

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06434

研究課題名(和文) p62を介した選択的オートファジー誘導による口腔癌転移阻止療法の開発に関する研究

研究課題名(英文) A study to processing of integrin alpha v subunit by autophagy in squamous cell carcinoma cell

研究代表者

松岡 美玲(末松美玲)(Matsuoka, Mirei)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：10760415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、p62による選択的オートファジー亢進させ、扁平上皮癌細胞のインテグリン $\alpha$ v分解を誘導することで $\alpha$ v発現を低下させ、その結果、口腔癌の増殖や浸潤、転移を阻止する新しい口腔癌治療法を開発することを目的として、口腔癌扁平上皮癌細胞におけるインテグリン $\alpha$ vの蛋白翻訳後修飾について検討した。口腔扁平上皮癌においてインテグリン $\alpha$ vはオートファジーの抑制により発現量が増加したことから、オートファジーによる蛋白翻訳後修飾の可能性が示唆された。また、扁平上皮癌細胞においてインテグリン $\alpha$ v発現量とp62発現量は相関しているとともに、p62は細胞増殖、生存に必要な分子であることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a novel method for treating oral cancer that inhibits the proliferation, invasion and metastasis of oral cancer. It promotes selective autophagy by p62 and induces integrin  $\alpha$ v degradation of squamous cell carcinoma cells, thereby lowering  $\alpha$ v expression. We investigated the posttranslational modification of integrin  $\alpha$ v in oral cancer squamous cell carcinoma cells with the aim of developing a new oral cancer treatment method to prevent oral cancer cancer growth, invasion and metastasis. In oral squamous cell carcinoma, the expression level of integrin  $\alpha$ v increased due to suppression of autophagy, suggesting the possibility of post-translational modification by autophagy. It was also suggested that the expression level of integrin  $\alpha$ v and the expression level of p62 are correlated in squamous cell carcinoma cells and that p62 is a molecule necessary for cell proliferation and survival.

研究分野：外科系歯学

キーワード：歯学 癌

## 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。口腔扁平上皮癌は、早期から頸部リンパ節に転移することが多く、外科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、転移巣形成により予後不良となる症例が多く見受けられる。従って、口腔癌の浸潤・転移を阻止することにより、口腔癌治療成績の更なる向上が期待できる。

インテグリンは  $\alpha$  と  $\beta$  のサブユニットでヘテロ二量体を構成し、細胞膜上で細胞の細胞外基質への接着や細胞遊走を制御している。申請者の研究室では、インテグリン  $\alpha$  V が活性型 MMP-2 の細胞膜上への結合因子として機能していることを報告した (Int.J.Oncol. 2003)。さらに、 $\alpha$  V が MAP キナーゼシグナル伝達系を介して口腔扁平上皮癌細胞の増殖を制御している (図 1) ことを見いだした (Int.J.Oncol. 2014)。これらの結果から、 $\alpha$  V 発現の抑制は、口腔癌細胞の運動能や蛋白分解活性を低下させ、がんの浸潤・転移の抑制につながると推測された。

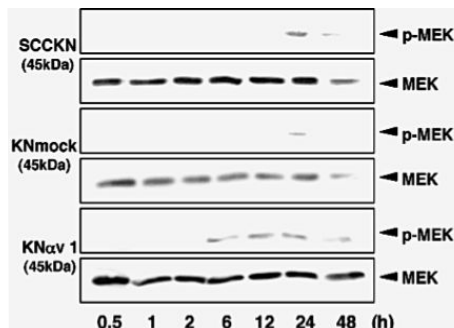


図1. I型コラーゲンによって誘導されるMAPキナーゼカスケードの活性化

インテグリン $\alpha$ V遺伝子が導入された扁平上皮癌細胞 KN $\alpha$ Vは、I型コラーゲンゲル上で培養すると、Mekがすみやかにリン酸化された。

## 2. 研究の目的

申請者は、これまでに扁平上皮癌細胞のインテグリン  $\alpha$  V が、タンパク翻訳後にオートファジー/リソソーム系にて分解されることを見いだした (図 2)。さらに、 $\alpha$  V 抗体と p62 抗体を用いた共免疫沈降法により、扁平上皮癌細胞中のインテグリン  $\alpha$  V が p62 と複合体形成を示唆する所見を得ている (図 3)。

