

## 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 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390531

研究課題名（和文）

Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワーク制御による癌転移・浸潤抑制法

研究課題名（英文）

A novel method for inhibiting cancer metastasis and invasion by regulating the Lin7C-CASK- $\beta$ catenin-network.

研究代表者

坂本 洋右 (SAKAMOTO YOSUKE)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50451745

研究成果の概要（和文）：

本研究は、癌の浸潤・転移に重要な役割を果たす Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワークを制御し、臨床的に応用可能な固形癌の転移と浸潤の抑制法を開発することを目的とする。口腔扁平上皮癌細胞株において Lin7C を強制発現させると、Lin7C とネットワークを形成する各遺伝子が、連動した発現動態を示すことを確認した。また、本ネットワークの上流に位置する HTR2C (5HT2C) の阻害剤が Lin7C を介した癌の転移・浸潤のメカニズムに深く関与していることが分かり、今後の癌転移・浸潤の抑制治療への有用性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to develop a new method of inhibiting the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) through the activating Lin7C-CASK- $\beta$ catenin (LCB) pathway. In Lin7C-overexpressed OSCC cells, CASK and  $\beta$ catenin levels are significantly higher than that in Mock-transfected cells. In addition, we identified HTR2C in some molecules of upstream of LCB pathway by the Ingenuity Pathway Analysis. We demonstrated that the specific HTR2C inhibitor closely related to LCB pathway, and therefore might be a therapeutic tool for cancer invasion and metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年	2,700,000	810,000	3,510,000
年			
年			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：(1)浸潤転移能、(2)Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワーク、(3)HTR2C 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍の浸潤や転移には様々な細胞接着因子が関与していることが報告されているが、そのメカニズムは完全には解明されていないのが現状である。我々はプロテオミクス解析により、リンパ節転移症例と非転移症例との間で発現変動が認められる分子・Lin7Cを同定した。Lin7Cに關与するネットワークの機能解析を行い、転移のメカニズムを解明することが可能ならば、分子標的治療の応用による癌転移抑制法の開発にとって非常に有用と考えた。

### 2. 研究の目的

Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワークを制御することで、細胞接着因子である  $\beta$ catenin の発現が増強される。そこで本研究の目的は、このネットワークを制御する可能性のある候補遺伝子と候補薬物を検索し、実際に臨床応用可能な固形癌転移・浸潤能抑制法を開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) Lin7C 過剰発現株の樹立

口腔扁平上皮癌細胞株にヒト Lin7C の完全長 cDNA を搭載した発現ベクター (pME18SFL3) を導入しヒト Lin7C 遺伝子を過剰発現させ、Lin7C ネットワークを構成している CASK 遺伝子と  $\beta$ catenin 遺伝子の発現量を LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kit (Roche) を使用した、Real-time PCR 法および Western blotting 法により解析する。

#### (2) Lin7C 周囲の機能的パスウェイ解析

マイクロアレイ解析およびパスウェイ解析 (IPA 法) により Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワークの上流に位置し、発現制御薬剤を有する遺伝子を検索する。

#### (3) 薬剤による Lin7C 発現抑制

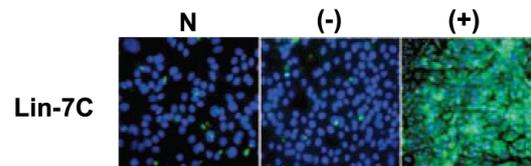
口腔癌由来細胞株を Lin7C 発現制御薬剤添加培地にて培養を行い、Lin7C 遺伝子、CASK 遺伝子、 $\beta$ catenin 遺伝子に対する発現誘導能力を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) Lin7C 過剰発現株の樹立

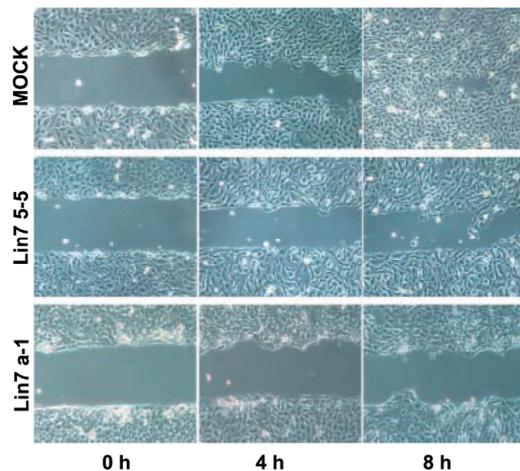
口腔扁平上皮癌由来細胞株では Lin7C の発現が減弱しているため、トランスフェクション試薬である FuGENE-6 を用いてヒト Lin7C の完全長 cDNA を搭載した発現

