

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 3 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21792015

研究課題名（和文）：ゲルダナマイシンを用いた口腔癌における分子標的治療ならびに免疫療法の基礎的研究

研究課題名（英文）：The basic research molecular target and immune therapy for oral squamous cell carcinoma with geldanamysin.

研究代表者

山田 慎一 (YAMADA SHINICHI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：50380853

研究成果の概要（和文）：

ゲルダナマイシンを用いた口腔癌における分子標的治療ならびに免疫療法の基礎的研究について行った。口腔癌の転移・浸潤に関与すると思われる α -actinin-4、cortactin、CRK IIについて検討を行い、それぞれが口腔扁平上皮癌において浸潤・転移に強く関与していることが示唆され、分子標的治療のターゲット因子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

I performed the basic research molecular target and immune therapy for oral squamous cell carcinoma with geldanamysin. I examined the several molecules, which were involved in the metastasis and invasion in oral squamous cell carcinoma. And, I revealed these molecules such as α -actinin-4, cortactin, and CRK II, were involved in the metastasis and invasion in oral squamous cell lines, respectively, and the possibility of the target of molecular target therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：口腔癌, ゲルダナマイシン, 浸潤, 転移

1. 研究開始当初の背景

Hsp90 特異的阻害剤ゲルダナマイシンを用いた分子標的治療は米国において大腸癌などに対する第 I 相臨床試験が行われている。加えて、免疫療法を併用することでより効果的に抗腫瘍効果が得られることが期待でき、更に手術不能症例において治療による

副作用が軽減され延命にもつながると思われる。アポトーシス抑制遺伝子である survivin による免疫療法は第 I 相臨床試験が行われている。survivin は Hsp90 α と結合し複合体を形成することが報告されており (Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(24):13791-13796.)、survivin と Hsp90 α との結合様式の解明やゲルダナマイ

シンによる抗原提示の過程におけるHsp90 α などの分子シャペロンへの影響を検討することは、免疫療法における免疫応答とHsp90分子シャペロン機構の更なる解明にもつながるものと考えられる。

2. 研究の目的

HSP90は細胞質に存在し、分子シャペロンとして機能していることが広く知られている。HSP90については多くのクライアントタンパクの報告がなされており、さまざまな機能を有し、一例として、癌細胞の浸潤・転移にも関与するマトリックスメタロプロテアーゼ2にも作用し、その成熟を補助しているとされ、癌細胞の転移・浸潤にも関与していることが報告されている。この多様な分子シャペロンとして機能するHSP90を特異的に阻害する薬剤としてゲルダナマイシンが知られており、この臨床試験も行われている。このゲルダナマイシンと現在、口腔癌の化学療法で中心となって使用されている白金製剤の作用部位は異なり、これらを組み合わせることで、より少量で治療効果を得ることが可能となり、また、副作用を軽減することも可能となると思われる。また、分子標的治療薬との併用により同様の利点が得られる可能性も考えられる。加えて、免疫学的観点から検討することにより、HSP90の抗原提示時の作用機構の解明にもつながり、免疫療法への開発にも進展する可能性がある。そこで、口腔癌におけるゲルダナマイシンを用いた分子標的治療薬の創薬、免疫療法の検討を行い、その有用性、作用機序を分子生物学的に検討し、口腔癌治療に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

癌細胞の浸潤、転移に関与する分子としてアクチン束状化タンパク α -actinin-4、アクチン関連足場タンパクcortactin、シグナルアダプター因子であるCRK IIについて口腔癌細胞における転移・浸潤能への関与について生検標本を用いてそれぞれの抗体を用いて免疫組織化学的染色を行いタンパクの発現について検討を行い、臨床病理学的因子との関連を検討した。また、培養癌細胞を用いて、それぞれの分子についてsiRNAを行って浸潤能、遊走能への影響を検討した。

4. 研究成果

口腔扁平上皮癌において細胞と細胞外基質との関連をシグナルアダプター因子であ

るCRK IIに着目し検討した。生検標本を用いてCRK IIの発現を免疫組織化学的染色を用いて検討したところ、腫瘍の浸潤先端部位、瀰漫性に浸潤する部位に高発現がみられた。CRK IIの発現と臨床病理学的因子との関連を検討したところ、T分類、N分類、浸潤型との間に優位な相関性が認められた。また、CRK IIの過剰発現と5年生存率との間にも優位な相関性が認められCRK IIの発現が優位な予後因子となる可能性が示唆された。培養口腔扁平上皮癌細胞株OSC20を用いてCRK IIの発現をsiRNAにより抑制したところ、wound healing assayにより遊走能が、また、matrigel invasion assayにより浸潤能の有意な低下が認められた。加えてCRK IIの上流因子であるDOCK180、Rac1、アクチン関連足場タンパクであるcortactinの発現を検討したところ、CRK IIの発現抑制により、それらの分子の有意な発現抑制がみられた。CRK IIの発現抑制によりp130Cas-CRK II-DOCK180複合体形成が抑制されシグナル伝達が阻害される可能性が示唆され、cortactinの発現抑制もみられ、CRK IIが口腔扁平上皮癌の転移・浸潤に強く関与していることが示唆され、またCRK IIが口腔扁平上皮癌治療における分子標的治療のターゲット分子となる可能性が示唆された。

腫瘍の転移には細胞間接着の減弱、マトリックスメタロプロテアーゼなどの活性化、細胞の運動能の亢進などが重要であると考えられており、なかでも細胞骨格であるアクチン束状化のダイナミックな変化が重要な因子の一つであると認識されている。口腔扁平上皮癌におけるアクチン束状化タンパク質actinin-4の発現と臨床病理学的因子との関連を明らかにすることを目的とした。口腔癌由来培養細胞において α -actinin-4蛋白の発現は浸潤指数と有意な相関性がみられた。RNAiにて α -actinin-4発現を抑制した場合、OSC20では有意に浸潤指数の低下がみられた($P < 0.05$)。また、生検標本にて発現を検討したところ、浸潤型との間に優位な相関性がみられた。 α -actinin-4の発現は口腔扁平上皮癌における浸潤・転移に強く関与し、分子標的治療薬のターゲット因子となりうる可能性が示唆された。

上記因子に関連してアクチン関連足場タンパクであるcortactin(EMS1)についても同様に、この分子との発現と臨床病理学的因子および浸潤能との関連について検討を行った。cortactinの発現は口腔扁平上皮癌細胞において有意に過剰発現し腫瘍サイズ、頸部所属リンパ節転移、浸潤パターンとの間に有意な相関性がみられ、癌細胞浸潤能との相関が示唆された。また、培養癌

細胞においても cortactin の mRNA 発現の抑制により癌細胞の浸潤能の有意な低下がみられた。加えて、E-cadherin、 β -catenin などの接着分子の mRNA レベルの発現低下がみられ、口腔扁平上皮癌での転移・浸潤能に関与し、分子標的治療のターゲットとなり得る可能性が示唆された。

加えて、CRK II の発現と cortactin との発現の関連性について明らかにしてきたこともあり、この2つの分子の過剰発現と口腔扁平上皮癌での浸潤・転移能について検討し臨床病理学的因子との関連性についても検討を行った。cortactin および CRK II は口腔扁平上皮癌において過剰発現しており、経発現しているものは腫瘍サイズ、頸部所属リンパ節転移、浸潤パターンとの間に有意な相関性が認められた。また、培養口腔扁平上皮癌細胞において、この2つの分子の発現を抑制したところ、遊走能、浸潤能の有意な低下がみとめられた。また、5年生存率との間にも有意な相関性がみられ、これら2つの分子の過剰発現は口腔扁平上皮癌の転移・浸潤能と強く関係し、これらは予後因子として有用である可能性、分子標的治療のターゲットとなりうる可能性が再確認された。

このように、現在までに口腔扁平上皮癌における転移・浸潤に関係する分子の発現を検討し、転移・浸潤能に強く関わることを明らかにし発表してきた。これらの分子へのゲルダナマイシンの影響を検討し、併せて免疫療法について検討を進めていく必要がある。

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3件)

Yamada S, Yanamoto S, Yoshida H, Yoshitomi I, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK. **RNAi-mediated down-regulation of alpha-actinin-4 decreases invasion potential in oral squamous cell carcinoma.** Int J Oral Maxillofac Surg. 2010 Jan;39(1):61-7.

Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK. Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. Pathol Oncol Res. 2010 Dec;16(4):523-31.

Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G,

Rokutanda S, Yonezawa H, Kawakita A, Nemoto TK. Overexpression of CRKII increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma. Cancer Lett. 2011 Apr 28;303(2):84-91.

[学会発表] (計3件)

山田慎一、他、口腔扁平上皮癌における EMS1 の発現の意義 第63回日本口腔科学会学術集会 2009年04月

山田慎一、他、口腔扁平上皮癌における EMS1/cortactin の発現の意義 (ポスター) 第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2009年10月

山田慎一、他、口腔扁平上皮癌浸潤能におけるシグナル伝達アダプター因子 CRK の発現の意義 (ポスター) 第55回(社)日本口腔外科学会総会学術集会 2010年10月

[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

山田慎一 (Shin-ichi Yamada)

長崎大学・病院・講師

研究者番号： 8386435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし