

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390499
 研究課題名（和文） 4 回膜貫通蛋白質テトラスパニンの癌転移抑制機構を利用した新規口腔癌治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of new oral cancer therapy utilizing the metastasis suppressing effect of transmembrane 4 super-family protein, tetraspanin.
 研究代表者
 杉浦 剛（SUGIURA TSUYOSHI）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：40322292

研究成果の概要：

テトラスパニン・スーパーファミリーに属する CD82/KAI-1 は癌の転移を抑制する。本因子を将来的に治療に応用するため本因子の転移抑制機構について解析が進められている。本研究では CD82/KAI-1 の癌細胞の細胞間接着における機能について検討したところ、癌細胞の原発巣からの離脱を阻害し、逆に血管内皮細胞への癌細胞接着を抑制することにより癌の転移を抑制することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 転移抑制療法の口腔癌における重要性

口腔癌は全体の悪性腫瘍の中でも早期発見が可能であるため治療後の五年生存率は stage I/II では 75% 以上である。しかしながらリンパ節転移を伴う症例については制御が困難となり、後発転移をきたす症例では極めて予後が不良である。口腔癌の治療成績を改善するためには転移を抑制する効果的な治療法の開発が必要と考えられる。

(2) 転移関連分子を制御する調節分子の存在と重要性

近年になって転移関連分子を制御する機能を持つ極めて多機能な分子の存在があきらかにされてきた。例えば我々はウロキナーゼレセプターが本来のウロキナーゼに対する受容体であるだけでなく $\alpha 2$ インテグリンと複合体を形成することによりインテグリンの機能を制御し、癌の転移を促進することを報告している (Expression of the Urokinase Receptor Regulates Focal Adhesion Assembly and Cell Migration in Adenoid Cystic Carcinoma Cells: SAMAH ABU-ALI, TSUYOSHI SUGIURA JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 203:410-419)

(2005) 第63回日本癌学会シンポジウムで発表)。さらに申請者はテトラスパニンという細胞膜表面の分子がインテグリンと複合体を形成することによりプロテアーゼ産生や癌浸潤転移のシグナル伝達を制御し、浸潤を抑制することを明らかにしている (**Function of $\alpha 3\beta 1$ -Tetraspanin Protein Complexes in Tumor Cell Invasion. Evidence for the Role of the Complexes in Production of MatrixMetalloproteinase 2 (MMP-2), Tsuyoshi Sugiura and Fedor Berditchevski The Journal of Cell Biology, 1999**

1375-1389)。これまでの分子標的治療は現実には効果が乏しい。私はこの理由として、癌の浸潤転移が多く、転移分子に制御を受けており、単純な単一分子を標的にした治療では浸潤転移機構を制御できないからであると考えている。しかし考え方を換えれば、このような多機能な分子を標的にした場合、いままで困難であった多くの転移分子の同時制御の可能性を示唆しているのではないだろうか。

(3) 4回膜貫通型蛋白質テトラスパニンの強力な転移制御機能

申請者はこのような転移制御分子の中でも特にテトラスパニンに注目して研究をおこなっている。テトラスパニンは4回膜貫通型蛋白質のスーパーファミリーであり、CD9, CD82をはじめとして現在約15種類のメンバーが報告されている。共通の機能として細胞表面の様々な受容体に結合してその機能調節をおこなっていると考えられている。申請者と共同研究者はテトラスパニンがインテグリンと複合体を形成することによりウロキナーゼレセプターとインテグリンの複合体形成が阻害され、浸潤転移機構が阻害されることを示した (**Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. Bass R, Werner F, Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F, Ellis V. J Biol Chem. 14811-8. 2005.**)。さらに最新の研究結果ではテトラスパニンのうちCD82はEGF受容体やHGF受容体とも複合体を形成することを明らかにしている

(**Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1 Elena Odintsova, Tsuyoshi Sugiura and Fedor Berditchevski Current Biology 2000, 10:1009-1012, 第59回口腔科学会シンポジウムで発表**)。さらに、それぞれのリガンドによる細胞運動を強力に阻害し、転移を抑制することがわかっている。(第59回口腔科学会シンポジウム)

(4) 疫学的に裏づけされたテトラスパニンの

癌転移抑制能

テトラスパニンは正常の細胞に広範に発現しており、癌の悪性化に伴って発現が低下してくることが知られており、疫学的にもテトラスパニンの高発現は口腔癌を含め種々の悪性腫瘍の良好な予後と相関する。すなわち3. で示したようなテトラスパニンによる実験的転移抑制能は生体でも同様に機能している可能性を強く示唆している。

(5) 国内で立ち遅れているテトラスパニンの機能研究

欧米でのテトラスパニン研究は急速に拡大しており分子機能も徐々に解明されつつあるが本邦での報告は極めて少なく、本邦でのテトラスパニン研究は遅れていると考えられ、本研究をさらに推進させていく必要性があると考えられる。**特に CD82 の基礎的・臨床的研究は申請者が国内唯一の研究である。**そこで本研究ではテトラスパニンの転移抑制能を利用した口腔癌の治療法の開発を着想した。

2. 研究の目的

前述した背景および研究経過をふまえ、以下のような研究目的を設定した。

- (1) テトラスパニンの複合体形成とそれによる癌転移関連シグナル制御の網羅的解析
- (2) 癌治療戦略としてのテトラスパニンの応用

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

CD82 低発現細胞株である非小細胞性肺癌細胞 h1299 に CD82 cDNA を組み込んだ (pZeoSV/CD82)、または組み込まない pZeoSV vector を遺伝子導入を行うことによってコントロール細胞 h1299/zeo および CD82 強制発現細胞 h1299/CD82 を得た。

(2) 原発巣からの腫瘍細胞の離脱・浸潤能の評価

原発巣からの腫瘍細胞の離脱・浸潤能の検討を行うために、新しいアッセイ系を樹立した。h1299 細胞を蛍光標識を行った。標識した細胞を 10 μ l の I 型コラーゲンゲルに懸濁し硬化させ、細胞凝集塊とした。固まった細胞凝集塊は、蛍光標識していない線維芽細胞を浮遊させた I 型コラーゲンゲルの中央に埋没し、硬化させ培養した。腫瘍の細胞凝集塊からの離脱の様子は蛍光顕微鏡で観察し、写真を撮影した。

(3) aggregation assay

凝集能の評価は過去に報告された方法に準じて、視野内の全細胞数に対する凝集塊を

形成している細胞数の割合を凝集能として評価した。

(4)血管内皮細胞への癌細胞接着能の検討

HUVEC への腫瘍細胞の接着を定量化した。前述の方法により蛍光標識した h1299 細胞を、単層培養された HUVEC 細胞上に重層し、37°C、30 分接着させた。接着した細胞は、蛍光顕微鏡を用いて写真を撮影し、接着細胞数を数えた。

(5)免疫蛍光染色

E-cadherin およびβ-catenin の検出には間接蛍光抗体染色を用いた。

(6)免疫沈降法

サンプルはイムノブロットで解析を行った。

(7)イムノブロット解析

細胞溶解液は SDS-PAGE に展開し、ニトロセルロースメンブレンに転写し、特異的の一次抗体で室温 1 時間反応させた。蛋白質のバンドは HRP 標識二次抗体および ECL ウェスタンブロットティング検出システムを用いて解析を行った。

(8)実験動物および転移実験

h1299/zeo および h1299/CD82 を培養液中で細胞濃度が 1.0×10^7 個/ml になるように調整し、29 G 注射針付注射器を用い、エーテル麻酔下でヌードマウスの尾静脈より接種した。細胞接種後、8 週目に屠殺し、肺を摘出した。肉眼的に転移を認めた場合、転移陽性と判断した。

(9)DNA マイクロアレイ

RNA サンプルは h1299/zeo および h1299/CD82 より抽出し DNA マイクロアレイを行った。次に、h1299/zeo と h1299/CD82 の間で発現に有意差があるかを検討した。

(10)リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法による ST3GALs の mRNA 発現の解析

4. 研究成果

(1)テトラスパニン CD82 は肝細胞増殖因子受容体(c-Met)と複合体を形成することによりc-Met の下流シグナル伝達を阻害し、癌の細胞遊走を抑制する。(Takahashi and Sugiura et. al., International Journal of Cancer, 2006)

CD82 を高発現している口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 は CD82 と c-Met は蛋白質複合体を形成していた。次に CD82-c-Met 複合体の機能を明らかにするため CD82 を発現しない肺がん細胞株 h1299 に CD82 を強制発現させた。興味深いことに、CD82 の強制発現は HGF 添加による葉状突起の形成と細胞遊走を著明に抑

制したが HGF 結合による c-Met リン酸化に影響を及ぼさなかった。CD82 は選択的に Ras-Cdc42/Rac1 と PI3K-Cdc42/Rac1 経路のシグナルを減弱する一方、他の c-Met シグナル伝達経路である PI3K-Akt と MAPK カスケードに全く影響を与えなかった。c-Met のシグナル伝達アダプター蛋白質は CD82 発現によって c-Met との結合が減弱しており、これが c-Met 下流シグナルの制御機構であると考えられた。

(2)テトラスパニン CD82 は E-cadherin/β-catenin 複合体を安定化することにより E-cadherin を介した細胞間接着を強固にし、癌細胞の原発巣からの離脱を阻害する。(Abe and Sugiura et. al, Cancer Letters, 2007)

この研究で我々は新しい in vitro における原発巣離脱モデルを開発した。CD82 を強制発現させると癌細胞の細胞間接着を強固となり、原発巣離脱モデルにおける細胞離脱は完全に阻害された。さらに CD82 は細胞凝集を著明に促進した。この細胞凝集は EDTA および E-cadherin 抗体処理で阻害された。CD82 強制発現は E-cadherin の発現に影響を及ぼさなかったが E-cadherin/β-catenin 複合体を増加させていた。CD82 強制発現により β-catenin のチロシンリン酸化が抑制されており、CD82 は E-cadherin/β-catenin 複合体を安定化することで、E-cadherin による細胞接着を強固にし、癌細胞の原発巣からの離脱を阻害していると考えられた。

(3)テトラスパニン CD82 は ST3GAL4 の発現を低下させることによって癌細胞におけるシアリルルイス抗原の発現を抑制し、血管壁におけるセレクチンを介した細胞間接着を抑制し、遠隔臓器における癌細胞の着床を阻害することによって転移を阻害する。(UICC World Cancer Congress 2008 発表)

癌転移抑制因子である CD82/KAI-1 が癌細胞の遊走能を低下させることによって癌の浸潤を抑制することが明らかにされてきた。しかし、直接転移を抑制するメカニズムについては明らかにされていない。そこで今回、血管壁上のセレクチンに対するリガンドであるシアリルルイス抗原を介した癌細胞接着における CD82/KAI-1 の影響について検討した。癌細胞に CD82 を過剰発現させると、マウス尾静脈接種による実験的肺転移モデルおよびヒト臍帯静脈上皮細胞 (HUVEC) に対する接着実験において著明な抑制効果を示した。シアリルルイス A および X に対する中和抗体は CD82 を発現しない親株癌細胞の HUVEC

への接着を完全に阻害した。さらに CD82 を過剰発現させた細胞はシアリルルイス A/X の発現が著明に減少していた。シアリルルイス抗原の生合成を制御する ST3 β -galactoside α -2, 3-sialyltransferase 4 (ST3GAL4) は cDNA マイクロアレイおよび real-time PCR において CD82 の過剰発現によって 20 分の 1 に減少しており、CD82 は ST3GAL4 の発現を抑制することにより癌細胞におけるシアリルルイス抗原の発現を抑制し、遠隔部位における血管壁への着床を阻害し、癌の転移を抑制していると考えられた。

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 6 件)

- (1) Tsuyoshi Sugiura, Yoshiko Inoue, Ryosuke Matsuki, Kotaro Ishii, Miho Takahashi, Masakazu Abe, and Kanemitsu Shirasuna: VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. International Journal of Oncology. 34. 637-380, 2009 査読あり
- (2) Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M, Shirasuna K: A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. Cancer Letters. 266, 163-70, 2008 査読あり
- (3) Miho Takahashi, Tsuyoshi Sugiura, Masakazu Abe, Kotaro Ishii, Kanemitsu Shirasuna: Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration., International Journal of Cancer. 121, 1919-1929, 2007 査読あり
- (4) Hasagawa M, Furuya M, Kasuya Y, Nishiyama M, Sugiura T, Nikaido T, Momota Y, Ichinose M, Kimura S: CD151 dynamics in carcinoma-stroma interaction: integrin expression, adhesion strength and proteolytic activity, Laboratory Investigation,

87, 882-892, 2007 査読あり

- (5) Yoshiko Inoue, Tsuyoshi Sugiura, Ryosuke Matsuki, Kotaro Ishii, Katsuhiko Seki and Kanemitsu Shirasuna: Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA), uPA receptor, and Plasminogen Activator Inhibitor-I, Oral Science International, 2, 38-44, 2007 査読あり

- (6) 杉浦 剛、白砂兼光、テトラスパニンの癌浸潤・転移抑制機構、日本口腔科学会雑誌、55、100-103、2006 査読あり

[学会発表] (計 18 件)

- (1) 杉浦剛、阿部正和、高橋美穂、千北さとみ、下田みゆき、小林洋輔、白砂兼光: CD82/KAI-1 によるシアリルルイス抗原を介した癌細胞接着の制御—癌細胞の血管壁接着阻害による転移抑制—, 第 45 回日本口腔組織培養学会, 平成 20 年 11 月松本市
- (2) M. Takahashi, T. Uematsu, T. Niwa, T. Sugiura, K. Shirasuna, K. Furusawa: Phenotypical change in the tetraspanin CD82/KAI-1 expressed cancer cells, 第 67 回日本癌学会学術総会, 平成 20 年 10 月名古屋
- (3) M. Abe, T. Sugiura, M. Takahashi, M. Shimoda, S. Chigita, K. Shirasuna: FUNCTION OF CD82/KAI-1 ON SIALYL LEWIS ANTIGEN MEDIATED ADHESION OF CANCER CELLS. 第 67 回日本癌学会学術総会, 平成 20 年 10 月名古屋
- (4) 丹羽崇, 上松隆司、高橋美穂、杉浦剛、白砂兼光、古澤清文: 癌細胞における Tetraspanin KAI-1/CD82 の発現と形質変化. 第 53 回日本口腔外科学会総会, 平成 20 年 10 月徳島
- (5) T. Sugiura, M. Abe, M. Shimoda, S. Chigita, K. Shirasuna: FUNCTION OF CD82/KAI-1 ON SIALYL LEWIS ANTIGEN MEDIATED ADHESION OF CANCER CELLS. UICC World Cancer Congress 2008, 平成 20 年 8 月 Geneva, Switzerland
- (6) 高橋美穂、上松隆司、杉浦剛、白砂兼光、古澤清文: 癌細胞における Tetraspanin KAI-1/CD82 の発現と形質変化, 第 62 回日本口腔科学会学術集会, 平成 20 年 4 月福岡
- (7) 阿部正和、杉浦剛、高橋美穂、石井広太郎、下田みゆき、白砂兼光: 癌細胞の細

- 胞間接着における CD82/KAI-1 の機能解析. 第 62 回日本口腔科学会学術集会, 平成 20 年 4 月 福岡
- (8) Miyuki Shimoda, Tsuyoshi Sugiura, Kotaro Ishii, Miho Takahashi, Masakazu Abe, Kanemitsu Shirasuna: Global analysis of gene alteration in metastasis of adenoid cystic carcinoma in a mouse metastasis model. 第 66 回日本癌学会学術総会, 平成 19 年 10 月 横浜
- (9) Mitsuko Furuya, Tsuyoshi Sugiura: The dynamics of CD151 might be crucial in carcinoma-matrix interaction by controlling integrins and MMPs. 第 66 回日本癌学会学術総会, 平成 19 年 10 月 横浜
- (10) Miho Takahashi, Tsuyoshi Sugiura, Takashi Uematsu, Kiyofumi Furusawa, Kanemitsu Shirasuna: Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin CD82/KAI-1 affects cancer cell migration. 第 66 回日本癌学会学術総会, 平成 19 年 10 月 横浜
- (11) Masakazu Abe, Tsuyoshi Sugiura, Miho Takahashi, Miyuki Shimoda, Kanemitsu Shirasuna: Effect of CD82/KAI1 on inter-cellular adhesion of cancer cells. 第 66 回日本癌学会学術総会, 平成 19 年 10 月 横浜
- (12) 石井広太郎、杉浦剛、関勝宏、高橋美穂、松木良介、阿部正和、白砂兼光: 腺様嚢胞癌の造腫瘍性および転移関連遺伝子の網羅的解析, 第 31 回日本頭頸部癌学会, 平成 19 年 6 月 横浜
- (13) 阿部正和、杉浦剛、高橋美穂、石井広太郎、松木良介、白砂兼光: CD82/KAI1 による癌細胞の細胞間接着機能調節機構の解析, 第 31 回日本頭頸部癌学会, 平成 19 年 6 月 横浜
- (14) 石井広太郎、杉浦剛、関勝宏、高橋美穂、松木良介、阿部正和、白砂兼光: 腺様嚢胞癌の造腫瘍性および転移関連遺伝子の網羅的解析, 第 61 回日本口腔科学会学術総会, 平成 19 年 4 月 神戸
- (15) 古屋充子、加藤弘明、長谷川正和、粕谷善俊、杉浦剛、吉木敬、石渡勇、石倉浩、腫瘍播種・接着において腫瘍細胞外基質の相互作用に関与するインテグリンを操るテトラスパニンの解析, 第 65 回日本癌学会学術総会, 平成 18 年 9 月 横浜
- (16) 高橋美穂、杉浦剛、白砂兼光、テトラスパニン CD82/KAI-1 による癌細胞遊走の抑制—CD82 による c-Met シグナルの多機能調節機構—, 第 65 回日本癌学会学術総会, 平成 18 年 9 月 横浜
- (17) 井上美子、杉浦剛、松木良介、高橋美穂、石井広太郎、白砂兼光、口腔癌のリンパ節転移とリンパ管新生との関連, 第 30 回日本頭頸部癌学会, 平成 18 年 6 月 大阪
- (18) 高橋美穂、杉浦剛、白砂兼光、テトラスパニン CD82/KAI-1 による c-Met シグナルの多機能調節機構, 第 30 回日本頭頸部癌学会, 平成 18 年 6 月 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 剛 (SUGIURA TSUYOSHI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 40322292

(2) 研究分担者

白砂 兼光 (SHIRASUNA KANEMITSU)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号: 30093420

(3) 連携研究者

上松 隆司 (UEMATSU TAKASHI)

松本歯科大学・歯学研究院・准教授

研究者番号: 40203476

(4) 連携研究者

高橋 美穂 (TAKAHASHI MIHO)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 00444795