ベクター (pME18SFL3) を導入し、72 時間後に細胞免疫蛍光染色法を行い、Lin7C の過剰発現を確認した (図 1)。

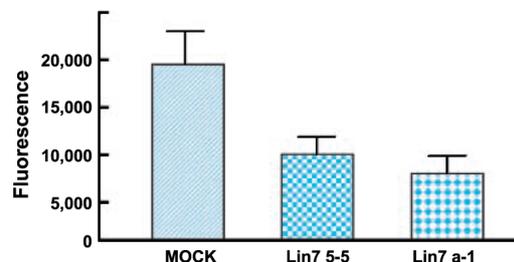


(図 1、N, non-treatment; (-), Mock; (+), Lin7C transfection 緑=Lin7C)

Lin7C 過剰発現細胞株の細胞運動能および細胞浸潤能を Wound Healing Test、Invasion Assay を行い、Lin7C をトランスフェクションさせた細胞株 9 種類全てにおいて、運動能・浸潤能の抑制が確認された (図 2、3)。

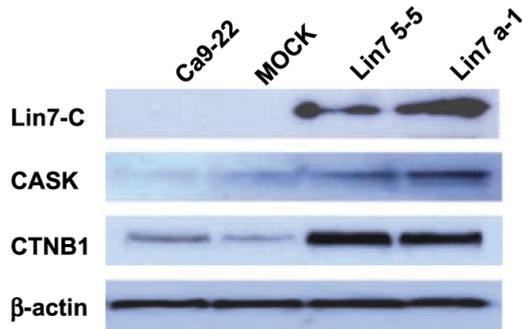


(図 2、コントロール(Mock)と比較し、Lin7C 過剰発現株(Lin-7 5-5、Lin-7 a-1)では細胞運動能が低下した。)



(図 3、Mock と比較し、Lin7C 過剰発現株(Lin-7 5-5、Lin-7 a-1)では細胞浸潤能が低下した。Y 軸=細胞浸潤能)

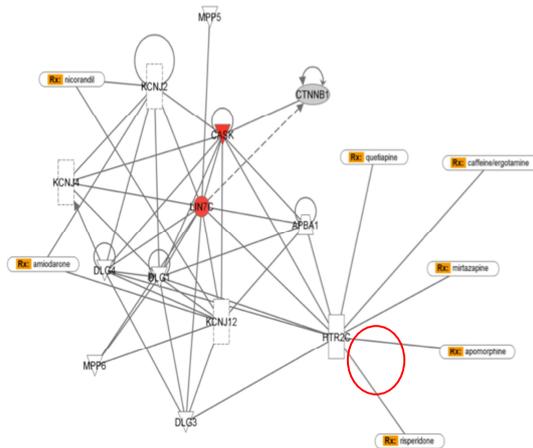
上記の細胞を用いて CASK、 $\beta$ catenin のタンパク発現をウエスタンブロット法を用いて解析を行った。Lin7C 過剰発現株では、CASK、 $\beta$ catenin とともに発現亢進が認められた(図 4)。



(図 4、Mock を比較し、Lin7C 過剰発現株では細胞浸潤能が低下した。Y 軸=細胞浸潤能)

## (2) Lin7C 周囲の機能的パスウェイ解析

IPA 法を用いて Lin7C 周辺遺伝子の阻害薬の検索を行った。Lin7C に直接作用する阻害薬はないものの、Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワーク上流に位置し、発現制御薬剤を有する遺伝子として、HTR2C を同定した(図 5)。



(図 5、HTR2C は Lin7C と直接的な関与をしており、HTR2C の阻害剤として上記の 6 種が挙げられる。(Rx))

