

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01602

研究課題名(和文) カテニンを介したカドヘリン複合体ならびにWnt経路制御による癌転移抑制薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of cancer metastasis inhibitor by controlling cadherin complex and Wnt pathway via catenin

研究代表者

丹沢 秀樹 (Tanzawa, Hideki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50236775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究において、細胞接着機構を制御する遺伝子群(ALY、GAD1、KLK13、HTR2C)と各遺伝子に対する阻害剤(ミルタザピン、3MPA、ルボキシスタウリン、クロロゲン酸)を転移抑制候補薬剤として同定した。本研究では、この遺伝子群の発現抑制剤および転移抑制剤を用いて細胞株およびマウスモデルにて転移実験を行い効果を確認した。発現抑制剤の結果に加えて、転移抑制剤を作用させた癌細胞株では癌浸潤能が低下していた。さらに、担癌マウスの腹腔内に転移抑制剤を投与したところ、有意に癌転移を抑制した。したがって、本研究結果から、我々の同定した転移抑制剤が臨床腫瘍学的に有効な手段となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌転移の抑制が実現すれば飛躍的な癌治療成績の向上が期待できるが、この現在の最重要課題に関し、有効な薬剤は未だ開発されていない。本研究では、口腔扁平上皮癌、腺癌、悪性黒色腫に対して転移抑制候補薬剤(クロロゲン酸、ルボキシスタウリン、3MPA、ミルタザピン)を同定しin vivoの転移抑制実験まで行った。クロロゲン酸、ルボキシスタウリン、3MPA、ミルタザピンに関して、組織への転移に関して有意な差を認めた。これらの薬剤は実際の臨床で癌以外の疾患で用いられている薬剤であるため、人体に対する安全性が高く、臨床応用の可能性が高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously identified the cell adhesion-related genes (ALY, GAD1, KLK13, and HTR2C) and their specific inhibitors (mirtazapine, mercaptopropionic acid, ruboxistaurin, and chlorogenic acid) as candidate drugs for anti-metastasis. In this study, we investigated the tumor metastasis activities in vitro and in vivo using the knockdown of adhesion-related genes and the specific inhibitors. In addition to the data of transfectants, invasion and migration activities were significantly reduced after treatment of cancer cell lines with the inhibitors. Furthermore, lower metastatic capacity to other organs was observed in the cancer-transplanted mice after peritoneal injection with the inhibitors. Therefore, our results suggested that the specific inhibitors of cell adhesion-related genes would be novel therapeutic agents for clinical cancer research field.

研究分野：分子生物学

キーワード：口腔扁平上皮癌 ALY GAD1 HTR2C KLK13 catenin Wnt Cadherin

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【研究開始当初背景と研究実績】 癌転移の抑制が実現すれば飛躍的な癌治療成績の向上が期待できるが、この現在の最重要課題に関し、有効な薬剤は未だ開発されていない。煩雑な手続きを要し、特定の施設でしか行えない高価な治療法ではなく、世界中どここの施設でも容易に使用できる安価な治療法として薬剤を開発することが、多くの癌患者を救うためには必要であると考え、**drug repositioning** の手法も取り入れ、臨床応用できる薬剤を開発してきた。特に、抗癌剤耐性克服薬 2 種類、放射線耐性克服薬 1 種類を開発し、前臨床試験を終了し、特許申請・取得をした。抗癌剤耐性克服薬に関しては臨床試験により実際の患者での有効性を確認した。このような経緯で、癌の転移機構の解明と転移抑制薬の開発を、現在重点的に行っている。

【先行研究】 原発巣からの癌細胞の遊離には、**cadherin** 複合体、**desmosome** などの細胞接着機構の抑制が重要な役割を果たしているが、細胞接着機構の相互作用や **Wnt** 経路、**CD82** なども含めての癌転移機構が総合的に検討されたことはなかった。また、これらの転移機構を制御して癌の転移を抑制・予防する薬剤の開発を行った研究も見当たらない。私達は、平成 28 年度で終了した科学研究費補助金を得て、口腔扁平上皮癌における **β catenin** を中心としたシグナル伝達系を解析し、細胞接着因子である細胞接着機構のうち、**cadherin** 複合体と **desmosome** の制御機構に関する詳細な研究を行い、以下の成果を得た。細胞接着機構の主要な因子は、次頁に示す図 1 のように **β catenin** が「扇の要」の役割を果たす網の目のようなネットワーク関係を持っている。このネットワークを構成する以下に示す 5 種類のカスケードに関し、個々のカスケードによる細胞接着機構の抑制(**mutation** のような構造異常ではなく、**epigenetics** な発現制御)が癌転移と強く相関していることを報告し、各々の細胞接着機構を制御する可能性がある数種類の候補薬剤を検索・同定した(次頁表 1、成果 1~4 を示す)。さらに、各カスケードに関して、表 1 に示した薬剤の他に、多数の細胞接着機構の制御薬候補を検索同定した。

