ、転移との相関関係を検討する。

癌由来培養細胞株から、各遺伝子の発現が増加している癌由来細胞株と減弱している癌由来細胞株を複数選び出す。

(2) 実験使用細胞株の選択

癌由来培養細胞株から、各遺伝子の発現が増加している癌由来細胞株と減弱している癌由来細胞株を複数選び出す。

(3) 癌由来細胞株における機能解析

これらの細胞株に関して、migration assay と invasion assay を行い、in vitro で各細胞株の細胞移動性や浸潤性を明らかにする。

(4) 遺伝子発現制御実験によるトランスフォーマント細胞株の作製と各遺伝子の発現制御の解析

shRNA 導入による遺伝子発現制御実験により、各遺伝子の発現制御により Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM 経

路の制御が可能であることを確認し、MMP などの target genes/や細胞外基質の発現制御に繋がっていることを確認する。

(5) in vitro における遺伝子的機能解析

(4) で作成したトランスフォーマントに関し、migration assay と invasion assay を行い、in vitro で各細胞株の細胞移動性や浸潤性を明らかにする。

(6) in vivo における遺伝子的機能解析

(4) で作成したトランスフォーマントをヌードマウスに移植し、約1ヶ月後、マウスの各臓器における転移癌の有無を病的、および遺伝子学的に確認する。

(7) Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM 経路における癌転移機構の解析

以上により、Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM 経路が癌転移にどの様に関連し、その経路の制御により癌転移が抑制できる可能性を検討する。

(8) 候補薬剤の検索・同定

Aly 遺伝子をふくめ、解明したメカニズムに登場した遺伝子と Aly 遺伝子の上流の遺伝子に対する発現阻害薬や増強薬を文献と遺伝子パスウェイソフト (IPA) により検索する。

(9) 候補薬剤使用による in vitro における機能解析

検索・同定した薬剤を用いて Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM 経路の制御が可能であることを確認し、MMP などの target genes の発現や細胞外基質産生の制御に繋がっていることを確認する。

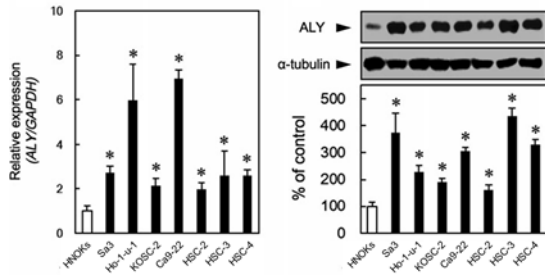
(10) 薬剤使用による in vitro における機能解析

本候補薬剤を用いたヌードマウスへの移植癌実験で、各臓器への転移を抑制できることを確認する。

4. 研究成果

(1) 口腔癌由来細胞株における ALY の発現解析

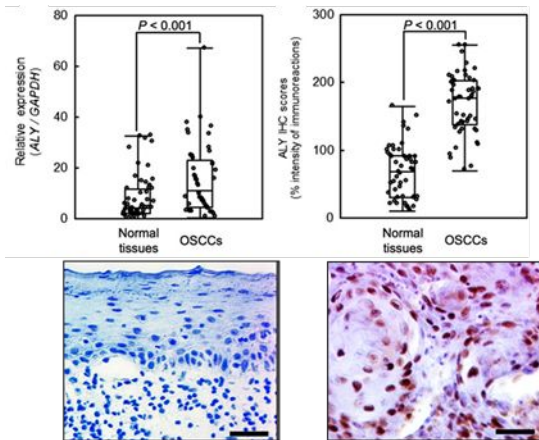
口腔癌由来細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, Sa3, KOSC-2, Ca9-22, Ho1-u-1)と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞(HNOKs)の total RNA を採取し、リアルタイム PCR 法とウェスタンブロッティング法を用いて ALY の発現解析を行った。その結果、図1に示すように使用した口腔癌由来細胞株全てにおいて mRNA およびタンパクレベルで ALY の過剰発現を認めた。



(図1 リアルタイムPCR法およびウェスタンブロットング法によるALYの発現解析)

(2) 臨床検体におけるALYの発現と臨床的機能解析

臨床検体の癌組織および正常粘膜組織を採取し、リアルタイムPCR法とウェスタンブロットング法を用いてALYの発現解析を行った。その結果、図2に示すように使用した口腔癌由来細胞株全てにおいてmRNAおよびタンパクレベルでALYの過剰発現を認めた。



(図2 臨床検体におけるALYの発現解析)

さらに、ALYの発現解析と臨床指標との相関を解析したところ、図3に示すように、リンパ節転移の有無との正の相関 ($P < 0.01$) を認めた。

Clinical classification	Total	Results of immunostaining		P value
		ALY (-)	ALY (+)	
Age at surgery (years)				
< 60	16	7 (44%)	9 (56%)	
≥ 60, < 70	9	4 (44%)	5 (56%)	0.797
≥ 70	25	10 (40%)	15 (60%)	
Gender				
Male	32	13 (41%)	19 (59%)	0.904
Female	18	7 (39%)	11 (61%)	
T-primary tumor				
T1	6	3 (50%)	3 (50%)	
T2	30	11 (37%)	19 (63%)	0.721
T3	6	3 (50%)	3 (50%)	
T4	8	4 (50%)	4 (50%)	
T1+T2	36	14 (39%)	22 (61%)	0.582
T3+T4	14	7 (50%)	7 (50%)	
Neg regional lymph node				0.009*
N0	30	17 (57%)	14 (47%)	
N1	10	3 (30%)	7 (70%)	
N2	9	1 (11%)	8 (89%)	
N3	0	0 (0%)	0 (0%)	
Stage				
I	6	3 (50%)	3 (50%)	
II	19	10 (53%)	9 (47%)	0.391
III	8	3 (38%)	5 (62%)	
IV	17	5 (29%)	12 (71%)	
IVb	28	13 (47%)	15 (53%)	
IV+IVb	25	8 (32%)	17 (68%)	0.156
Histopathologic type				
Well	32	12 (38%)	20 (62%)	
Moderately	14	7 (50%)	7 (50%)	0.403
Poorly	4	2 (50%)	2 (50%)	
Tumor site				
Oral floor	2	0 (0%)	2 (100%)	0.404
Gingiva	14	6 (43%)	8 (57%)	
Tongue	29	14 (48%)	15 (52%)	
Buccal mucosa	5	1 (20%)	4 (80%)	
Oral floor	2	0 (0%)	2 (100%)	

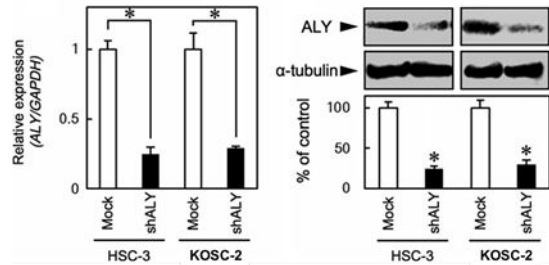
ALY(-), down-regulated ALY; ALY(+), up-regulated ALY
* $P < 0.05$

(図3 口腔癌臨床検体におけるALYのタンパク発現と臨床指標との相関)

(3) 候補口腔癌由来細胞株の選定およびトランス

フォームントの作製

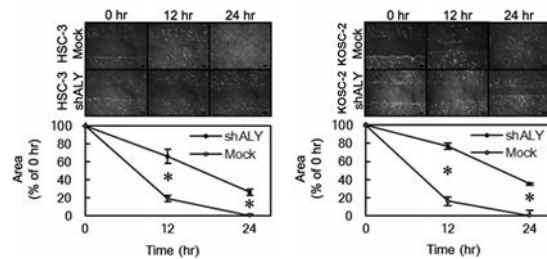
口腔癌由来細胞株7種からHSC-3, KOSC-2を選定し、shRNAを導入し、ALYの発現をknock downしたトランスフォームントを作製した(図4)。



(図4 HSC-3, KOSC-2のトランスフォームントの作製)

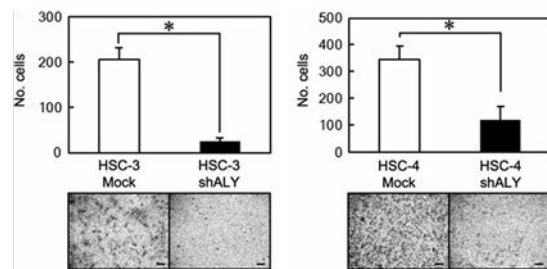
(4) *in vitro* における遺伝子の機能解析

作製したトランスフォームントの細胞株を用いて遺伝子の機能解析(遊走能試験および浸潤能試験)を行った。遊走能試験の結果、図5に示すとおり、コントロールと比較して遊走能の有意な低下を認めた。



(図5 遊走能試験: shRNA導入細胞)

同様に、浸潤能試験を行った結果、図6に示すとおり、コントロールと比較して浸潤能の有意な低下を認めた。

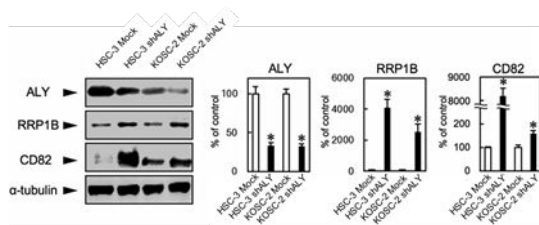


(図6 浸潤能試験: shRNA導入細胞)

(5) 各遺伝子の発現制御の解析

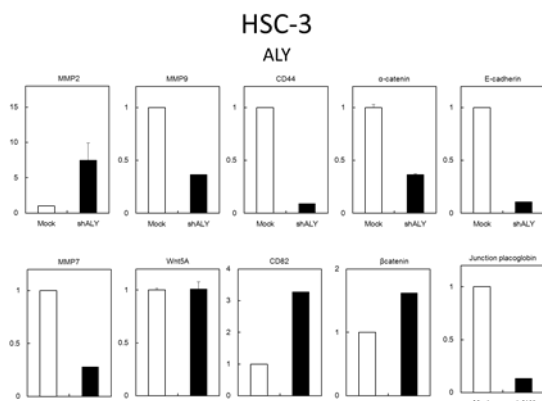
shRNA導入による遺伝子発現制御したトランスフォームントにおける、Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM経路の制御が可能であることを確認するため、Aly-RRP1B-CD82のタンパク発現解析を行

った。その結果、図7に示すとおり、ALYの発現を抑制することにより、RRP1BおよびCD82のタンパクの発現が有意に亢進され、ALYタンパクの発現制御によりRRP1B-CD82経路の制御が可能であることが明らかになった。

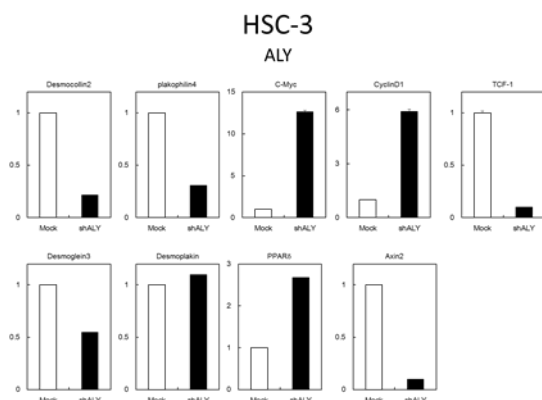


(図7 RRP1B-CD82経路の発現制御解析の結果)

続いて、Wnt-target genes/ECM経路(MMP2, MMP7, MMP9, Wnt5A, b-catenin, Axin2, CyclinD1, TCF-1, PPAR δ , C-Myc, 各細胞接着因子 etc...)の発現解析をリアルタイムPCR法で行った。その結果、図8,9のとおり、ALYの発現制御によりtarget genesの発現も変動し、Wnt-target genes/ECM経路の制御の可能性が示された。

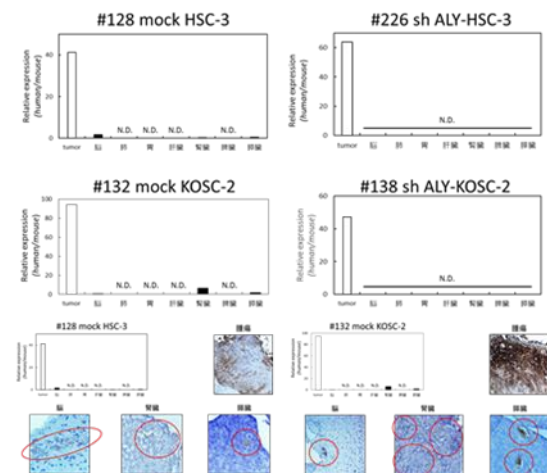


(図8 Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM経路、細胞接着因子の発現制御解析)



(図9 Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM経路、細胞接着因子の発現制御解析)

(6) *in vivo*における遺伝子的機能解析
shRNA導入による遺伝子発現制御したトランスフォーマントにおける、Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM経路と転移能の制御が可能であることを確認するため、*in vivo*における遺伝子的機能解析を行った。転移能の解析は、マウス各臓器からゲノムDNAを抽出しリアルタイムqRT-PCR法によるヒト細胞の絶対定量を行い、さらに各臓器を病理学的に検索し評価を行った。その結果、図10に示すとおり、コントロールが複数臓器に転移を認めたと比較して、トランスフォーマントの細胞は遠隔臓器への転移はなく、明らかに転移能が抑制されていた。また、病理学的にヒト細胞の有無を検索したが、トランスフォーマントの細胞の転移を肉眼的に認めなかった。