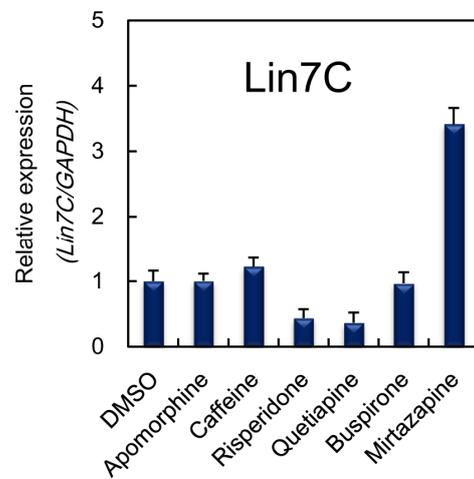
HTR2C の阻害剤 6 種を列挙する。

1. Apomorphine (パーキンソン病治療)
2. Caffeine

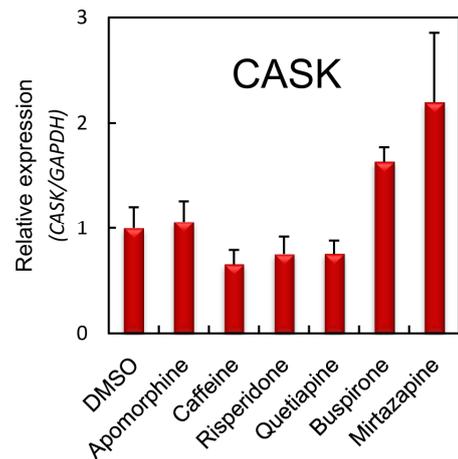
3. Risperidone (中枢神経系調節)
4. Quetiapine (セロトニン 5HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬)
5. Buspirone (抗不安薬)
6. Mirtazapine (抗うつ薬)

## (3) 薬剤による Lin7C 発現抑制

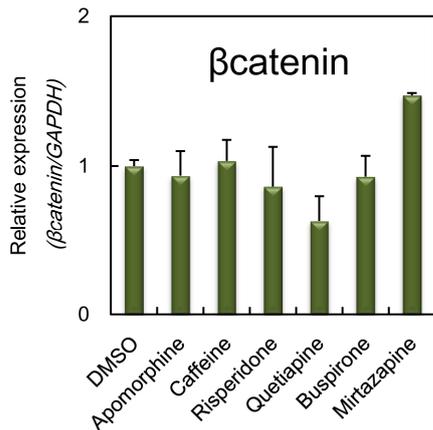
口腔癌由来細胞株を 6 種の HTR2C 阻害剤添加培地にて培養を行い、Lin7C 遺伝子(図 6)、CASK 遺伝子(図 7)、 $\beta$ catenin 遺伝子(図 8)の発現誘導を Real-time PCR 法にて解析した。



(図 6)



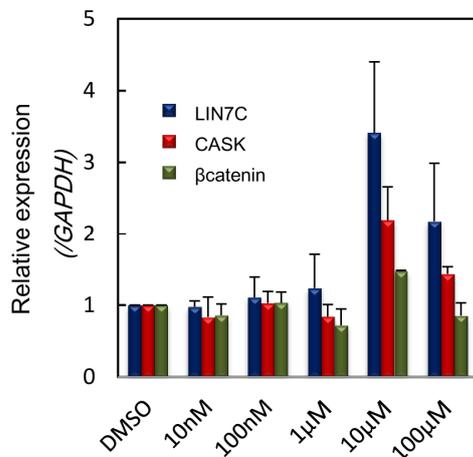
(図 7)



(図 8)

図 6・7・8 では、コントロールとして DMSO 添加培地を用いた。6 種の HTR2C 阻害剤のうち、最も Lin7C 遺伝子、CASK 遺伝子、 $\beta$ catenin 遺伝子の発現亢進を誘導した薬剤は Mirtazapine であった。

左図の結果より、Mirtazapine に注目し、至適濃度を検討するため、Mirtazapine 濃度依存的に Lin7C 遺伝子、CASK 遺伝子、 $\beta$ catenin 遺伝子の発現解析を行った(図 9)。



(図 9、Mirtazapine を 10  $\mu$ M で 48 時間作用させたの細胞株において、最も効果的に Lin7C、CASK、 $\beta$ catenin 遺伝子の発現亢進がみられた。)

#### [まとめ]

今回、Lin7C の発現亢進薬剤を同定した。この結果は Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワークの機能亢進を意味しており、癌の転移・浸潤メカニズムの解明にとって非常に有効なデータと考える。

今後、このシステムを用いて以下の研究を計画している。

- ・ 口腔癌由来細胞株のうち、高転移株とその親株(通常転移能)を用いた Lin7C-CASK- $\beta$ catenin ネットワークの解析。
- ・ 担癌ヌードマウスモデルを用いた Mirtazapine 投与における転移・浸潤能の解析。

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 1 件)

第 54 回日本口腔外科学会総会

平成 21 年 10 月 9～11 日 (札幌)

鵜澤一弘、恩田健志、佐久間健太郎、大和地正信、石上享嗣、伏見一章、中島大、肥後盛洋、笠松厚志、坂本洋右、椎葉正史、武川寛樹、横江秀隆、柴原孝彦、丹沢秀樹

口腔癌転移抑制候補タンパク Lin-7C/VEL13/MALS-3 の同定と包括的機能解析.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横江 秀隆 (YOKOE HIDETAKA)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70261930

坂本 洋右 (SAKAMOTO YOSUKE)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50451745

(平成 21 年 10 月 19 日代表者交替承認)

(2) 研究分担者

坂本 洋右 (SAKAMOTO YOSUKE)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50451745 (平成 21 年研究

代表者へ)

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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: