

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792027

研究課題名（和文） 癌転移制御因子 CD82 による癌細胞の細胞間接着機構の解析と臨床応用

研究課題名（英文） The analysis and clinical applications of cellular adhesion control mechanisms by a metastasis suppressor CD82 in an oral cancer

研究代表者

高橋 美穂 (TAKAHASHI MIHO)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00444795

研究成果の概要(和文):癌転移抑制因子 CD82 は c-Met と複合体を形成し、c-Met アダプター蛋白質の結合を阻害することにより癌細胞の遊走を抑制することが明らかにされている。一方、上皮細胞接着因子 E-カドヘリンは細胞内で β および γ -カテニンと結合し、 α -カテニンおよび α -アクチニン分子を介してアクチン細胞骨格と結合し、強い細胞間結合を形成することが明らかにされている。また、E-カドヘリンの細胞質内領域に p120 が結合することにより、E-カドヘリンの機能を制御している。これらのことから、E-カドヘリンは細胞間接着のみならず、細胞運動にも深く関与している可能性がある。実験結果から、CD82 は E-カドヘリン-カテニン-アクチニン-アクチン細胞骨格系シグナル伝達を制御し、細胞間接着を保持させながら細胞運動を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): It has been proposed that the metastasis suppressor CD82 regulates biological activity by associating with cell surface receptors or proteins. We reported previously that the CD82-c-Met complex inhibits hepatocyte growth factor (HGF)-induced cancer cell migration by the inactivation of small GTP-binding proteins of the Rho family via c-Met adapter proteins. On the other hand, β -catenin binds to the cytoplasmic domain of E-cadherin and links E-cadherin to the actin cytoskeleton through α -actinin, forming strong intercellular junction. In addition, the function of E-cadherin is regulated by binding p120 to the cytoplasmic domain of E-cadherin. E-cadherin has been implicated not only in cell adhesion but also in the signaling of cell migration. Our results suggested that CD82 regulated the signaling of E-cadherin-catenin-actinin-actin cell cytoskeleton and inhibited cell migration with supporting cell adhesion.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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:癌、遺伝子、細胞・組織、シグナル伝達、CD82

1. 研究開始当初の背景

(1) 新たな抗転移薬の開発の重要性

転移腫瘍では、転移巣が転移臓器内に溜まっていると判断したときの治療法選択は一般的には局所療法(手術療法、放射線療法)を優先し、抗癌剤などの全身療法を選択は補助的な役割しか期待されていないのが現状である。一方、未だ転移が臨床的に明確になっていない場合の治療の現状は、微小癌根絶を目的とした大量化学療法や、術後補助的的化学療法に依存している。これらは転移メカニズムに依存した特異的な治療戦略ではなく、従来の殺細胞効果を期待した治療である。近年、血管新生の阻害やMMPの活性化の阻害など、癌メカニズムの一部を標的とした抗転移薬剤の開発が大きな注目を集めている。しかし、これらの薬剤は重篤な副作用が発生する上、完全な転移抑制が望めない。そこで、複数のステップを標的としたより効果的な抗転移薬の開発の必要性がある。

(2) 癌転移抑制因子 CD82/KAI-1 は強力な転移抑制機能をもつ

Tetraspanin または TM4SF (Transmembrane 4 superfamily) 蛋白質はあらゆる細胞種に発現する細胞膜表面の膜貫通型蛋白質の superfamily であり、いくつかの Tetraspanin は様々なインテグリンと複合体を形成することが知られている。さらに、多くの Tetraspanin が癌細胞の転移に重要な働きをしていることが示唆されている。なかでも CD82/KAI1 は様々な悪性腫瘍において浸潤転移抑制に働いていることを示唆する報告が多数なされている。例えば、悪性腫瘍では CD82 の発現は癌患者の良好な予後と関連するが、逆に CD82 発現の抑制が臨床的な進行癌でしばしば報告されている。また、CD82 の発現と癌の浸潤転移能との逆相関が前立腺、胃、大腸、子宮頸部、乳房、皮膚、膀胱、肺、膵臓、肝臓、甲状腺など広範囲の癌に観察されている。CD82 の細胞機能における役割は長い間不明であったが、CD82 は細胞凝集、細胞運動、癌転移、アポトーシスを調節することが最近報告されている。CD82 が上皮成長因子受容体 EGFR と複合体を形成し、EGFR の細胞内移行を促進すること、さらにリガンド結合による EGFR の二量体化を抑制して、EGFR シグナル伝達を阻害する結果癌細胞運動を制御し転移を抑制することが報告されている。最新の研究で申請者は、CD82 が HGF 受容体 c-Met と複合体を形成し、そのシグナルを制御することにより低分子量 G 蛋白質の活性化を阻害し、癌細胞運動を抑制することを明らかにした。

2. 研究の目的

Tetraspanin superfamily の一つである CD82/KAI-1 はインテグリンや他の Tetraspanin と複合体を形成して Tetraspanin web を形成する。申請者は CD82 が癌細胞運動を抑制して癌浸潤転移を制御することを見出し、癌転移抑制遺伝子としての機能解析を進めている。癌細胞の E-カドヘリン細胞間接着機構の破綻は、癌細胞が癌巣から離脱する癌浸潤の第一段階において深く関与すると考えられている。そこで、癌の浸潤転移過程にかかわる E-カドヘリン細胞間接着不全機構を解析し、CD82-E-カドヘリン相互作用からの癌細胞の接着・浸潤転移のメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

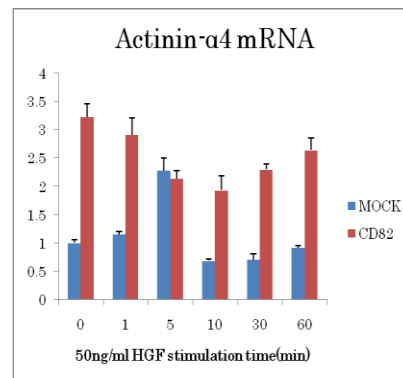
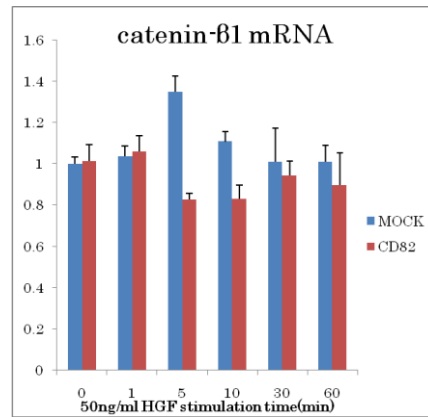
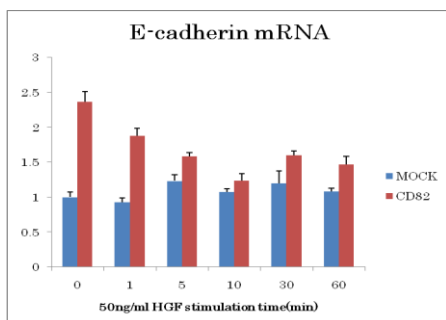
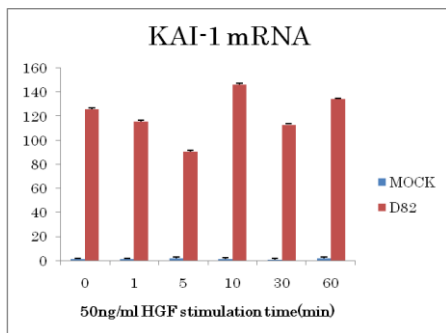
(1) CD82-E-カドヘリン相互作用からの癌細胞の接着・浸潤転移のメカニズムを検討するために、HGF 刺激時の CD82 による E-カドヘリン-カテニン-アクチン-アクチン細胞骨格系シグナル伝達への影響を real-time PCR を用いて解析
(2) HGF 刺激による β -カテニンのリン酸化状態およびリン酸化部位について、特異的抗リン酸化抗体を用いてウエスタンブロットで解析
 β -カテニンの特異的リン酸化抗体は以下のものを使用する。

- phospho- β -catenin(Ser33/37/Thr41) antibody:GSK-3 β によりリン酸化される
- phospho- β -catenin(Thr45) antibody:CK1 α によりリン酸化される
- phospho- β -catenin(Ser552) antibody, phospho- β -catenin(Ser675) antibody:Akt, PKA によりリン酸化され、 β -catenin の Ser552 のリン酸化の有無をみることにより、 β -カテニンの核内蓄積への誘導および転写活性の促進状態を見ることができる。

4. 研究成果

(1) Tetraspanin superfamily の一つである癌転移抑制因子 CD82 が c-Met と複合体を形成し、c-Met アダプター蛋白質の結合を阻害することにより癌細胞の遊走を抑制することが明らかにされている。一方、上皮細胞接着因子 E-カドヘリンは細胞内で β および γ -カテニンと結合し、 α -カテニンおよび α -アクチニン分子を介してアクチン細胞骨格と結合し、強い細胞間結合を形成することが明らかになっている。また、E-カドヘリンの細胞質内領域に p120 が結合することにより、E-カドヘリンの機能を制御している。これらのことから、E-カドヘリンは細胞間接着のみならず、細胞運動にも深く関与しているのではないかと考えられる。そこで、CD82-E-カドヘリン相互作用

用からの癌細胞の接着・浸潤転移のメカニズムを検討するために、HGF 刺激時の CD82 による E-カドヘリン-カテニン-アクチニン-アクチン細胞骨格系シグナル伝達への影響を real-time PCR を用いて解析を行った。細胞株は CD82 低発現細胞株 h1299 に CD82 を遺伝子導入した h1229/CD82 transfectant とコントロールとして MOCK を用いた。HGF 無刺激時では、MOCK と比較すると CD82 導入株では E-カドヘリン、アクチニン $\alpha 4$ の mRNA の発現は高発現を認めたが、 β -カテニンの mRNA 発現には有意な差は認められなかった。HGF 刺激では E-カドヘリン、 β -カテニン、アクチニン $\alpha 4$ の mRNA の発現は CD82 導入株では経時的に抑制されたが、MOCK の発現よりは常に高発現を示した。MOCK の β -カテニン、アクチニン $\alpha 4$ の mRNA の発現は HGF 刺激後5分で発現のピークを向かえその後減少を認めたが、E-カドヘリンの mRNA の発現は著明な変化は認められなかった。以上の結果から、CD82 は HGF 刺激による E-カドヘリン-カテニン-アクチニン-アクチン細胞骨格系シグナル伝達を制御し、細胞間接着を保持させながら細胞運動を抑制している可能性が示唆された。



(2) E-カドヘリンの裏打ちタンパク質である β -カテニンのリン酸化の亢進が E-カドヘリンの細胞間接着機能を低下させると言われている。そこで、HGF 刺激による β -カテニンのリン酸化状態およびリン酸化部位について解析するために、CD82 低発現細胞株 h1299 に CD82 を遺伝子導入した h1229/CD82 transfectant と MOCK を用いた。継代培養 12 時間後に 0.3% BSA 含有の培養液(血清非含有)で 12 時間培養した後、1分、2分、5分、10分、30分、60分間 50ng/ml HGF で刺激し、それぞれの細胞溶解液を作成した。この細胞溶解液を用いて、特異的抗リン酸化抗体(phospho- β -catenin (Ser33/37/Thr41, Thr41/Ser45, Ser552, Ser675))によりそれぞれウエスタンブロットで解析したが、明かなバンドは検出できなかった。

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 2 件)

①Kotaro Ishii, Miyuki Shimoda, Tsuyoshi Sugiura, Katsuhiko Seki, Miho Takahashi, Masakazu Abe, Ryosuke Matsuki, Yoshiko Inoue, Kanemitsu Shirasuna. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis. Int J Oncol, 38(4):921-931, 2011

査読有

DOI: 10.3892/ijo.2011.917

②丹羽 崇, 上松隆司, 堂東亮輔, 高橋美穂, 高田匡基, 丸川和也, 松尾浩一郎, 武田龍太郎, 前島信也, 古澤清文. 下顎歯肉と食道に発生した同時性重複癌の1例. 松本歯学 36:7-15, 2010

査読有

<https://mdu.repo.nii.ac.jp/index.php>

[学会発表] (計 12 件)

①丸川和也, 高橋美穂, 丹羽 崇, 秋田大輔, 千原隆弘, 篠原 淳, 各務 秀明, 上松 隆司
唾液腺癌における抗がん剤耐性獲得機構

2012年9月20日 第71回日本癌学会学術総会 札幌

②吉濱直哉, 杉浦剛, 千北さとみ, 安部正和, 高橋美穂, 今城育美, 小林洋輔, 秋本直柔, 峰真理子, 城後るみ, 白砂兼光

CD82によるsialyl Lewis 抗原を介した異種細胞間接着の制御機構

2012年9月19日 第71回日本癌学会学術総会 札幌

③丸川和也, 高橋美穂, 堂東亮輔, 丹羽 崇, 高田 匡基, 李 憲起, 篠原 淳, 各務 秀明, 上松 隆司

唾液腺癌の抗がん剤耐性獲得機構 - GST-pi/MRPの誘導により多剤耐性形質を獲得する-

2012年5月17日 第66回日本口腔科学会 広島

④丸川和也, 高橋美穂, 堂東亮輔, 丹羽 崇, 高田 匡基, 李 憲起, 篠原 淳, 各務 秀明, 上松 隆司

唾液腺癌の抗がん剤耐性獲得機構 - GST-pi/MRPの誘導により多剤耐性形質を獲得する-

2012年1月26日 第30回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 大宮ソニックシティ(埼玉)

⑤丸川和也, 上松隆司, 高橋美穂, 堂東亮輔, 丹羽 崇, 高田匡基, 李 憲起, 篠原 淳, 各務 秀明

唾液腺癌における抗がん剤多剤耐性獲得機構の解明—GST-pi/ MRP 遺伝子誘導は唾液腺癌の多剤耐性形質獲得の原因である—

2011年10月21日 第56回日本口腔外科学会 大阪・大阪国際会議場

優秀ポスター賞

⑥丸川和也, 高橋美穂, 丹羽崇, 篠原淳, 各務 秀明, 上松隆司

唾液腺癌における抗がん剤多剤耐性機構

2011年10月4日 第70回日本癌学会 名古屋・名古屋国際会議場

⑦丹羽崇, 高橋美穂, 丸川和也, 篠原淳, 各務 秀明, 上松隆司

CD82 は DPP4 遺伝子ファミリーの発現に影響を与え細胞遊走を抑制する

2011年10月3日 第70回日本癌学会 名古屋・名古屋国際会議場

⑧Niwa T, Uematsu T, Takahashi M, Li X, Nakazawa T, Sugiura T, Shirasuna K, Yamaoka M, and Furusawa K: "Tetraspanin influences cell migration and DPP IV gene expression", The IADR 88th General Session & Exhibition Barcelona, Spain 2010

⑨丹羽崇, 上松隆司, 高橋美穂, 中澤高志, 杉浦剛, 古澤清文

CD82/KAI-1 発現細胞における DPP gene family の変動

2010年10月18日 第55回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 幕張メッセ

⑩丹羽崇, 上松隆司, 高橋美穂, 中澤高志, 杉浦剛, 古澤清文

テトラスパニンは細胞遊走と DPPIV遺伝子ファミリーの発現を制御する

2010年9月22日 第69回日本癌学会学術総会 大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル 大阪

⑪丹羽 崇, 上松隆司, 高橋美穂, 中澤高志, 杉浦 剛, 古澤清文

CD82/KAI-1 発現癌細胞における DPP4 gene family の変動

2010年6月24日 第64回日本口腔科学会学術集会 札幌プリンスホテル国際館パミール

⑫千北 さとみ, 杉浦 剛, 阿部正和, 高橋美穂, 下田みゆき, 小林洋輔, 白砂兼光

CD82/KAI-1 による E-cadherin を介した癌細胞間接着の制御機構

2010年6月24日 第64回日本口腔科学会学術集会 札幌プリンスホテル国際館パミール

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 美穂(TAKAHASHI MIHO)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号:00444795

(2)研究分担者

(3)連携研究者