

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253089

研究課題名(和文) カテニンを介したカドヘリン複合体ならびにWnt経路の制御による癌転移抑制剤の開発

研究課題名(英文) Development of the inhibitor for cancer metastasis through Wnt signaling pathway by catenin-cadherin complex.

研究代表者

丹沢 秀樹 (Hideki, Tanzawa)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50236775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌転移機序の解明ならびに癌治療のための転移制御薬の開発が世界中で行われているが、いまだ効果的な転移制御の方法が見いだされていない。本研究では口腔扁平上皮癌(OSCC)の細胞株を用いて、cateninと関連した細胞接着機構に着目し、癌細胞の遊離メカニズムの解明とともに転移抑制薬剤の同定とその効果判定を行った。結果として癌転移に関与する3つの遺伝子カスケードとそれを制御する転移抑制候補薬剤を同定することができた。これらの遺伝子機能を抑制することで、*in vitro*, *in vivo*における癌転移抑制を行うことができた。本結果は、口腔癌の転移抑制治療薬の開発にとって非常に有益なデータと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of cancer metastasis mechanism and development of metastasis regulating drugs for cancer treatment are being conducted all over the world. However, no effective method of controlling metastasis has not found so far. In this study, we focused on the cell adhesion mechanism associated with catenin among cancer metastasis mechanisms in the cell lines of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Furthermore, we identified the metastasis inhibitors and determined their effects. As a result, we could identify three cascades involved in candidate drugs for cancer metastasis. Inhibition of cancer metastasis *in vitro* and *in vivo* could be achieved by suppressing these functions. Our results are considered to be very useful data for development of the metastasis suppressive treatment drugs for oral cancer.

研究分野：医歯薬

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

癌治療における現在の重要課題は、癌の転移、抗癌剤耐性、放射線耐性などの制御である。これらの課題を解決・改善できれば飛躍的な治療成績の向上が見込まれる。しかし、未だに癌転移抑制薬は開発されていない。研究代表者は平成 15 年度 21 世紀 COE プログラムの拠点リーダーとして癌に対する最先端治療法を研究し、さらに、臨床応用できる薬剤を開発した。特に、抗癌剤耐性克服薬を 2 種類、放射線耐性克服薬を 1 種類開発し、前臨床試験を終了し、抗癌剤耐性克服薬に関しては臨床試験により実際の患者での有効性を確認している。転移に関しては、癌細胞における細胞接着機構の状態を分析し、細胞接着機構を制御する遺伝子、遺伝子ネットワーク、薬剤の同定に実績がある。細胞接着機構のうち、主要な因子は catenin を中心とした網の目のような関係を持ち「扇の要」の役割を果たしている。癌の転移のうち、原発巣からの癌細胞の遊離には、これらの細胞接着機構の抑制が重要な役割を果たしていると考えられているが、細胞接着機構の相互作用も含めて癌転移機構を総合的に検討されてはいない。また、これらの転移機構を制御して癌の転移を抑制・予防する薬剤の開発を行った研究も見当たらない。当教室では、多くの扁平上皮癌の臨床サンプルを用いた研究で個々の細胞接着機構の抑制が癌転移と強く相関していることをすでに報告した。さらに、各々の細胞接着機構を制御する可能性がある数種類の薬剤を検索・同定している。

2. 研究の目的

本研究では口腔扁平上皮癌 (OSCC) の細胞株を用いて、癌転移メカニズムのうち、catenin と関連した下記に示す複数の細胞接着機構について、原発巣からの癌細胞の遊離メカニズムを総合的にとらえ、俯瞰的に解明するとともに、転移抑制薬剤の開発を前臨床試験まで行う。

