

## 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31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590341

研究課題名（和文）：腫瘍の病態におけるWntシグナルの役割

研究課題名（英文）：Role of Wnt-5a signaling in tumors

研究代表者：岸田 昭世 (KISHIDA SHOSEI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50274064

## 研究成果の概要（和文）：

ヒトグリオーマ（神経膠腫）由来の細胞株におけるすべてのWntファミリーの発現を解析し、Wnt-5Aの有意な発現の亢進を認め、Wnt-5A発現亢進がグリオーマの細胞運動、MMP-2発現調節を解して浸潤能を調節していることを見出した。また、がん化に関わる可能性があるHPVやSV40ウイルスを使わずにヒト正常口腔上皮由来細胞MOE1の樹立に成功し、これらの細胞株でWnt-5Aが発現していることを見出した。

以上のことから鑑みて、当初の計画以上に進展していると判断している。

## 研究成果の概要（英文）：

We analyzed the expressions of all Wnts and Frizzleds in several human glioma cell lines and found that Wnt-5A, Wnt-7A, Frizzled-2, and Frizzled-6 were highly expressed in those cells. By Wnt-5A-knockdown experiment, we have shown that Wnt-5A stimulated induced cellular motility and invasion of human glioma cells through the induction of MMP-2 mRNA expression and MMP-2 enzymatic activity. We established normal human epithelial cells without using HPV and SV40 genes, which have the potential to induce carcinogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Wnt・シグナル伝達・脳腫瘍・グリオーマ・口腔上皮・不死化

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt が制御するシグナル伝達の異常が多く、悪性腫瘍で報告され、大腸がんなどではβ-カテニンの細胞内蓄積と転写因子 TCF の転写活性化による標的遺伝子の誘導で細胞増殖が起こる事ががんの発症機構と密接に関係することが明らかにされていた。

その後β-カテニンの増加を起さない Wnt-5A についても、胃がんや前立腺がんが発現亢進と細胞運動の亢進や、予後への関与が明らかとなった。神経膠腫（グリオーマ）についても Wnt-5A の発現増強と細胞増殖との関わりが報告されていたが、細胞運動能や浸潤能との関わりは解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

腫瘍細胞の増殖や運動、接着は浸潤、転移能を始めとする腫瘍の病態に深く関与する。これまでに大腸癌や悪性黒色腫など多くの腫瘍で、Wnt の細胞内シグナル伝達経路の異常が細胞増殖につながる事が明らかとなっている。これらの Wnt の作用の多くはβ-カテニン経路による遺伝子発現と関係付けられていた。これに対し、心臓の発生に関わる Wnt-11 や、腎臓形成や神経線維の投射に関わる Wnt-4 などの non-canonical Wnt が成体の腫瘍細胞で発現しているか、また腫瘍の病態に関与しているか否かは不明な部分が多かった。ところが最近私どもは、ヒト脳腫瘍（神経膠腫）由来細胞において、Wnt-5A の発現が亢進していることを見出した。つまり、腫瘍から Wnt が分泌され、受容体を介したシグナルを動かし、腫瘍細胞の増殖や浸潤に関与する可能性が出てきている。

そこで、本研究では腫瘍細胞やヒト癌症例由来細胞について、どの Wnt と受容体が発現しているかを確認しながら、どのシグナルが活性化され、増殖や分化、運動、接着と言った細胞応答にどのような変化がでるかを明らかにして、腫瘍における Wnt の作用の生理的意義の全貌を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍系細胞における Wnt シグナル経路遺伝子の発現解析

これまでに、多くのがんでβ-カテニンを介した経路の亢進により、細胞が異常に増殖することは知られていた。近年、non-canonical Wnt の一つ、Wnt-5A については、悪性黒色腫や胃がんでの臨床的予後と Wnt-5A の発現の相関やグリオーマにおける細胞増殖との関係が私ども以外のグループより報告されて