- 1.HTR2C-Lin7C-CASK-β catenin-cadherin カスケード制御 (成果 1：作用薬同定済)
- 2.GAD1 の β catenin リン酸化阻害による Wnt 経路制御 (成果 2：作用薬同定済)
- 3.Aly→RRP18-CD82 カスケード (成果 3：作用薬同定済)
4. KLK13→Desmosome 全構成成分
(junctionplkglobin, Plakophilin4, Desmocolin2, Desmoglein3, Desmoplakin) カスケード
(成果 4：作用薬同定済)
- 5.KLK13→Cadherin 全構成成分(E-cadherin, α catenin, β catenin)カスケード (成果 4：作用薬同定済)

これらの薬剤の多くは、実際の臨床で、癌以外の疾患で用いられている薬剤であるため、人体に対する安全性が高く、臨床応用の可能性が高いものと考えられる。

2. 研究の目的

以下の項目を総合的に検討し、臨床で使用できる癌転移抑制薬候補を同定する。

- ①上記カスケードとネットワークを介する制御機構が、扁平上皮癌だけでなく、腺癌、肉腫、悪性黒色腫など多種類の腫瘍に関しても作動していることを確認する。
- ②本ネットワークによる各カスケード間の相互作用(影響)を明らかにする。
- ③各カスケードに関して独自に同定した制御薬剤の機能と効果を評価する。
- ④各制御薬の毒性試験、適正用量検討試験を実施する。

以上の結果を総合的に検討し、網目のように複雑な細胞接着システムが癌細胞でどの様に機能しているかを総合的に明らかにし、癌転移を抑制する薬剤を検索・同定する。

表 1. 各カスケード制御薬 (先行研究による独自の成果)

標的分子	薬剤	想定されるメカニズム
成果 1 Lin7C	ミルタザピン (抗うつ薬)	Lin7C/CASK/b-catenin経路を活性化 (Uzawa et al., Sci Rep, 2014)
成果 2 GAD1	メルカプトプロピオン酸	b-catenin核内への移行を抑制 (Kimura et al., BMC Cancer, 2013)
成果 3 ALY	ルボキシスタウリン (糖尿病性網膜症薬) エンガスタウリン (悪性リンパ腫薬) クロゲン酸 (血糖値上昇抑制、肝疾患予防)	RRP1BからCD82へのシグナルを活性化してこれらの発現を亢進させて転移を抑制(Saito et al., J Cancer Res Clin Oncol, 2013)
成果 4 KLK13	カリクレイン錠 (高血圧、末梢循環不全治療薬)	Cadherin 複合体とDesmosomeの全構成タンパク産生を促進させ細胞接着の安定化 (Ishige et al., Mol. Carcinog. 2014)

表 2. 関連遺伝子一覧

番号	遺伝子	target gene
1	ALY	
2	GAD1	
3	HTR2C	
4	Lin7C	
5	KLK13	
6	Wnt3A	細胞外分泌糖タンパク。主にβ-catenin経路を活性化する。
7	α-catenin β-catenin	α-cateninと共にcadherinに結合する分子。Wnt/β-catenin経路に参与する。
8	MMP2	ECM分解酵素(基底膜を選択的に分解)線維芽細胞産生
9	MMP7	ECM分解酵素(悪性腫瘍で高発現し、浸潤および血管新生を促進) (活性化されたMMP7はMMP2とMMP9チモージェン(不活性な酵素前駆体)を活性化) (癌細胞間接着を促進、転移のため癌細胞凝集を誘導)
10	MMP9	ECM分解酵素(基底膜を選択的に分解)好中球マクロファージ産生
11	Axin2	Wntシグナル伝達経路におけるβ-cateninの安定性の調節
12	E-cadherin	細胞接着分子 上皮細胞で高発現する。癌細胞ではEMTの際に発現減弱する。裏打ちはアクチン線維。
13	Desmosome 関連	junction plkglobin, Plakophilin4, Desmocolin2, Desmoglein3, Desmoplakin
14	RRP1B	ALYの想定される下流遺伝子
15	CD82	ALYの想定される下流遺伝子

3. 研究の方法

扁平上皮癌細胞株、腺系癌、肉腫、悪性黒色腫などの細胞株を用いて以下の実験を行う。

- (1) 各カスケードの制御遺伝子の shRNA 導入により、形質転換細胞を作製する。
- (2) *in vitro* の解析として各種癌細胞と上記形質転換細胞を用いて invasion assay と migration assay を行い、細胞移動性と浸潤能を評価する。
- (3) 各形質転換細胞において細胞接着機構の活性がどの様に変化しているかを real time PCR 法で調べる。
- (4) 遺伝子間の相互作用として β -catenin の核内移行の検証を行い、細胞接着機構へどのような影響を与えるのかをタンパクレベルで調べる。
- (5) *in vivo* の解析としてマウスでの癌転移実験を行う。移植一定期間後に各臓器を取り出し、肉眼病的に転移の有無を判定するだけでなく、ヒト Alu 配列を用いてマウス各臓器にヒト癌細胞が転移しているかどうかを調べる。
- (6) 絞り込んだ薬剤に関して前臨床試験（至適濃度決定、毒性実験）を行う。
- (7) 転移抑制候補薬剤（ミルタザピン、メルカプトプロピオン酸：3MPA、ルボキシスタウリン、クロロゲン酸、カリクレイン）を用いて、invasion assay と migration assay を行い、細胞移動性と浸潤能を評価する。
- (8) 転移抑制候補薬剤に関し *in vivo* でマウスでの転移実験により、細胞接着システム全体を有効に制御し、強力に癌転移を抑制する臨床応用が可能な薬剤を絞り込む。

4. 研究成果

- (1) 各カスケードの制御遺伝子の形質転換細胞を作製する。
口腔扁平上皮癌細胞株（SAS, SAS-H1）、腺癌細胞株（A549）、悪性黒色腫細胞株（A2058）を用いて、各カスケードの制御遺伝子（HTR2C, GAD1, ALY, KLK13）の形質転換細胞株を樹立した。
- (2) *in vitro* の解析として、各種癌細胞とその上記形質転換細胞を用いて、invasion assay と migration assay を行い、細胞移動性と浸潤能を評価する（図1、図2）。

図1

<invasion assay>

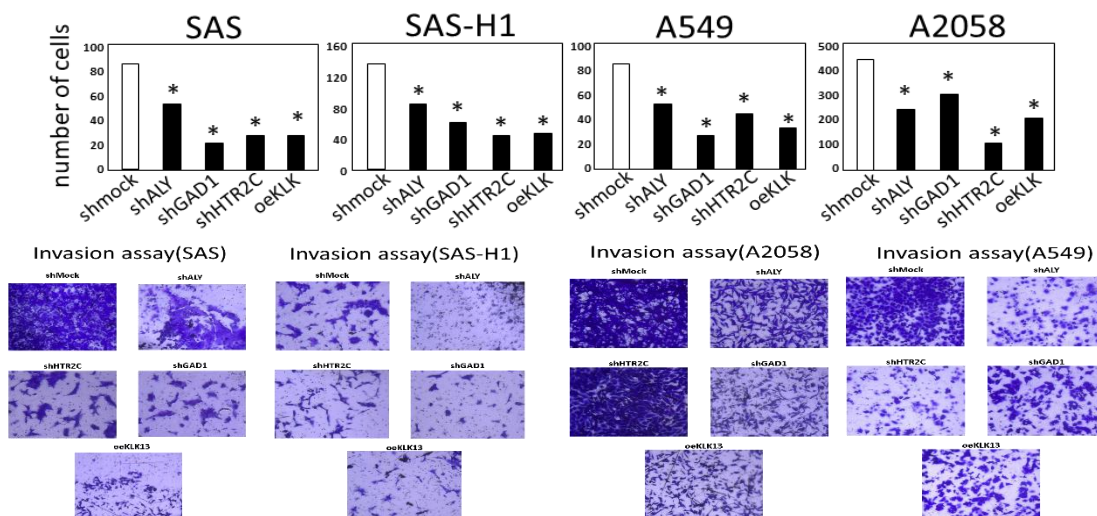
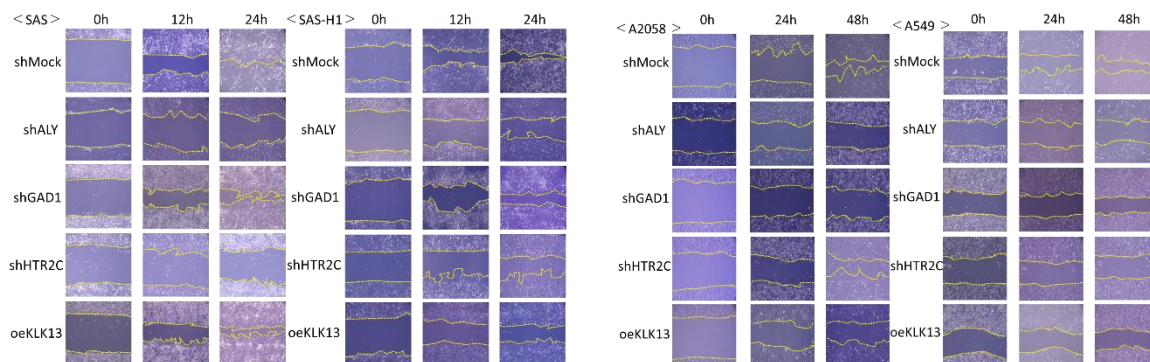


図2

<migration assay>

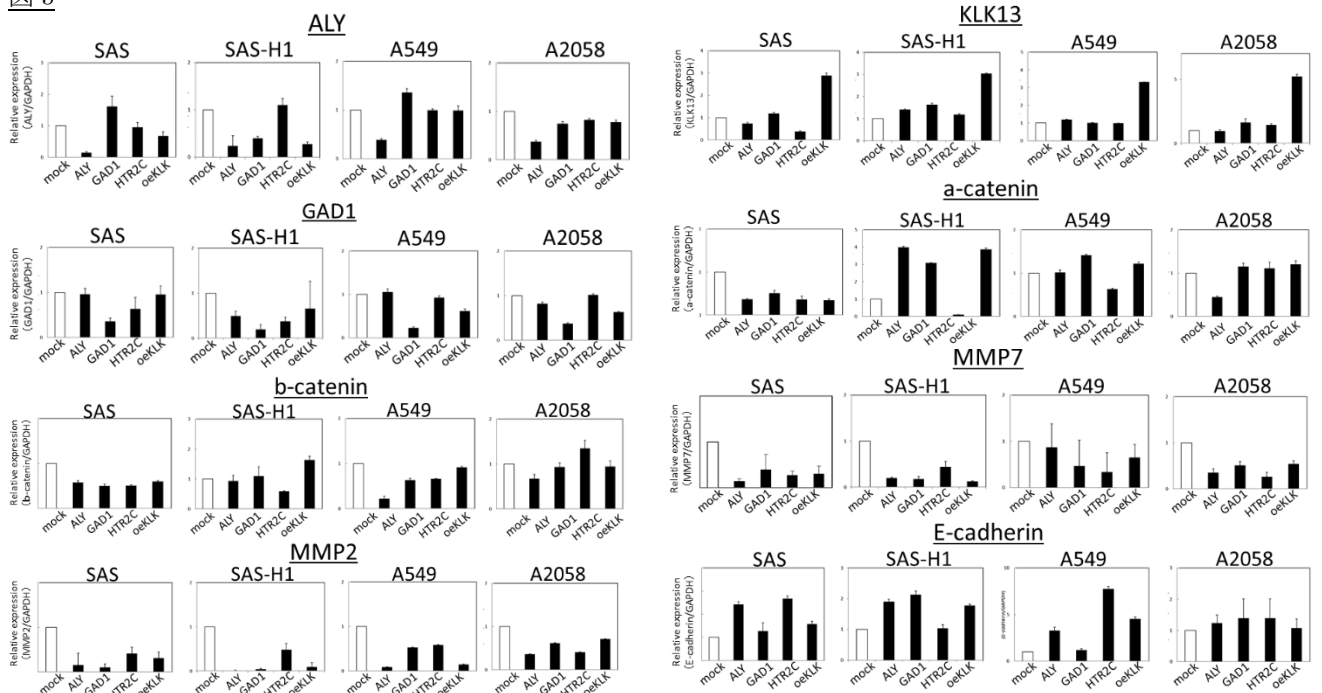


shmock と比較して shALY, shGAD1, shHTR2C, oeKLK13 において 24 時間後の浸潤能、遊走能の有意な低下を認めた。

- (3) 各形質転換細胞において、上記細胞接着機構（構成遺伝子と target genes）の活性が

どの様に変化しているかを real time PCR 法で調べる。(図 3)

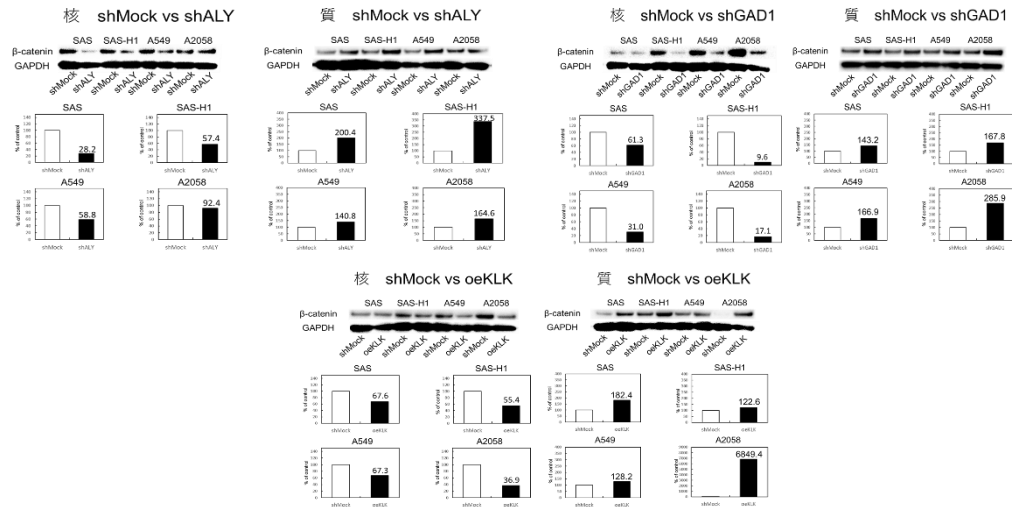
図 3



各形質転換細胞において、MMP2、7 の発現が低下し、E-カドヘリンの発現が上昇していた。

(4) 遺伝子間の相互作用として β -catenin の核内移行の検証を行い、細胞接着機構へどのような影響を与えるのかを Western Blotting 法で調べる (図 4)。

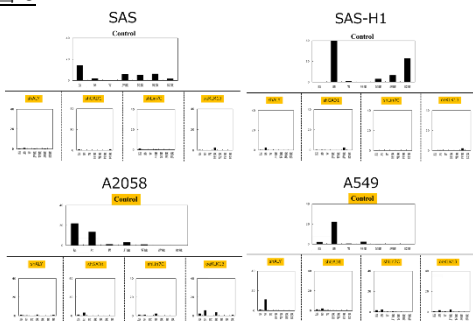
図 4



コントロールと比較して shALY、shGAD1、shHTR2C、oeKLK13 において、 β catenin の発現上昇を認めた。

(5) in vivo の解析として、作製した形質転換細胞株を用いてマウスでの癌転移実験を行う。移植一定期間後 (約 1 月後) に、各臓器を取り出し、肉眼病的に転移の有無を判定し、ヒト Alu 配列を用いてマウス各臓器にヒト癌細胞が転移しているかどうかを調べる (図 5)。