1. HTR2C-Lin7C-CASK- catenin-cadherin カスケード制御

2. GAD1 の catenin リン酸化阻害による Wnt 経路制御

3. Wnt- catenin-target genes (MMP 等)カスケード制御

3. 研究の方法

(1) 各メカニズムの制御遺伝子 (HTR2C, GAD1, ALY) の形質転換細胞の作製

口腔扁平上皮癌の細胞株に shRNA 導入を行い、形質転換細胞を樹立する。

(2) 各形質転換細胞における細胞接着機構を

構成する遺伝子発現解析

(1)で樹立した口腔扁平上皮癌の形質転換細胞を用いて細胞接着機構の活性を real time PCR 法にて確認する。

(3) 細胞機能解析

(1)で樹立した形質転換細胞を用いて細胞機能解析 (invasion assay, migration assay) を行い、細胞浸潤能と遊走能を評価する。

(4) マウスでの転移実験

ヌードマウスに OSCC 細胞株、コントロール細胞 (sh Mock) および遺伝子抑制細胞株 (shALY, shGAD1, shHTR2C) を移植。移植一定期間後 (約 2 か月後) に、各臓器 (腫瘍、脳、肺、胃、肝、腎、脾臓、膵臓) を取り出し、ヒト Alu 配列を用いてマウス各臓器にヒト癌細胞が転移の有無を解析する。

(5) 転移抑制候補薬剤の検索

当科の先行研究にて同定している薬剤だけでなく、文献と パスウェイ解析ソフト (IPA) を用いて転移抑制候補薬剤を検索同定する。

(6) 細胞接着機構の発現解析 (転移抑制候補薬剤を使用した場合)

同定した転移抑制候補薬剤を用いて、上記実験(2)と同様に、各細胞接着機構にどのような影響を薬剤が与えているかを real time PCR 法にて確認する。

(7) 細胞機能解析 (転移抑制候補薬剤を使用した場合)

同定した転移抑制候補薬剤を用いて、上記実験(3)と同様に、細胞機能解析 (invasion assay, migration assay) を行う。

(8) マウスでの転移実験 (転移抑制候補薬剤を使用した場合)

転移抑制候補薬剤を投与して、上記(4)と同様に *in vivo* においてマウスにおける転移実験を行い、薬剤の転移抑制効果の評価を行う。

4. 研究成果

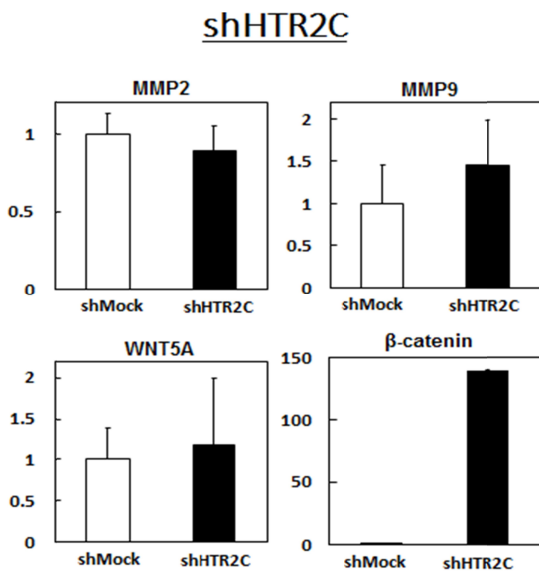
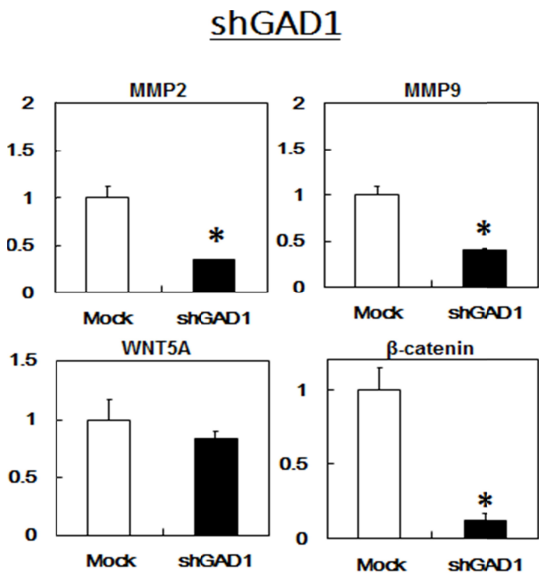
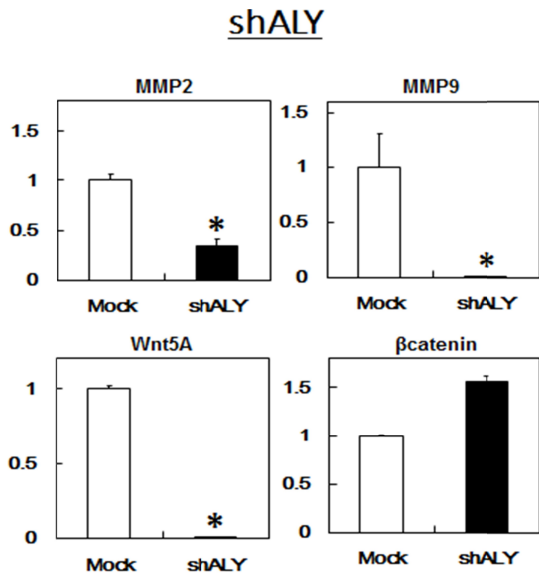
(1) 各メカニズムの制御遺伝子 (HTR2C, GAD1, ALY) の形質転換細胞の作製

口腔扁平上皮癌由来細胞株 KOSC-2, HSC-3 に対して shRNA 導入を行い遺伝子抑制細胞株を樹立した。

(2) 各形質転換細胞における細胞接着機構を構成する遺伝子発現解析

各種形質転換細胞株に対して接着機構の活性を real time PCR 法で確認した。制御遺伝子 (HTR2C, GAD1, ALY) の発現抑制株において細胞接着関連因子である Wnt-

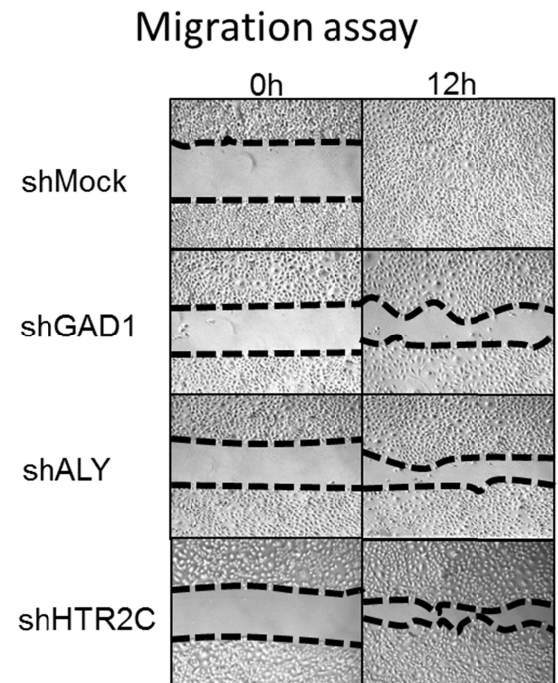
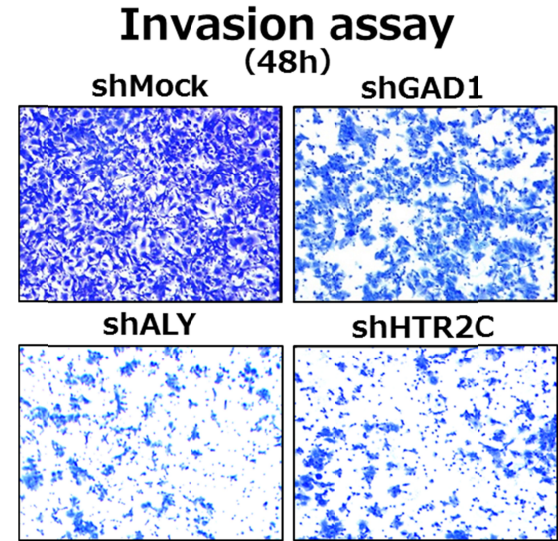
catenin-target genes (MMP 等) カスケードの制御が認められた。(図 1)



(図 1. 細胞接着関連因子 (Wnt-catenin-target genes カスケード) の制御)

(3) 細胞機能解析

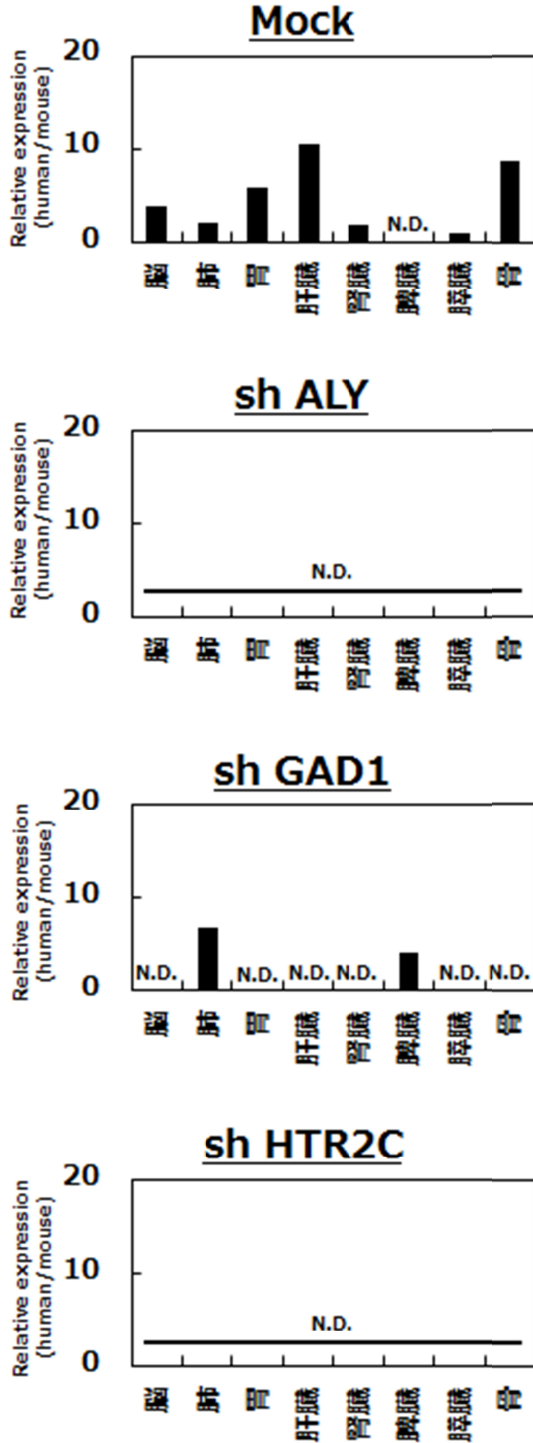
形質転換細胞株を用いて invasion assay、migration assay を行ない、細胞浸潤能と遊走能の抑制効果を認めた。(図 2)



(図 2. 形質転換細胞株における細胞浸潤能、遊走能の抑制実験の結果)

(4) マウスでの転移実験

各種遺伝子抑制細胞を移植した担癌マウスでは、コントロール細胞を移植したマウスに比べ、各臓器への転移の抑制効果が認められた。(図3)



(図3. in vivo における転移評価、遺伝子抑制による転移抑制効果)

(5) 転移抑制候補薬剤の検索

転移抑制候補薬剤を文献とパスウェイ解析ソフト (IPA) を用いて検索同定した。また細胞に作用させる至適濃度を決定した。(図4)