いる。前述の通り、私共は予備的実験により数種類のヒト脳腫瘍（神経膠腫）由来細胞について全 Wnt ファミリー遺伝子の発現を定量 PCR 法にて解析してみた。その結果、Wnt-5A の mRNA が有意な発現を見出し、正常脳組織への浸潤が少ないタイプのグリオーマ細胞では Wnt-5A の発現が少ない傾向を見出した。したがって、腫瘍細胞では、Wnt-5A が増殖や浸潤という腫瘍の病態に複雑に関わる可能性が考えられる。そこで、神経系腫瘍 (glioma や meningioma)、消化器がん (胃がん、大腸がん) 由来の細胞について、全 Wnt 遺伝子と Frizzled を含めた各種 Wnt 受容体、細胞外での Wnt リガンドと受容体の結合を修飾する拮抗分子 Dkk と sFRP ファミリーの発現をウエスタンブロットティング、定量 PCR により解析し、各種腫瘍系細胞における Wnt の作用を解釈するための基礎情報を得る。

### (2) 精製 Wnt 蛋白質の調製

Wnt 蛋白質のリガンドとしての作用を解析する場合、本来精製標品を使うべきである。ところが、Wnt は疎水性が高いため活性のある可溶性の精製標品を得ることが極めて困難で、代替手段として Wnt を分泌する細胞の培養上清 (conditioned medium) を他の細胞の培地に添加することが広く行なわれていた。この場合、培養上清中に含まれる Wnt 以外の様々な分子の影響を否定できず細胞応答の解釈が困難だった。私どもは海外のグループの報告を参考に、多段階のクロマトグラフィーを行って培養上清からリガンドとして使用できる活性のある可溶性 Wnt-3A を大量精製する方法を確立し ((岸田ほか, Mol. Cell. Biol. 24 巻, 4487-4501, (2004)), さらに Wnt-5A や Wnt-5B を高度に精製する実験系を確立して来た。これらの経験を参考に、現在で検出している Wnt-5A や-5B の精製を先行させながら、計画 1 で他の腫瘍において多量の発現が検出された Wnt を高度に精製する。

### (3) 腫瘍細胞における増殖・浸潤の解析

計画 2 で高度に精製した Wnt 蛋白質をリガンドとして用いて、腫瘍細胞の増殖や浸潤に関する効果を解析する。

さらに、これらの Wnt 蛋白質刺激に反応する細胞内シグナルを検索する。

### (4) ヒト正常口腔上皮細胞株樹立

口腔上皮は種々の刺激にさらされて、がん化する可能性がある事や、HPV が子宮がんや口腔領域の発がんに関わる事が知られてい

る。がんの研究は正常細胞との比較を念頭に置くべきである事は当然である。ところが、研究材料として広く使われているヒトの正常口腔上皮由来の細胞株はほとんど HPV や SV40 などのウイルスにより不死化した物である。これらのウイルスが発がんのリスクファクターであることが判明している以上、ウイルス遺伝子を用いない不死化細胞が求められていた。私どもはがんセンター清野博士らのグループとの共同研究により、HPV や SV40 などのウイルスのウイルス遺伝子を用いない方法でヒト口腔正常上皮細胞の不死化を試みた。

#### 4. 研究成果

グリアから発生するヒトグリオーマ（神経膠腫）由来の細胞株におけるすべての Wnt ファミリーの発現を定量的にリアルタイム PCR で解析し、U251 をはじめとするいくつかの細胞株で、ヒト正常脳組織に比べて、Wnt-5A の有意な発現の亢進を認めた。グリオーマ細胞における Wnt-5A の作用が細胞増殖より、マトリクスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) の誘導や細胞運動に関するものである点を見出した。現在、グリオーマ細胞で Wnt-5A の受容体として働く分子の同定を行っている段階に差し掛かっている。

また、HPV や SV40 を用いずにヒト口腔正常上皮細胞の不死化に成功し、Wnt-5A が発現していることを見出した。

#### 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 3 件)

①Hayashi T., Kishida M., Nishizawa Y., Iijima M., Koriyama C., Nakamura M., Sano A., Kishida S.

Subcellular localization and putative role of VPS13A/chorein in dopaminergic neuronal cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun.

査読：有

419 巻、2012、pp511-516

②Kibe T., Kishida M., Kamino M., Iijima M., Chen L., Habu M., Miyawaki A., Hijioka H., Nakamura N., Kiyono T., Kishida S.

Immortalization and characterization of normal oral epithelial cells without using HPV and SV40 genes.

Oral Science International

査読：有

8 巻、2011、pp.20-28

③Kamino M., Kishida M., Kibw T., Iijima M., Hirono H., Tokudome M., Chen L., Koriyama C., Yamada K., Arita K., Kishida S.

Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2.

Cancer Science

査読：有

102 巻 3 号、2011、pp540-548

[学会発表] (計 10 件)

①岐部俊郎, 岸田想子, 比地岡浩志, 宮脇昭彦, 飯島幹雄, 神野真幸, 清野透, 中村典史, 岸田昭世

The role of Wnt signaling pathway in growth characteristics of Ameloblastoma cells.

第 34 回日本分子生物学会

2011 年 12 月 14 日、横浜 (神奈川県)

②羽生未佳, 神野真幸, 岸田想子, 岐部俊郎, 湯之上俊二, 飯島幹雄, 平野宏文, 岸田昭世, 時村洋, 有田和徳

Glioma 浸潤活性における Wnt シグナルの作用機構

第 29 回日本脳腫瘍学会

2011 年 11 月 27 日、下呂 (岐阜県)

③羽生未佳, 神野真幸, 岸田想子, 湯之上俊二, 飯島幹雄, 平野宏文, 岸田昭世, 有田和徳

Glioma における Wnt シグナル分子の作用機構

第 12 回日本分子脳神経外科学会

2011 年 11 月 15 日、横浜 (神奈川県)

④岐部俊郎, 岸田昭世, 中村典史

The role of Wnt signaling pathway in growth characteristics of

Ameloblastoma cells

インドネシア口腔外科学会

2011 年 9 月 22 日、インドネシア

⑤岐部俊郎，比地岡浩志，宮脇昭彦，中村典史，岸田昭世

新規口腔粘膜上皮細胞株MOE1の樹立～HPVやSV40 遺伝子を用いない不死化

第65回日本口腔科学学会

2011年4月21日、船堀（東京都）

⑥神野真幸，岸田想子，岐部俊郎，生駒今日子，飯島幹雄，平野宏文，徳留舞，陳琳，郡山千早，武田泰生，山田勝士，有田和徳，岸田昭世

Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2.

第33回日本分子生物学会

2010年12月8日、神戸（兵庫県）

⑦神野真幸，岸田想子，岐部俊郎，生駒今日子，飯島幹雄，平野宏文，徳留舞，陳琳，郡山千早，武田泰生，山田勝士，有田和徳，岸田昭世

ヒトグリオーマ浸潤活性におけるWntシグナルの作用機構

第63回日本薬理学会西南部会

2010年11月26日、鹿児島（鹿児島県）

⑧岐部俊郎，比地岡浩志，宮脇昭彦，光安岳志，岸田想子，清野透，岸田昭世，中村典史

エナメル上皮腫でのWntシグナルの作用解析及び、新規正常口腔粘膜上皮細胞株の樹立

第55回日本口腔外科学会

2010年10月16日、幕張（千葉県）

⑨神野真幸，岐部俊郎，中村葉子，生駒今日子，武田泰生，山田勝士，岸田想子，飯島幹雄，平野宏文，岸田昭世

ヒトグリオーマにおけるWntシグナルの作用解析（細胞運動を中心とする）

平成22年度日本生化学会九州支部例会

2010年5月23日、鹿児島（鹿児島県）

⑩神野真幸，岐部俊郎，中村葉子，生駒今日子，武田泰生，山田勝士，平野宏文，岸田想子，飯島幹雄，岸田昭世

GliomaにおけるWntシグナル分子の発現解析

第32回日本分子生物学会

2009年12月10日、横浜（神奈川県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岸田 昭世 (KISHIDA SHOSEI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50274064

### (2) 研究分担者

岸田 想子 (KISHIDA MICHIKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40274089