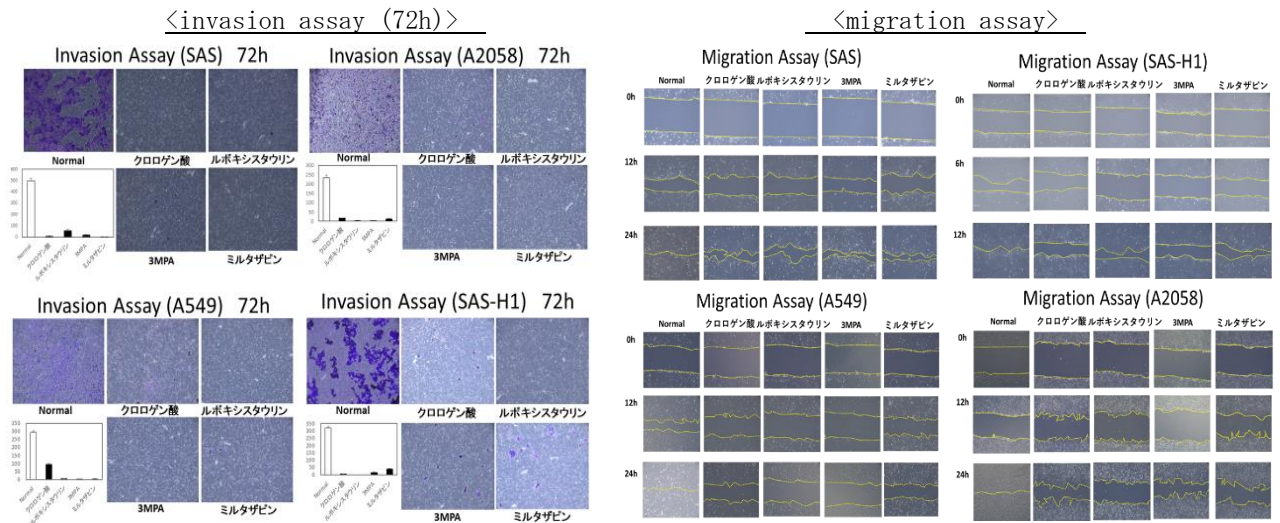
図 5



コントロールと比較して shSLY、shGAD1、shHTR2C、oeKLK13 のマウスにおいて組織への転移が抑制された。

(7) 転移抑制候補薬剤を用いて、invasion assay と migration assay を行い、細胞移動性と浸潤能を評価する (図 7)。

図 7



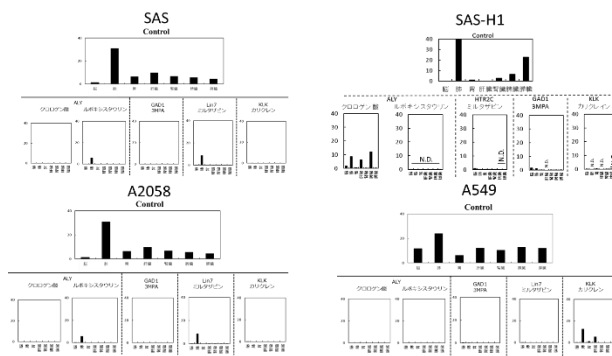
各種転移抑制候補薬剤用いて normal と比較して各種転移抑制候補薬剤を用いると一定時間後の浸潤能、遊走能の有意な低下を認めた。

(8) 転移抑制候補薬剤に関し in vivo でマウスでの転移実験により、細胞接着システム全体を有効に制御し、強力に癌転移を抑制する臨床応用が可能な薬剤を絞り込む(図 8)。

薬剤の投与は以下の通りに行った。

- ・ルボキシスタウリン 10 mg/kg/day (経口)
- ・ミルタザピン 10 mg/kg/day (経口)
- ・3MPA 17.5mg/kg/week (腹腔内)
- ・クロロゲン酸 30 mg/kg/day (皮下)
- ・カリクレイン 50 mg/kg/week (経口)

図 8



normal のマウスと比較して薬剤を投与したマウスにおいて、組織への転移が抑制された。

これらの結果を踏まえると、クロロゲン酸、ルボキシスタウリン、3MPA、ミルタザピンに関して、有意な差を認めた。今後、臨床応用も可能な薬剤の候補と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 洋右 (Sakamoto Yoshuke) (50451745)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	皆川 康之 (Minakawa Yahshuyuki) (30639787)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	
研究分担者	小河原 克訓 (Ogawara Katsunori) (20372360)	千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員 (12501)	
研究協力者	安西 尚彦 (ANZAI NAOHIKO) (70276054)		