

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390455

研究課題名(和文) E-カドヘリンのプロセッシング抑制による口腔癌の浸潤・転移阻止療法に関する研究

研究課題名(英文) Study on the prevention therapy for the invasion and metastasis of oral cancer by the suppression of E-cadherin processing

研究代表者

林堂 安貴 (HAYASHIDO, Yasutaka)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：70243251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：2-アンチプラスミンcDNAを組み込んだプラスミドを作製し、これを口腔扁平上皮癌細胞に導入し2-アンチプラスミン蛋白の誘導を試みた。2-アンチプラスミン蛋白発現が亢進により、扁平上皮癌細胞のサイクリンD1発現は抑制され、細胞増殖能と造腫瘍能も低下した。さらに、2-アンチプラスミン蛋白の誘導により、扁平上皮癌細胞の細胞質内の  $\beta$ -カテニン発現が低下していることから、2-アンチプラスミン誘導によるE-カドヘリンのプロセッシング阻害は、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達を介した扁平上皮癌細胞の増殖を低下させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transfection of oral squamous cell carcinoma (SCC) cells with a mammalian expression vector containing 2-antiplasmin cDNA reduced cyclin D1 expression and led to the suppression of the proliferation and tumorigenicity in SCC cells. Induction of 2-antiplasmin led to the decrease in  $\beta$ -catenin expression in the cytosol of SCC cells. Therefore, the inhibition of E-cadherin processing induced by 2-antiplasmin might down-regulate the proliferation of SCC cells via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 カドヘリン プロセッシング アンチプラスミン 浸潤・転移 細胞間接着 増殖能

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療を行う上での最大の障害は遠隔臓器への転移巣形成である。我々は、プラスミノゲン/プラスミン系が細胞外基質蛋白を分解するだけではなく、E-カドヘリンを細胞間接着活性部位が存在する細胞外ドメインで切断することで、細胞間接着を抑制し細胞凝集能を低下させ、扁平上皮癌の細胞遊走を亢進していることを見だし、プラスミノゲン/プラスミン系が 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。扁平上皮癌細胞をプラスミン処理することにより、E-カドヘリンの細胞膜裏打ち蛋白である  $\beta$ -カテニンが、細胞質へ移行する所見が認められ、E-カドヘリンのプロセッシングに伴い、細胞膜から細胞質内に移動した  $\beta$ -カテニンが、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達を介して扁平上皮癌細胞の増殖にも何らかの影響を与えている可能性が推測された。さらにプラスミン阻害分子である  $\alpha 2$ -アンチプラスミンの遺伝子導入により、口腔扁平上皮癌細胞の E-カドヘリンのプロセッシングが抑制され、細胞凝集能が低下し、運動能が抑制されることを報告した。

従ってプラスミン活性の阻害は E-カドヘリンのプロセッシングを抑制し、 $\beta$ -カテニンの細胞膜上から細胞質への移行を阻害することで、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達を介した扁平上皮癌細胞の増殖を低下させ、さらに、浸潤・転移をも抑制すると推測される。 $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入により、口腔癌細胞に  $\alpha 2$ -アンチプラスミン蛋白発現を誘導することができれば、従来の治療に代わる口腔癌の新しい治療の開発につながることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本申請課題は、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子の導入により、扁平上皮癌細胞に  $\alpha 2$ -アンチプラスミン蛋白発現を誘導させることでプラスミノゲン/プラスミン系の機能を抑制し、従来の外科手術や放射線治療にかわる、口腔癌の増殖や転移を抑制するための新しい治療法を開発することを目的としている。

そのために、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入が、扁平上皮癌細胞の *in vitro* 及び *in vivo* 増殖に影響を検討した。 $\alpha 2$ -アンチプラスミンが、扁平上皮癌細胞における細胞周期調節因子のサイクリン D1 発現と細胞増殖を制御する Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達に与える影響についても解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株と培養方法

実験には舌扁平上皮癌細胞株 SCCKN を用いた。SCCKN 細胞は 5% 仔牛血清を含む RD 培地を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。継代培養は細胞が増殖飽和状態になった時点で行った。すなわち、0.05%トリプシン (Sigma) と 0.04%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウ

ム (EDTA) を含む Dulbecco's Ca, Mg-free phosphate-buffer saline (PBS) で細胞分散後、5%CS を含む RD にて洗浄し、5%CS を含む RD に浮遊させたものを培養皿に加え細胞の継代を行った。

### (2) SCCKN 細胞への $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入

哺乳動物発現ベクター pCI-neo (Promega) または pCI-neo に  $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子を組み込んだ pCI-neo/ $\alpha 2$ -antiplasmin を SCCKN 細胞にリポフェクトアミン法にて導入し、pCI-neo または pCI-neo/ $\alpha 2$ -antiplasmin が導入された細胞をそれぞれ KNmock または KN $\alpha 2$ -AP とし実験に用いた。

### (3) 間接蛍光抗体法による E-カドヘリンと $\beta$ -カテニン発現の検討

SCCKN, KNmock または KN $\alpha 2$ -AP の各細胞を LAB-TEK II Chamber Slide (Nalgen Nunc International) 上で 72 時間培養後、各濃度のプラスミノゲンを含んだ RD でさらに 12 時間培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で洗浄した。マウス抗 E-カドヘリン抗体またはマウス抗  $\beta$ -カテニン抗体で反応した後、PBS で洗浄し、それぞれ Alexa 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体または Alexa 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体で 37°C、1 時間反応させた。PBS で洗浄し、90%グリセリン/PBS で封入後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### (4) RT-PCR 法によるサイクリン D1 mRNA 発現の検討

SCCKN, KNmock および KN $\alpha 2$ -AP 細胞におけるサイクリン D1 mRNA 発現を RT-PCR 法にて検索した。用いたプライマー対はセンスプライマー: 5'-CGTGGCCTCTAAGATGAAGG-3' とアンチセンスプライマー: 5'-GGTCACACTTGATCACTCTGG-3' で、94°C; 1 分, 57°C; 1 分, 72°C; 1 分を 1 サイクルとし、20, 25 または 30 サイクルの反応を行った。なお対照遺伝子として GAPDH を用いた。遺伝子増幅産物を 1.2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロミドで染色し解析した。

### (5) $\alpha 2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞の *in vivo* 増殖能

#### ①ヌードマウスでの造腫瘍性の判定

1×10<sup>7</sup> 個の SCCKN, KNmock および KN $\alpha 2$ -AP 細胞を、4 週齢ヌードマウス (Balb/cAJCnu/nu) の背部皮下に接種し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。腫瘍体積は以下に示す計算式にて算定した。

$$\text{体積} = 1/2 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$$

なおヌードマウスを使用した一連の実験は、広島大学動物実験施設で行った。

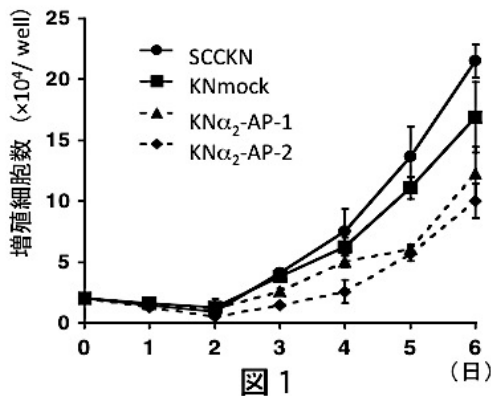
#### ②免疫組織染色

細胞接種後、28 日目に腫瘍を摘出し、ホルマリン固定しパラフィン包埋した後、E-カドヘリンと  $\beta$ -カテニン発現を検索した。4  $\mu$ m の切片を 0.3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むメタノールで切片を 30 分間反応した後、0.01M クエン酸ナトリウム (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理した。

正常ウマ血清で 37°C, 60 分間ブロッキングを行い, 抗 E-カドヘリン抗体または抗  $\beta$ -カテニン抗体で反応した後, avidin-biotin-peroxidase complex 法にて検出した. なお, 2%メチルグリーンにて対比染色を行った.

#### 4. 研究成果

無血清培地で各細胞を培養し, 経時的に増殖細胞数を算定した.  $\alpha_2$ -アンチプラスミンが高発現している  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  細胞は低い増殖能を示し, 培養 6 日目の増殖細胞数は  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP-1}$ ,  $\text{-2}$  ともに SCCKN 及び  $\text{KNmock}$  の約 1/2 であった (図 1).



各細胞におけるサイクリン D1 の遺伝子発現を RT-PCR 法で検索した. SCCKN 及び  $\text{KNmock}$  に比べ,  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  はサイクリン D1 mRNA の発現が低下していた (図 2)

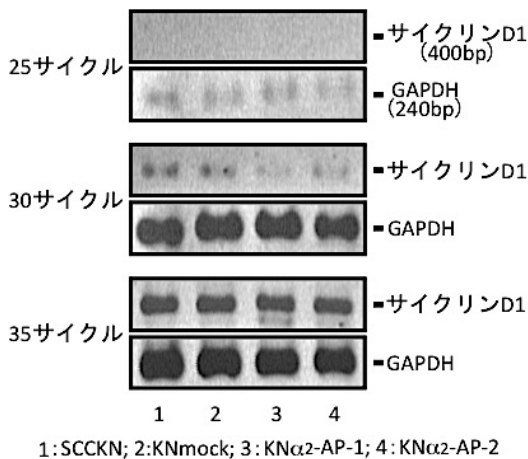


図 2

E-カドヘリンに対する間接蛍光染色の結果,  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  は SCCKN および  $\text{KNmock}$  に比べ細胞膜上での E-カドヘリンの染色性が亢進していた (図 3).

SCCKN,  $\text{KNmock}$  および  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  細胞におけまた  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  は, SCCKN および  $\text{KNmock}$  に比べ, 細胞膜で  $\beta$ -カテニンの染色性が亢進し, 細胞質で低下していた (図 4).

*in vitro* において  $\alpha_2$ -アンチプラスミン遺伝子導入細胞が SCCKN 細胞に比べ低い細胞増殖を示したことから,  $\alpha_2$ -アンチプラスミン遺伝子導入が *in vivo* での増殖能も低下さ

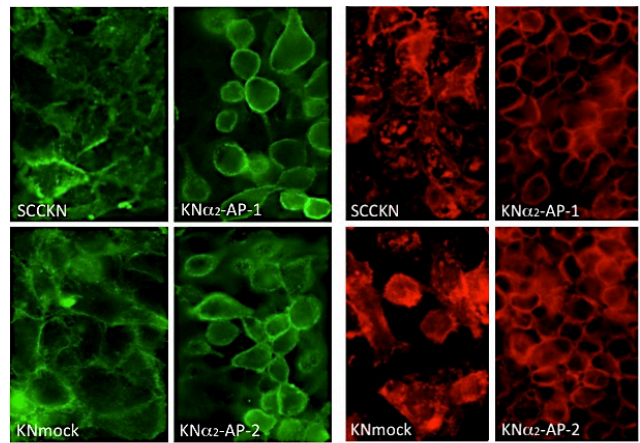


図 3

図 4

せる可能性が考えられた. そこで各細胞をヌードマウス背部皮下に移植し, 造腫瘍能および増殖能について検討した.  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  は腫瘍形成するものの腫瘍の増大を認めず, SCCKN 及び  $\text{KNmock}$  に比べ増殖能が著しく低下していた (図 5).

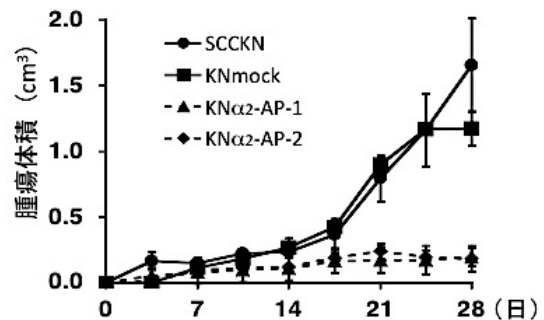


図 5

各細胞のヌードマウス形成腫瘍における E-カドヘリン及び  $\beta$ -カテニンの発現を免疫染色にて検索した.  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  腫瘍では, SCCKN 及び  $\text{KNmock}$  に比べ, 細胞膜上での E-カドヘリン発現が亢進していた (図 6). 一方,  $\beta$ カテニンは SCCKN 及び  $\text{KNmock}$  では細胞膜と細胞質に発現しているのに対し,  $\text{KN}\alpha_2\text{-AP}$  では  $\beta$ カテニンの細胞膜での発現が亢進し, 細胞質での発現が低下していた (図 7).

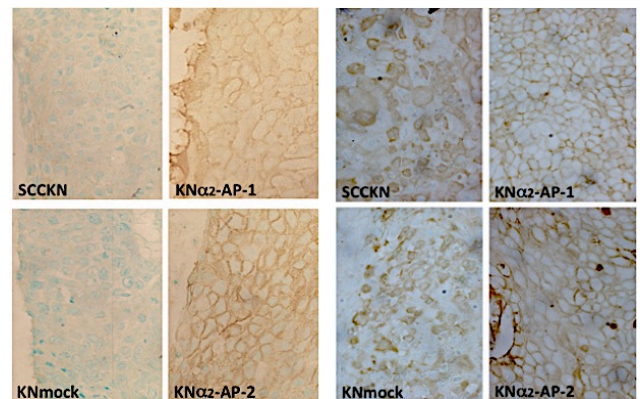


図 6

図 7

以上の所見より,  $\alpha_2$ -アンチプラスミン発現誘導によるプラスミノ-ゲン/プラスミン系の抑制は, E-カドヘリンのプロセッシング阻害することで扁平上皮癌細胞の分散能を低

下させるだけではなく、細胞増殖能や造腫瘍能を低下させることが示された。また $\alpha_2$ -アンチプラスミン発現誘導に伴い、細胞膜上の $\beta$ -カテニン発現が亢進し、細胞質内の $\beta$ -カテニン発現の低下がみられ、E-カドヘリンのプロセッシング阻害により $\beta$ -カテニンの細胞膜上から細胞質への移行が阻害され、細胞質内の $\beta$ -カテニン量が低下することでWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達が抑制され、増殖能が低下した可能性が推測された。

これらのことから、 $\alpha_2$ -アンチプラスミン発現誘導によるE-カドヘリンのプロセッシング阻害は、口腔扁平上皮癌の有用な治療法のひとつとなり得る可能性が示唆された。

#### 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 5件)

1. Shintani T, Hayashido Y, Mukasa H, Akagi E, Hoshino M, Ishida Y, Hamana T, Okamoto K, Kanda T, Koizumi K, Yoshioka Y, Tani R, Toratani S, Okamoto T, Comparison of the prognosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw caused by oral and intravenous bisphosphonates, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 査読有り, in press, 2015, doi: 10.1016/j.ijom.2015.03.013
2. Yoshioka Y, Toratani S, Nakatao, H, Koizumi K, Hayashido Y, Okamoto T, Weekly paclitaxel plus cetuximab reduces the lung metastasis of adenoid cystic carcinoma arising from the salivary gland, *Oral Science International*, 査読有り, in press, 2015
3. Hayashido Y, Kitano H, Sakaue T, Fujii T, Suematsu M, Sakurai S, Okamoto T, Overexpression of integrin  $\alpha v$  facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin  $\alpha v \beta 8$  with type I collagen, *Int J Oncol*, 45(5), 査読有り, 1875-1882, 2014, doi:10.3892/ijo.2014.2642
4. Rosli SN, Shintani T, Hayashido Y, Toratani S, Usui E, Okamoto T, 1 $\alpha$ , 25(OH)D<sub>3</sub> down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression via NF- $\kappa$ B pathway, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 査読有り, 136, 2013, 98-101. doi: 10.1016/j.jsmb.2012.10.011
5. Yamasaki S, Nabeshima K, Sotomaru Y, Taguchi Y, Mukasa H, Furue MK, Sato JD, Okamoto T, Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free defined medium, *Int J Dev Biol*. 査読有り, 57(9-10), 2013, 715-724, doi:

10.1387/ijdb.130173to

[学会発表] (計 12件)

1. 末松美玲, 林堂安貴, 坂上泰士, 藤井隆彦, 岡本哲治, 扁平上皮癌細胞における sequestome 1 を介した選択的オートファジーによるインテグリン $\alpha v$ の蛋白翻訳後修飾, 第51回日本口腔組織培養学会学術大会, 2014.11.15, 九州歯科大学(北九州市)
2. 末松美玲, 林堂安貴, 坂上泰士, 藤井隆彦, 岡本哲治, 扁平上皮癌細胞でのオートファジーによるインテグリン $\alpha v$ のプロセッシング, 第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2014.5.7-9, 京王プラザホテル(東京都)
3. 末松美玲, 林堂安貴, 坂上泰士, 藤井隆彦, 岡本哲治, Processing of integrin  $\alpha v$  subunit by autophagy in squamous cell carcinoma cells, Hiroshima University The 3rd International Symposium, 2014年2月15日, 16日, 国際会議場)
4. 末松美玲, 林堂安貴, 坂上泰士, 藤井隆彦, 岡本哲治, 扁平上皮癌細胞でのオートファジーによるインテグリン $\alpha v$ のプロセッシング, 第50回日本口腔組織培養学会, 2013年11月20日, 日本歯科大学(東京都)
5. Taishi Sakaue, Yasutaka Hayashido, Tomoaki Hamana, Takahiko Fujii, Tetsuji Okamoto, Post-translational modification of integrin  $\beta 8$  by ubiquitin-proteasome system in oral squamous cell carcinoma cell lines, 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2013年10月12日, 広島国際会議場(広島市)
6. 坂上泰士, 林堂安貴, 浜名智昭, 藤井隆彦, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン/プロテアソーム系によるインテグリン $\beta 8$ の翻訳後修飾, 第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2013年5月24日, 栃木県総合文化センター(宇都宮市)
7. 藤井隆彦, 林堂安貴, 浜名智昭, 坂上泰士, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるインテグリン $\beta 6$ サブユニットの安定化に与える $\alpha v$ サブユニットとの二量体形成の影響, 第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2013年5月24日, 栃木県総合文化センター(宇都宮市)
8. Analysis of binding site of ubiquitin ligase, human double minute 2 in integrin  $\beta 8$  in Oral Squamous Cell Carcinoma cell lines, Taishi Sakaue, Yasutaka Hayashido, Tomoaki Hamana, Takahiko Fujii, Tetsuji Okamoto, 第2回放射線災害復興を推進するフェニックスリーダ育成プログラム国際シンポジウム, 2013年2月11日, 広島国際会議場(広島市)

9. Analysis of binding site of ubiquitin ligase, human double minute 2 in integrin beta8, 坂上泰士, 林堂安貴, 浜名智昭, 藤井隆彦, 岡本哲治, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日, ロイトン札幌 (札幌市)
10. インテグリン $\alpha v$ サブユニットとの二量体形成が $\beta 8$ サブユニットの安定化に与える影響, 坂上泰士, 林堂安貴, 浜名智昭, 藤井隆彦, 岡本哲治, 第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2012年5月18日, 広島国際会議場 (広島市)
11. 藤井隆彦, 林堂安貴, 浜名智昭, 坂上泰士, 岡本哲治, インテグリン $\beta 8$ におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2(hdm2)結合部位の探索, 第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2012年5月18日, 広島国際会議場 (広島市)
12. 藤井隆彦, 林堂安貴, 坂上泰士, 浜名智昭, 岡本哲治, インテグリン $\beta 8$ におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2(hdm2)結合部位の探索, 第49回日本口腔組織培養学会学術大会, 2012年11月17日, 広島大学 (広島市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：70243251

##### (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・教授  
研究者番号：00169153

新谷 智章  
広島大学・病院・助教  
研究者番号：90403518

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：