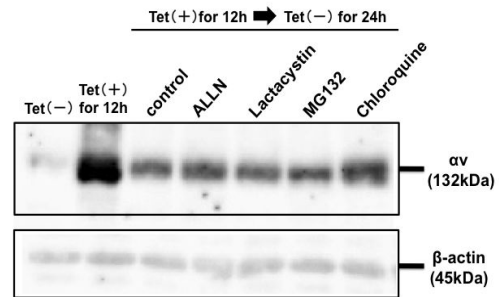


図2 扁平上皮癌細胞株A431において、テトラサイクリン誘導システムで一過性に発現誘導させたインテグリン $\alpha$ V (Tet (+))は、テトラサイクリン非存在下 (Tet(-)) では発現が低下したが、リソソーム阻害剤クロロキニン添加により、発現低下は抑制された。

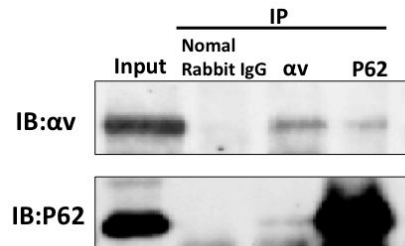


図3 共免疫沈降法によるインテグリン $\alpha$ Vとp62との複合体形成の解析。扁平上皮癌細胞の細胞溶解液を、 $\alpha$ V抗体またはP62抗体を用いて免疫沈降した標品中に、P62またはインテグリン $\alpha$ Vが検出されたことから、 $\alpha$ Vとp62は複合体を形成することが示唆された。

細胞内の主要なタンパク分解機構の一つであるオートファジー/リソソーム系は、隔離膜と呼ばれる膜区画によって、細胞質やオルガネラ等の蛋白質を取り囲むことにより形成されるファゴソームに、リソソームが融合することでオートファゴソーム内の蛋白質を非特異的に分解する。オートファジー/リソソーム系は、従来は非特異的なバルク分解を行う機構と考えられてきたが、近年、選択的に、特定のたんぱく質をファゴソーム内で分解する選択的オートファジー機構の存在が明らかになってきた。選択的オートファジーは、標的蛋白にアダプター蛋白が結合することで、標的蛋白が、選択的にファゴソームに取り込まれ分解される機構で、代表的なアダプター蛋白として p62 が知られている。

申請者は、図 3 に示したようにインテグリン  $\alpha$  V がアダプター蛋白 p62 と複合体形成する可能性が示唆された研究結果から、扁平上皮癌細胞において、インテグリン  $\alpha$  V はタンパク翻訳後に、p62 を介し

た選択的オートファジーによる分解等の修飾を受け、機能発現しているという仮説を考えている。従って、扁平上皮癌細胞において、インテグリン  $\alpha 5$  のオートファジーを誘導することは、口腔癌転移を促進するインテグリン  $\alpha 5$  発現を抑制し、その結果、口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能や浸潤能を低下させ癌の転移を抑制すると推測される。

本研究は、p62 による選択的オートファジー亢進させ、扁平上皮癌細胞のインテグリン  $\alpha 5$  分解を誘導することで  $\alpha 5$  発現を低下させ、その結果、口腔癌の増殖や浸潤、転移を阻止する新しい口腔癌治療法を開発することを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) これまでにインテグリン  $\alpha 5$  発現を誘導した扁平上皮癌細胞株において、インテグリン  $\alpha 5$  はタンパク翻訳後にオートファジー/リソソーム系にて分解されることを見出しているが、口腔扁平上皮癌細胞株内在性のインテグリン  $\alpha 5$  の分解系については不明である。そこで口腔扁平上皮癌細胞株において、インテグリン  $\alpha 5$  がオートファジーによる修飾を受けているかを検討するため、オートファジー抑制によるインテグリン  $\alpha 5$  発現への影響について検討した。また、それらの口腔扁平上皮癌細胞株における P62 発現についても比較した。(2) また、選択的オートファジーのアダプター分子である p62 タンパクによる扁平上皮癌細胞の増殖能に与える影響を検討するため、siRNA による p62 発現抑制が、扁平上皮癌細胞の増殖能に与える影響について検討した。(3) 選択的アダプター分子である p62 を介したオートファジーが、インテグリン  $\alpha 5$  の発現に関与しているか検討するため、p62 発現誘導し、口腔扁平上皮癌細胞のインテグリン  $\alpha 5$  発現に与える影響について検討した。

### 4. 研究成果

(1) オートファジー抑制が口腔癌扁平上皮癌細胞のインテグリン  $\alpha 5$  発現に与える影響についての検討

インテグリン  $\alpha 5$  が高発現している口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22、NA の 2 株は、リソソーム阻害剤クロロキンを添加してもインテグリン  $\alpha 5$  発現量に変化は認めなかったが、インテグリン  $\alpha 5$  が低発現である口腔扁平上皮癌細胞株 KN ではクロロキン添加によってインテグリン  $\alpha 5$  の発現増加を認めた。また、インテグリン  $\alpha 5$  が高発現している口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22、NA の 2 株は、インテグリン  $\alpha 5$  が低発現である口腔扁平上皮癌細胞株 KN と比較し、p62 の発現量は低下していた。これよりインテグリン  $\alpha 5$  低発現口腔扁平上皮癌細胞株においてインテグリン  $\alpha 5$  はオートファジーにより蛋白翻訳後修飾を受けている可能性が示された。またインテグリン  $\alpha 5$  発現と P62 発現は相関していることが示唆され、オートファジー阻害により、インテグリン  $\alpha 5$  の発現量に変化を認めなかったことから、インテグリン  $\alpha 5$  高発現扁平上皮癌細胞株においてインテグリン  $\alpha 5$  はオートファジーによる蛋白翻訳後修飾の影響を受けていないことが示唆された。

(2) siRNA による p62 発現抑制が、扁平上皮癌細胞の増殖能に与える影響についての検討

インテグリン  $\alpha 5$  が高発現している扁平上皮癌細胞に p62 siRNA を用いて P62 発現を抑制したところ、細胞増殖は著しく抑制され、多くの細胞が死滅した。これより、インテグリン  $\alpha 5$  高発現の扁平上皮癌細胞株において、p62 は細胞の増殖と生存に必須であることが示唆された。

(3) p62 発現誘導が、口腔扁平上皮癌細胞

のインテグリン  $\alpha$  v 発現に与える影響の検討

哺乳細胞発現ベクター-pCI-neo に p62 を組み込んだ pCI-neo/p62 を作成し .リポフェクタミン法にて口腔扁平上皮癌細胞 KN に pCI-neo/p62 を導入し ,p62 高発現扁平上皮癌細胞株を分離した .P62 高発現扁平上皮癌細胞ではインテグリン  $\alpha$  v の発現に変化は見られなかった .これより p62 はインテグリン  $\alpha$  v 低発現細胞においてはインテグリン  $\alpha$  v の発現には影響を与えていないことが示唆された .

インテグリン  $\alpha$  v が高発現している口腔扁平上皮癌細胞はインテグリン  $\alpha$  v が低発現である口腔扁平上皮癌細胞株と比較し ,増殖能 ,運動能 ,浸潤能のいずれも高いことが報告されている .この研究では口腔扁平上皮癌細胞株においても ,インテグリン  $\alpha$  v はオートファジーによる修飾を受けている可能性が示唆され ,インテグリン  $\alpha$  v と p62 の蛋白量に相関があったことから ,インテグリン  $\alpha$  v は p62 を介した選択的オートファジーにより調整されている可能性がある .選択的オートファジーを介した口腔癌の増殖や浸潤 ,転移を阻止する新しい口腔癌治療法の開発を目指していきたいと考えている .

## 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 0 件 )

〔学会発表〕 ( 計 3 件 )

1. 歯科治療の周術期麻酔管理での Rett 症候群患者に対する行動調整 : 向井明里 , 向井友宏 , 高橋珠世 , 好中大雅 , 小田綾 , 末松美玲 , 吉田啓太 , 吉田充広 , 入船正浩 第 33 回一般社団法人

日本障害者歯科学会総会学術集会  
2016.10.2 ( 埼玉県 , ソニックシティ )

2. 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖に与える HDM2 の影響 : 津島 康司 , 末松美玲 , 林堂 安貴 , 岡本 哲治 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2016.4.17 ( 福岡県 , 福岡国際会議場 )
3. 口腔扁平上皮癌組織におけるインテグリン  $\alpha$  v 及び  $\beta$  8 発現の免疫組織学的解析 : 櫻井 繁 , 林堂 安貴 , 吉岡 幸男 , 浜名 智昭 , 坂上 泰士 , 末松美玲 , 岡本 哲治 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2016.4.17 ( 福岡県 , 福岡国際会議場 )

〔図書〕 ( 計 0 件 )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 美玲 ( MATSUOKA MIREI )  
広島大学・病院 ( 歯 ) ・ 歯科診療医

研究者番号 : 10760415