転移抑制候補薬剤の検索・同定

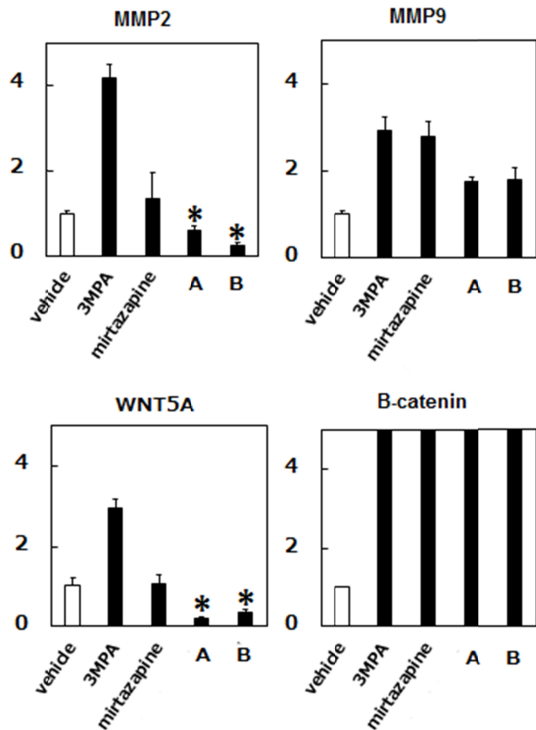
各種薬剤濃度

| 遺伝子名 | 薬剤 (転移抑制候補薬剤) | 至適濃度 | 作用時間 |
|-------|---------------|------|------|
| ALY | A | 1mM | 24H |
| | B | 1μM | |
| Lin7C | ミルタザピン | 10μM | |
| GAD1 | 3MPA | 5mM | |

(図4. 各種転移抑制候補薬剤の検索と至適濃度の決定)

(6)細胞接着機構の発現解析 (転移抑制候補薬剤を使用した場合)

各種薬剤を作用させた細胞株について解析を行ったところ、AとBにおいて細胞接着関連因子である Wnt- catenin-target genes (MMP 等)カスケードの制御が認められた。(図5)

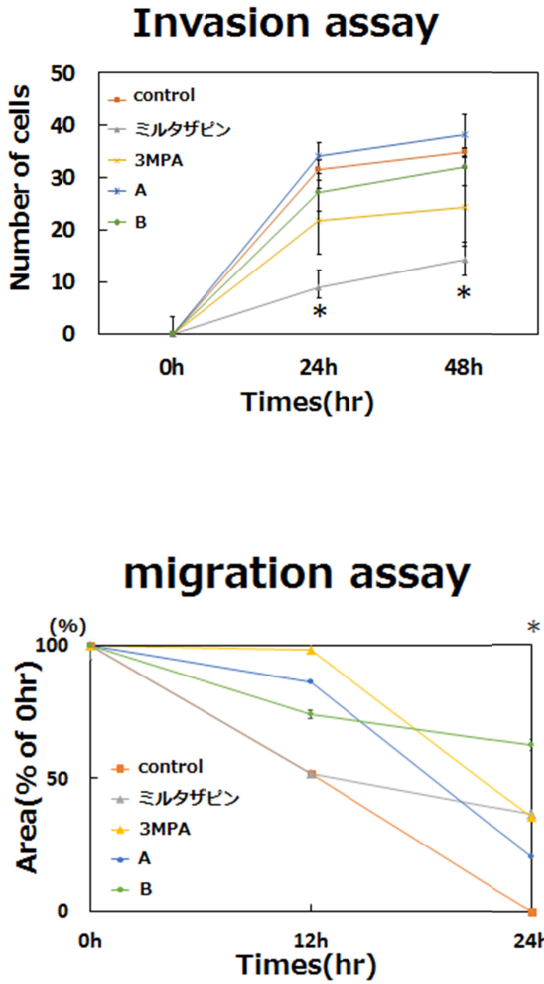


(図5. 転移抑制候補薬剤を使用した細胞接着機構関連遺伝子発現解析)

(7) 細胞機能解析 (転移抑制候補薬剤を使用した場合)

転移抑制候補薬剤を作用させた OSCC 細胞株に対して細胞機能試験 (invasion assay、migration assay) を行った。

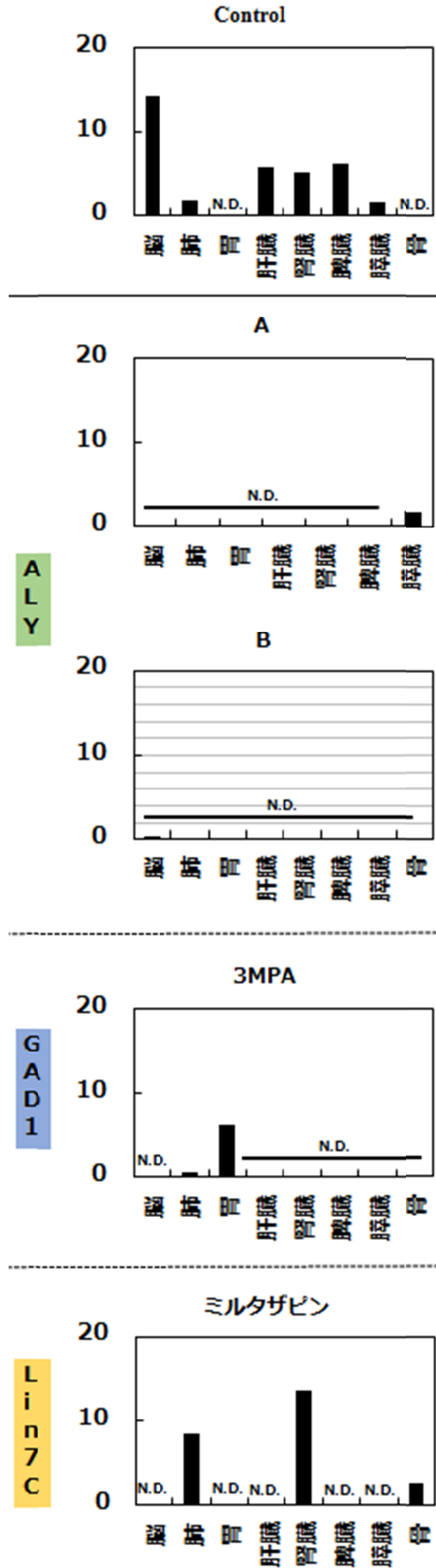
薬剤投与群では細胞浸潤能、遊走能の抑制を確認した。(図 6)



(図 6. 転移抑制候補薬剤を使用した細胞機能解析)

(8) マウスでの転移実験 (転移抑制候補薬剤を使用した場合)

癌細胞の移植をマウスに行い、一定期間飼育した。その間に薬剤投与群、非投与群 (コントロール群) に分け、転移した個体数を比較した。結果、薬剤投与群マウスでは、非投与群 (コントロール群) マウスに比べ各臓器での転移抑制効果が認められた。(図 7)



(図 7. in vivo における転移評価、薬剤投与による転移抑制効果)

[まとめ]

口腔扁平上皮癌の細胞株を用いて catenin と関連した細胞接着機構について、原発巣からの癌細胞の遊離メカニズムの解明と転移抑制薬剤の開発を行うための実験を行った。癌転移に関わる 3 つの遺伝子カスケード遺伝子(ALY,GAD1,HTR2C)を阻害することで *in vitro*, *in vivo* において転移の抑制が認められた。また、同遺伝子の働きを阻害する転移抑制候補薬剤を同定し、実際に癌細胞に作用させる、また癌細胞を移植したマウスに投与することで転移を抑制する効果を確認することができた。癌転移は様々なメカニズムにより成立していることが考えられるが、今回の一連の実験により癌転移の機序解明の糸口となる結果を得ることができた。また今後の転移抑制薬の開発に向けた有益なデータを得ることができた。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

小河原 克訓 (OGAWARA KATUNORI)
千葉大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：20372360

坂本 洋右 (SAKAMOTO
YOUSUKE)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50451745