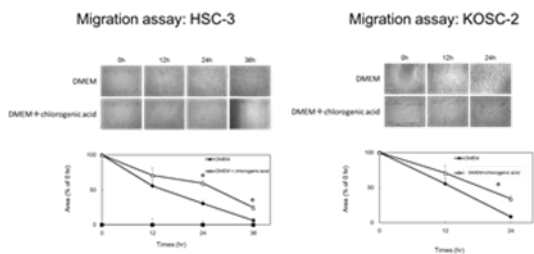


(図10 リアルタイムqRT-PCR法と病理学的検索によるshRNA導入細胞の転移能評価)

(7) 候補薬剤の同定および *in vitro*, *in vivo*における薬剤効果の評価

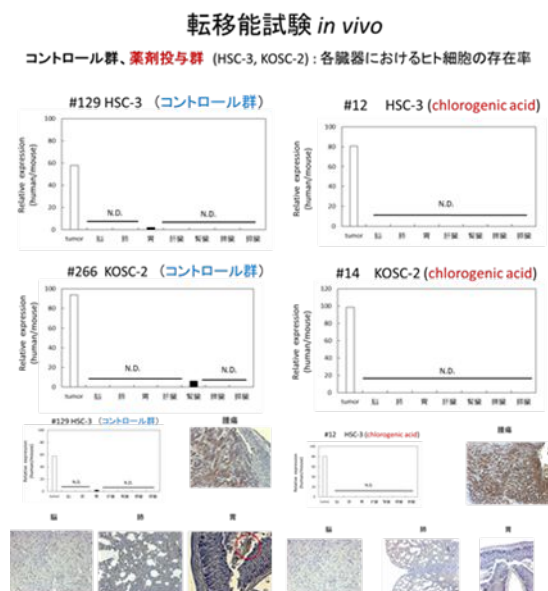
文献と遺伝子パスウェイソフト(IPA)により複数の候補薬剤を検索した結果、阻害剤として chlorogenic acid を同定した。さらに、chlorogenic acid を作用させ *in vitro*, *in vivo*において使用薬剤の転移能への効果を検証した。

*In vitro*において chlorogenic acid を作用させ機能解析を行ったところ、コントロールと比較して遊走能、浸潤能の有意な低下を認めた。(図11)



(図11 遊走能試験: 阻害薬作用)

さらに、*in vivo*において chlorogenic acid を作用させ (250mg/kg 週に1度腹腔投与) 転移能試験を行った。その結果、リアルタイム qRT-PCR 法によるヒト細胞の絶対定量による評価において、コントロール群では遠隔臓器に転移を認めたが、薬剤投与群では遠隔臓器に転移を認めなかった。さらに、各臓器を病理学的にヒト細胞の有無を検索した結果、コントロール群では遠隔臓器にヒト細胞の存在を認めたが、薬剤投与群では、遠隔臓器にヒト細胞の存在を確認することはできなかった。(図12)
これらの結果から、chlorogenic acid 投与による ALY の阻害は転移の抑制に一定の効果を示すことが明らかになった。



(図12 リアルタイム qRT-PCR 法と病理学的検索による薬剤投与群の転移能評価)

[まとめ]

口腔癌におけるCD82 の発現制御をする Aly-RRP1B-CD82 カスケードの癌転移機構の役割を評価し、癌転移抑制薬の創薬への足がかりを見出すべく、本研究で、細胞接着機構のうち独自に同定した Aly-RRP1B-CD82-Wnt-target genes/ECM経

路の制御に関し研究を行った。さらに、ALY の阻害薬である chlorogenic acid を同定し、その効果を *in vitro* および *in vivo* において、癌転移能の制御について解析を行った。その結果、口腔癌において、Aly-RRP1B-CD82 カスケードは癌転移機能に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、われわれが同定した chlorogenic acid は、ALY を阻害することで上記経路を制御し、口腔癌の転移機能を抑制することを示した。これらの結果は、転移抑制薬創薬への貴重なデータであり、さらに実験を進めれば口腔癌転移に対する抑制治療に対する有益なデータと考えられる。

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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

椎葉 正史 (SHIIBA MASASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20301096

(2)研究分担者

小河原 克訓 (OGAWARA KATSUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号: 20372360