

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659945

研究課題名(和文) 口腔癌転移を制御する細胞接着因子を標的にした核酸医薬のデリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Study of the delivery system of nucleic acid medicines targeting cell adhesion molecules controlling the metastasis of oral cancer

研究代表者

林堂 安貴 (Hayashido, Yasutaka)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：70243251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリン α vのアンチセンスcDNAを組み込んだプラスミドを作製し、これを扁平上皮癌細胞に導入し、インテグリン α v蛋白の発現抑制を試みた。さらに、インテグリン β 8のアンチセンスオリゴを作製し、扁平上皮癌細胞のインテグリン β 8蛋白発現抑制を試みた。インテグリン α vあるいは β 8のサブユニット蛋白発現が低下した扁平上皮癌細胞は、*in vitro*での細胞増殖と*in vitro*浸潤能が、低下することが観察された。さらに、 α vあるいは β 8のサブユニット発現が低下した扁平上皮癌細胞は、*in vivo*での造腫瘍能も低下することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Transfection of squamous cell carcinoma (SCC) cells with a mammalian expression vector containing the cDNA for integrin α V in the antisense orientation reduced α V expression in SCC cells. Transfection with antisense oligonucleotides targeting integrin β 8 reduced β 8 expression in SCC cells. Suppression of integrin α V or β 8 by transfection with antisense cDNA plasmid or antisense oligonucleotides led to a decrease in the proliferation and invasiveness of SCC cells. In addition, the downregulation of integrin α V or β 8 significantly reduced the tumorigenicity of oral SCC.

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 細胞接着 インテグリン 浸潤 転移

1. 研究開始当初の背景

遠隔臓器での転移巣の形成が悪性腫瘍の治療上の最大の障害になっている。口腔扁平上皮癌は、早期から頸部リンパ節に転移することが多く、外科手術や放射線治療により原発巣が制御されているにもかかわらず、転移巣形成により予後不良となる症例が数多く見受けられる。従って、口腔癌の浸潤・転移を阻止することにより、口腔癌治療成績の著しい向上が期待できる。

インテグリンは α と β のサブユニットで構成されているヘテロ二量体で、細胞膜上に発現し細胞の細胞外基質への接着、細胞遊走を制御していることが知られている。申請者は、インテグリン αv が活性型 MMP-2 の細胞膜上への結合因子として機能していることを報告した (Int. J. Oncol. 2003)。さらに、インテグリン $\alpha v \beta 8$ を介して誘導される扁平上皮癌細胞の増殖と運動能のシグナル伝達を解析し、図1に示すように、口腔扁平上皮癌細胞の増殖促進には、MAP キナーゼシグナル伝達系の、主として JNK1 を介する経路が、一部には、MEK を介する経路が関与していること明らかになった。扁平上皮癌細胞の運動は、JNK1 と Rho ファミリー G 蛋白の Rac1 とによって調節されていることが示された。

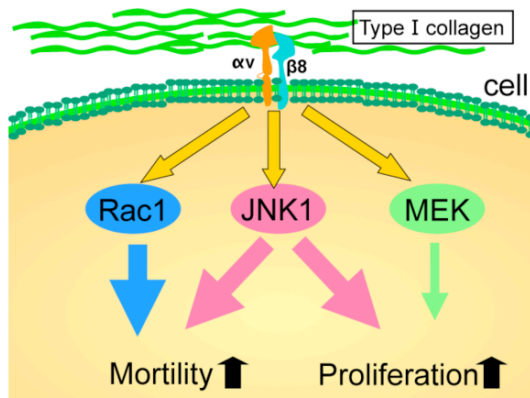


図 1

以上のことから、 αv あるいは αv のカウンターパートの $\beta 8$ の発現の抑制は、口腔癌細胞の運動能や蛋白分解活性を低下させ、がんの浸潤・転移を抑制すると推測される。

