

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 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592250

研究課題名（和文） 口腔癌における転移・浸潤関連接着因子群の解析

研究課題名（英文） Analysis of inhibiting the invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

横江 秀隆（YOKOE HIDETAKA）

防衛医科大学校・病院・准教授

研究者番号：70261930

研究成果の概要（和文）：

本研究は、細胞間接着関連遺伝子群の機能解析を行うことで転移に関連した因子を解明し、臨床応用可能な転移予測診断マーカーの開発と分子標的治療による癌転移抑制法を開発することを目的とした。まず、ネットワーク解析の結果から細胞接着因子関連遺伝子群として、KCNJ2-Lin7C-CASK- β catenin ネットワークを同定した。 β catenin の上流に位置する KCNJ2 遺伝子を発現抑制すると、結果的に β catenin の発現が増加した。さらに KCNJ2 に作用する薬剤として、心室性頻脈の治療薬として臨床応用されている amiodarone をデータベース上で同定した。この薬剤により β catenin の発現が増強されることから、癌細胞間の接着能を高め、癌浸潤抑制に関連していることが示唆された。

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 KCNJ2-Lin7C-CASK- β catenin pathway. As the result of suppressed expression of KCNJ2 which located upstream of β catenin, β catenin expression levels were increased. In addition, we identified some molecules of upstream of KCNJ2 by the Ingenuity Pathway Analysis, and then focused amiodarone which is the drug of ventricular tachycardia. After treatment with this drug, expression levels of Lin7C, CASK and β catenin were significantly up-regulated. We suggested that the specific KCNJ2 inhibitor, amiodarone, closely related to KCNJ2-Lin7C-CASK- β catenin pathway, and therefore might be a therapeutic agent 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
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	1,200,000	0	1,200,000
2012 年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

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)細胞接着因子、(2)癌転移抑制法、(3)癌浸潤抑制法、(4)KCNJ2、(5) β -catenin

1. 研究開始当初の背景

現在までに共同研究により細胞接着因子関連遺伝子群のマイクロアレイ・データベースを既に構築・保有している。このデータベースを用いて、複数の遺伝子の相互関係、調節制御関係を総合的に評価し、臨床応用可能な癌の転移や浸潤の分子マーカーを検索することが可能となった。本研究で、データベースから抽出した遺伝子群に関して、臨床材料や培養細胞株を使った機能評価を行い、真の分子マーカーを同定することを計画した。

2. 研究の目的

細胞接着因子を発現増強することにより、

gene	fold change
β catenin	0.604
CASK	0.541
Lin7C	0.553
KCNJ2	1.943
KCNJ12	1.781

癌細胞間の接着能を高め、癌細胞の転移

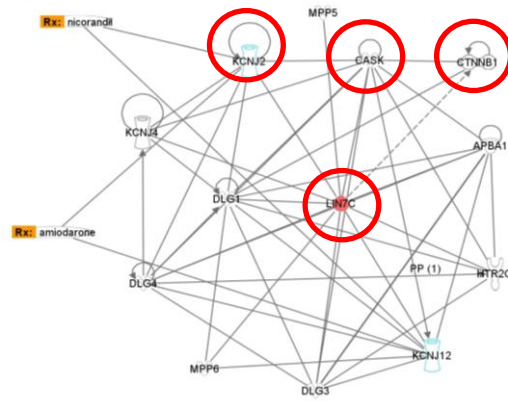
や浸潤を抑制することを目的とする。

3. 研究の方法

- 1)すでに独自の研究により保有しているマイクロアレイ解析に基づくヒト遺伝子発現プロファイリング・データベースから、細胞接着因子関連遺伝子群を抽出する。
- 2)データベース上で、抽出した遺伝子群のうち、癌特異的に発現異常を示している遺伝子群を同定する。
- 3)Real-time PCRにより、定量的に1)2)で同定した発現異常遺伝子群の発現を確認する。
- 4)定量的に求めた細胞接着因子関連遺伝子群のデータを Ingenuity Pathway Analysis を用いてパスウェイ解析を行い、これらの遺伝子間の相互作用を明らかにする。
- 5)パスウェイ解析でキーになると考えられた遺伝子について、遺伝子導入、siRNAなどの機能解析により役割を明らかにする。
- 6)口腔癌由来細胞において、各薬剤を作用させて、Lin7C 遺伝子、CASK 遺伝子、 β catenin 遺伝子 (CTNNB1) の発現状態と誘導能力を real time PCR 法で評価する。
- 7)同様に最終産物である β catenin タンパク質発現状態を Western blotting 法で確認する。
- 8)以上より、Lin7C-CASK- β catenin ネットワークの制御能力を薬剤ごとに評価し、最も効果的に制御できる薬剤を同定する。

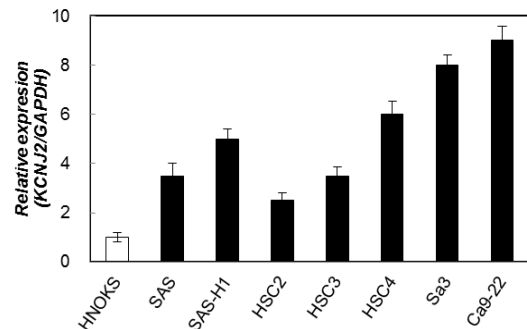
4. 研究成果

本研究では、独自の研究により保有しているマイクロアレイ解析に基づくヒト遺伝子発現プロファイリング・データベースから、細胞接着因子関連遺伝子群を抽出した。データベースから、抽出した遺伝子群のうち、癌特異的に発現異常を示している遺伝子群を同定した。

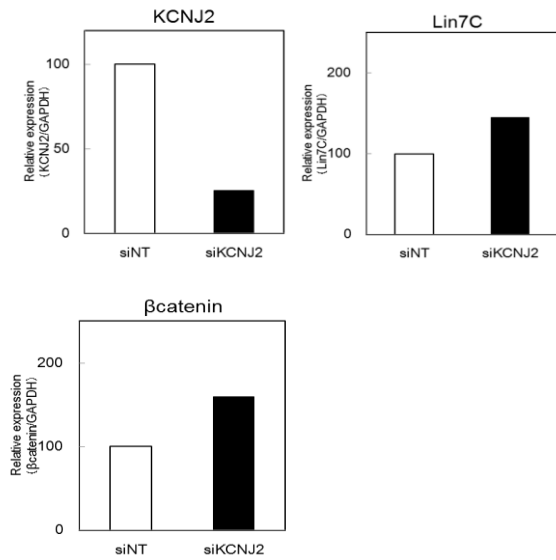


正常口腔粘膜上皮と比較して口腔癌細胞株で発現が亢進していたものは、KCNJ2, KCNJ12 であり、発現が低下していたものは、 β catenin, CASK, Lin7C であった。この中で、Lin7C の発現を抑制する KCNJ2 に注目し、Real-time PCR により、mRNA の発現解析を行ったところ、すべての口腔癌細胞株において発現上昇を認めた。

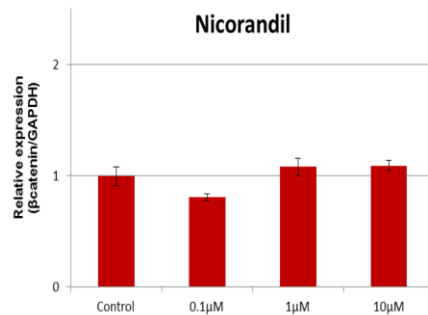
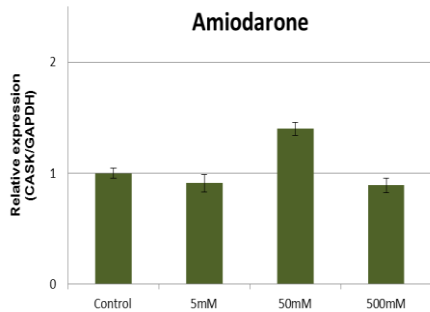
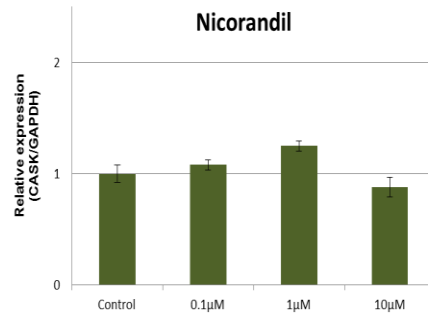
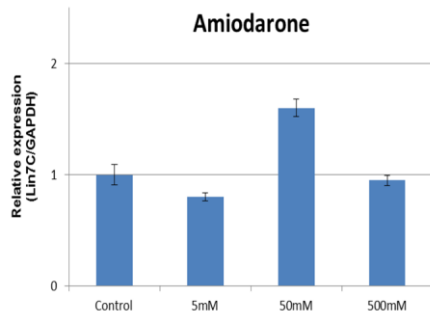
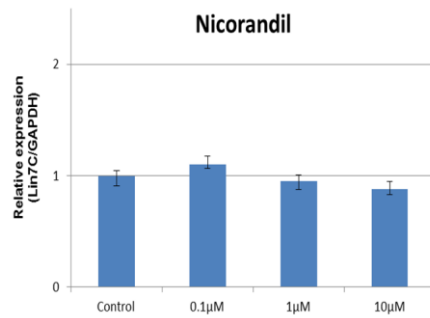
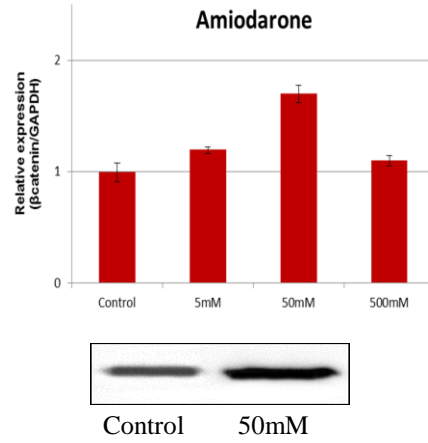
KCNJ2 mRNA 発現状態



パスウェイ解析でキーになると考えられた遺伝子について、遺伝子導入、siRNAなどの機能解析により役割を明らかにするため si KCNJ2 導入により、KCNJ2 の発現を抑制させたところ、Lin7C および β catenin の発現増強が確認された。



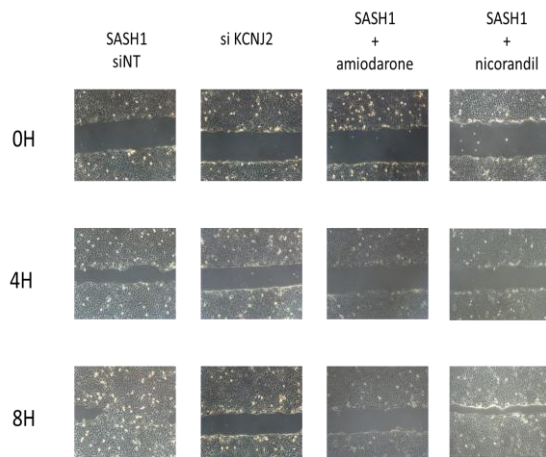
次に、パスウェイ解析により KCNJ2 作用薬として同定した amiodarone および nicorandil の 2 薬剤について SAS-H1 細胞株に作用させて Lin7C と β catenin の発現変化と誘導能力を real time PCR 法および Western blotting 法で評価した。



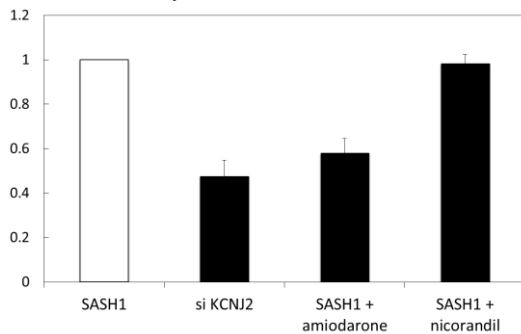
amiodarone 50mM にて、Lin7C、 β catenin は約 1.6 倍、CASK は 1.4 倍の発現増強を認めた。Nicorandil では、特に発現の変化は認められなかった。

ここまでの実験にて、KCNJ2 遺伝子を制御する薬剤として amiodarone が候補として挙げられた。次に候補薬剤添加培養下に *in vitro* にて Wound healing test, Invasion assay を行ったところ、浸潤能の抑制作用を認めた。

Wound healing assay (SASH1)



Invasion assay (SASH1)



実際の口腔癌臨床検体における KCNJ2 の mRNA 発現状態を確認したところ、30 例中 20 例 (67%) において発現上昇を認めた。

KCNJ2 臨床検体における mRNA 発現状態



以上より、マイクロアレイ・データベースを用いて細胞接着因子関連遺伝子群の機能解析を行ったところ、KCNJ2-Lin7C-CASK- β

catenin ネットワークを新たに同定し、KCNJ2 作用薬として、amiodarone の作用下にて、Lin7C、 β catenin の発現増強を認めたことから、癌細胞間の接着能に関与し、転移、浸潤抑制に関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横江 秀隆 (YOKOE HIDETAKA)
防衛医科大学校・病院・准教授
研究者番号：70261930

(2) 研究分担者

佐藤 泰則 (SATOU YASUNORI)
防衛医科大学校・病院・教授
研究者番号：10095375

(3) 連携研究者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)
千葉大学大学院医学研究院
臨床分子生物学教室・教授
研究者番号：50236775