2. 研究の目的

本研究は、インテグリン αv あるいは αv のカウンターパートの $\beta 8$ の発現の抑制することによって口腔扁平上皮癌の浸潤・転移を阻止する、口腔癌の新しい治療法を探索することを目的としている。

そのために、まず扁平上皮癌細胞のインテグリン αv 発現抑制のため、アンチセンス RNA を産生するプラスミドを作製し、 $\beta 8$ 発現抑制のためにはアンチセンスオリゴを作製した。扁平上皮癌細胞にアンチセンス cDNA とアンチセンスオリゴを導入し、インテグリン αv 及び $\beta 8$ 発現抑制効果を検討した。

さらにインテグリン αv と $\beta 8$ 発現抑制が、扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能と造腫瘍能に与える影響を検討するとともに、扁平上皮癌細胞の増殖を制御する MAP キナーゼシグナル伝達系と運動能を制御する Rho ファミリー G 蛋白の Rac1 に与える影響に解析した。

3. 研究の方法

1) 細胞と培養

口腔扁平上皮癌由来細胞株として、SCCKN, Ca9-22, KO 及び ZA を用いた。Ca9-22 細胞, SCCKN 細胞及び ZA 細胞は、5% 仔牛血清を含む RPMI1640 medium と Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を 1:1 に混合した RD 培地を用いて、KO 細胞は、5% CS を含む DMEM と Nutrient Mixture Ham F-12 を 1:1 に混合した DF 培地を用いて培養した。

2) アンチセンス遺伝子導入によるインテグリン αv 発現抑制

インテグリン αv サブユニットの open reading frame を、哺乳動物発現ベクター pCI-neo (Promega) にアンチセンス方向に組み込んだ pCI-neo/antisense α を作製し、リポフェクション法にて扁平上皮癌細胞に導入し、インテグリン αv の発現抑制を試みた。

3) アンチセンスオリゴによるインテグリン

β8 発現の抑制

インテグリン β8 蛋白の発現を抑制するために、FITC 標識したインテグリン β8 を標的とするモルフォリノアンチセンスオリゴ (5'-AAG CCA GGG CCG AGC CGC ACA TAAT-3' ; Gene Tools, LLC, Philomath, OR , USA) を Special Delivery System (Gene Tools) を用いて導入した。

4) 口腔扁平上皮細胞の運動能の検討

ポアサイズ 8 μm のケモタキセル (倉敷紡績) を用いた Boyden Chamber の変法にて運動能を検討した。メンブレン両面を 100 μg/ml の I 型コラーゲンあるいは poly-L-lysine でそれぞれコートしたケモタキセルを 16mm 径培養皿に設置し、3×10⁵ 個の細胞を浮遊させた培養液 400 μl 加え、下室には 800 μl の培養液を加えた。37°C, 24 時間培養後、メンブレンをディフクイックで固定・染色した。1つのケモタキセルあたり無作為に選ばれた 5 視野 (1 視野=0.42mm²) のメンブレン下面の細胞数を顕微鏡下 (倍率: 200 倍) で算定し、遊走細胞数を算出した。

5) MAP キナーゼカスケード活性化の解析

扁平上皮癌細胞を I 型コラーゲンでコートした 16 mm 径培養皿で各時間培養後、Lammeli sample buffer で可溶化し電気泳動後、PVDF メンブレンに転写した。抗リン酸化 MEK 抗体を用いた immunoblot 法にて MAP キナーゼカスケード分子のリン酸化を検索した。

6) Rac1 の活性化の解析

I 型コラーゲン上で培養した口腔扁平上皮癌細胞から、Pull Down Assay によって活性化 Rac1 の分離・回収を行い、抗ヒト Rac1 抗体を用いた immunoblot を行った。

7) ノードマウスでの造腫瘍性の判定

5 × 10⁶ 個の細胞を 4 週齢ノードマウス (Balb/cAJCnu/nu) の背部皮下に接種し、経時的に形成された腫瘍の長径と短径を測定した。腫瘍体積は以下に示す計算式にて算出した。

$$\text{体積} = 1/2 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$$

なおノードマウスを使用した一連の実験は、広島大学医学部附属動物実験施設で行った。

4. 研究成果

インテグリン αv アンチセンス cDNA が導入された KNanti αv は SCCKN 及び mock に比べインテグリン αv 蛋白発現が低下していた (図 2)。

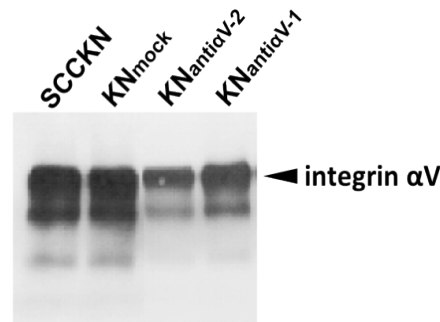


図 2

インテグリン β8 アンチセンスオリゴ導入により、Ca9-22 及び KO の β8 蛋白発現は抑制された (図 3)。

Effect of β8-antisense Oligonucleotide on Integrin β8 Expression in SCC Cells



図 3

αv アンチセンス cDNA が導入された KNanti αv は、SCCKN 及び mock に比べ細胞増殖が著明に低下していた (図 4)

Proliferation of Integrin antisense-αv Transfectants and SCKNC cells

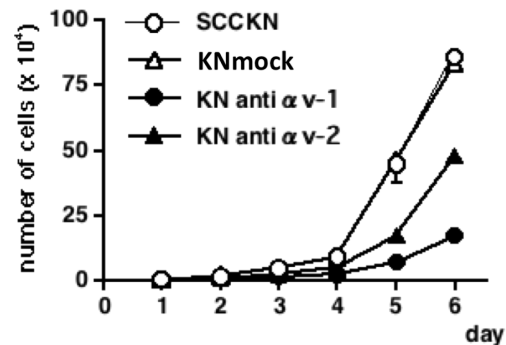


図 4

$\beta 8$ アンチセンスオリゴ導入による $\beta 8$ 発現抑制は、Ca9-22 及び KO の細胞運動能を低下させた。

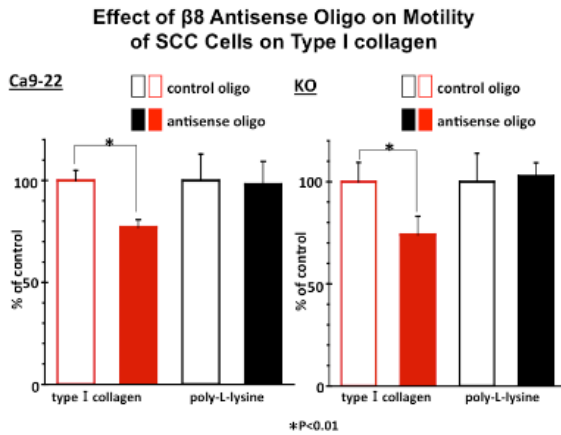


図 4

さらにインテグリン αv 低発現細胞株はコーラゲンゲル内培養において SCCKN 及び KNmock に比べ縮小したコロニーを形成した (図 5)。

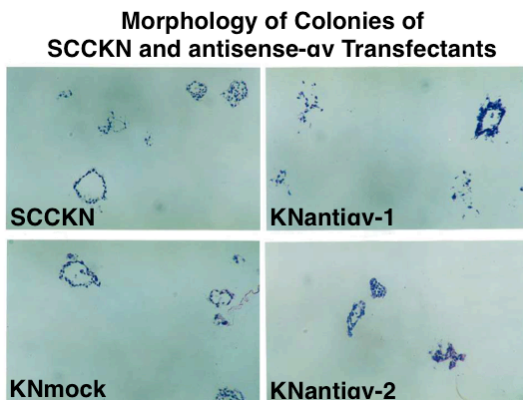


図 5

$\beta 8$ アンチセンスオリゴ導入により、 $\beta 8$ 発現が抑制された Ca9-22 と KO のコロニーは、不規則に配列した細胞集団からなる拡張したものから、小さなコロニーに変化した。(図 6)。

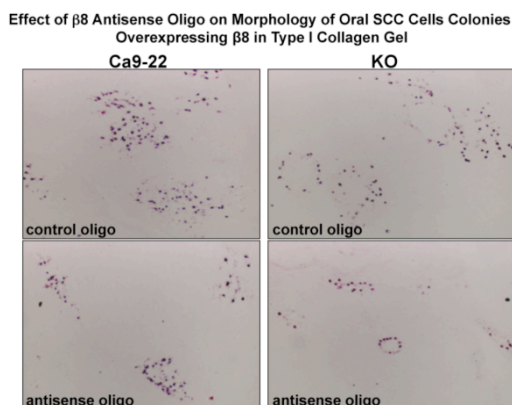


図 6

インテグリン $\beta 8$ アンチセンスオリゴが導入により、Ca9-22 及び KO では MEK のリン酸化 (図 7) と Rac1 の活性化 (図 8) が著しく抑制された。

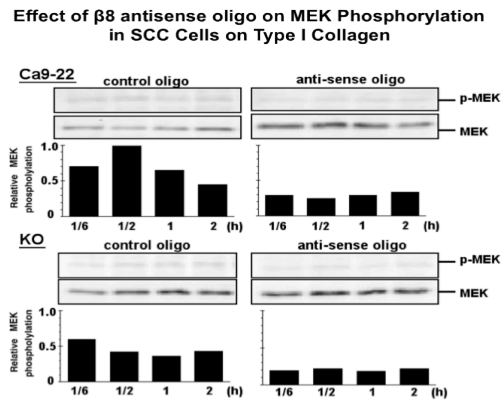


図 7

Effect of $\beta 8$ antisense oligo on Rac1 Activation in SCC Cells on Type I Collagen

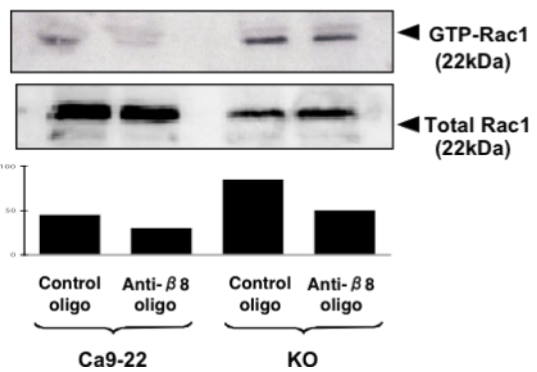


図 8

アンチセンス cDNA が導入により αv 発現が低下した KNanti αv は、ヌードマスでの造腫瘍能は低下していた。

Growth of Integrin antisense- αv Transfectants and SCCKN Cell in nude mice

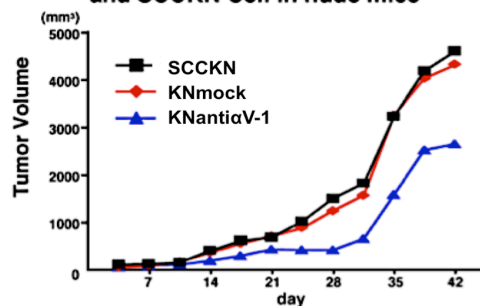


図 9

以上の結果より、インテグリン $\alpha v \beta 8$ 発現を抑制することは、MAPK シグナル伝達系や Rho ファミリーG 蛋白 Rac1 の活性化を抑制し、扁平上皮癌細胞の増殖や運動能を低下させることが示され、インテグリン $\alpha v \beta 8$ を標的とした口腔扁平上皮癌の分子標的治療が、口腔扁平上皮癌の有用な治療法のひとつとなり得る可能性が示唆された。

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)

1. Yoshioka Y, Ogawa I, Tsunematsu T, Sakaue T, Yamasaki S, Fukui Y, Havashido Y, Toratani S, Okamoto T, Ectomesenchymal chondromyxoid tumor of the tongue: insights on histogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 査読有り, 115(2), 2013, 233-240. doi: 10.1016/j.oooo.2012.11.008
2. Rosli SN, Shintani T, Havashido Y, Toratani S, Usui E, Okamoto T, 1 α , 250H2D3 down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression via NF- κ B pathway, J Steroid Biochem Mol Biol, 査読有り, 136, 2013, 98-101. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.10.011
3. Yamasaki S, Nabeshima K, Sotomaru Y, Taguchi Y, Mukasa H, Furue MK, Sato JD, Okamoto T, Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free defined medium, Int J Dev Biol. 査読有り, 57(9-10), 2013, 715-724, doi: 10.1387/ijdb.130173to.

[学会発表] (計 1 2 件)

1. 末松美玲, 林堂安貴, 坂上泰士, 藤井隆彦, 岡本哲治, 扁平上皮癌細胞でのオートファジーによるインテグリン αv のプロセシング, 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会, 2013 年 11 月 23 日, 東京
2. 藤井隆彦, 林堂安貴, 坂上泰士, 浜名智昭, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるインテグリン $\beta 6$ サブユニットの安定化に与える αv サブユニットとの二量体形成の影響, 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2013 年 5 月 24 日, 宇都宮
3. 坂上泰士, 林堂安貴, 浜名智昭, 藤井隆彦, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン/プロテアソーム系によるインテグリン $\beta 8$ の翻訳後修飾, 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2013 年 5 月 24 日, 宇都宮
4. 藤井隆彦, 林堂安貴, 坂上泰士, 浜名智昭, 岡本哲治, インテグリン $\beta 8$ におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2 (hdm2)結合部位の探索, 第 49 回日本口腔組織培養学会学術大会, 2012 年 11 月 17 日, 広島
5. Sakaue T, Havashido Y, Hamana T, Fujii T, Okamoto T, Analysis of binding site of ubiquitin ligase, human double minute 2 in integrin $\beta 8$, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 09 月 19 日, 札幌
6. 藤井隆彦, 林堂安貴, 坂上泰士, 浜名智昭, 岡本哲治, インテグリン $\beta 8$ におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2 (hdm2)結合部位の探索, 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集, 2012 年 05 月 17 日, 広島
7. 坂上泰士, 林堂安貴, 浜名智昭, 藤井隆彦, 岡本哲治, インテグリン αv サブユニットとの二量体形成が $\beta 8$ サブユニットの安定化に与える影響, 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集, 2012 年 05 月 17 日, 広島
8. 浜名智昭, 林堂安貴, 福井康人, 白砂兼光, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン・プロテアソーム系によるイ

ンテグリン β 8の翻訳後修飾, 第48回日本口腔組織培養学会学術大会, 2011年11月19日, 浦安

9. 浜名智昭, 林堂安貴, 有田裕一, 白砂兼光, 岡本哲治, ユビキチンプロテアソーム系による口腔扁平上皮癌細胞のインテグリン β 8の翻訳後修飾, 第56回(社)日本口腔外科学会総会, 2011年10月22日, 大阪
10. 浜名智昭, 林堂安貴, 有田裕一, 白砂兼光, 岡本哲治, ユビキチンプロテアソーム系による口腔扁平上皮癌細胞のインテグリン β 8の翻訳後修飾, 第56回(社)日本口腔外科学会総会, 2011年10月22日, 大阪
11. Hamana T, Hayashido Y, Fukui Y, Shirasuna K, Okamoto T, The processing integrin β 8 in oral squamous cell carcinoma cells by ubiquitin-proteasome system, 第70回 日本癌学会学術総会, 2011年8月9日, 名古屋
12. 浜名智昭, 林堂安貴, 有田裕一, 白砂兼光, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン・プロテアソーム系によるインテグリン β 8のプロセッシングについての解析, 第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2011年4月22日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 70243251

(2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)
広島大学 医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 00169153