

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462788

研究課題名(和文) 扁平上皮癌細胞特異的遺伝子をターゲットにした新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel anticancer therapy targeting specific genes for squamous cell carcinoma

研究代表者

和田 裕子 (Wada, Hiroko)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70380706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通型レセプターである deleted in colon cancer (DCC)は、リガンドである netrin-1が結合しない場合、細胞のアポトーシスが誘導されることが知られている。

本研究では、我々が新たに作製したアポトーシス誘導因子(DCC)の効果をin vitro実験およびin vivo実験にて詳細に検討した結果、DCC導入によって扁平上皮癌細胞のアポトーシスが誘導され、癌組織縮小効果の傾向が認められた。また、扁平上皮癌細胞にのみ発現する遺伝子のプロモーターに DCCを組み合わせたベクターを用いることによって、扁平上皮癌に対する新しい癌治療法の確立の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： Deleted in colorectal cancer (DCC) is a netrin-1 receptor that is involved in axon guidance and cell survival. DCC induces apoptosis when its ligand, Netrin-1, is absent.

In this study, we investigated to analyze the inducible apoptosis mechanism by the overexpression of DCC lacking Netrin-1 binding site in the carcinoma cells, and in the carcinoma tissue implanted into nude mice. The proliferation rates of DCC-overexpressing cells were significantly lower than those of controls in vitro. The size of the carcinoma tissue was decreased and the number of TUNEL-positive cells was increased in DCC vector injection group in vivo. These results suggested that DCC overexpression may induce apoptosis in vitro and in vivo. We supposed the possibility to develop a novel method of therapy against oral squamous cell carcinoma by using a new DCC vector containing the up-regulatory elements for the transcription of genes that specifically express in squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔病理学分野

キーワード：扁平上皮癌 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

口腔の悪性腫瘍の85%が扁平上皮癌である。主な治療法として切除療法が用いられているが、口腔機能や審美性の喪失を招き患者のQOLが著しく低下するケースが少なくない。したがって、外科的侵襲が少ない新たな口腔癌の治療法の確立が待望されている。無制限増殖能、浸潤および転移が、癌の特徴として知られているが、最近では、アポトーシスを回避しているということが分かってきた。2004年 Fearon と Cho らによって、正常な腸上皮基底部に存在する未分化な上皮細胞では、膜貫通型レセプターである deleted in colon cancer (DCC) とそのリガンドである netrin-1 の両因子が発現しているが、アポトーシスが起きていない腸上皮細胞では、DCCのみを発現していることが報告された。このことは、DCC 遺伝子にリガンドが結合しない場合は細胞のアポトーシスが誘導されることを示している。

我々は、netrin-1 結合部位を除去した DCC の一部をアポトーシス誘導因子 (Δ DCC) として作製し、それを癌細胞に強制発現させることでアポトーシスを誘導できるのではないかと考え、その影響を *in vitro* にて予備実験を行ったところ、扁平上皮癌細胞株において、1) 細胞増殖の抑制、2) アポトーシス関連因子の active-caspase-3 蛋白の発現上昇、3) TUNEL 陽性細胞数の増加を認められた。以上より、 Δ DCC 導入によって扁平上皮癌細胞株のアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。

一方で、臨床応用するためには、正常細胞にはアポトーシスを誘導させない選択毒性が必要である。そこで、扁平上皮癌細胞にのみ発現するベクターの作製を試みた。我々は、すでに扁平上皮癌に特異的に発現上昇する因子の検索を行った中から、S100A7 を同定している (Fukuzawa *et al.* 2006)。S100A7 は皮膚乾癬に高発現する蛋白として見出されたが、口腔癌や癌化初期マーカーの可能性も示唆されている (Kesting *et al.* 2009)。また、cytokeratin 17 (KRT17) は高分化な扁平上皮癌において高発現すると報告され (Kitamura *et al.* 2012)、扁平上皮癌に特異的に発現するマーカーとして有用であると考えられる。

これらの扁平上皮癌細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域に Δ DCC を組み合わせた治療用ベクターを作製できれば、正常細胞ではアポトーシスを起こさずに扁平上皮癌細胞だけをアポトーシスに誘導でき、患者にとって副作用の少ない治療法となりうる。また、正常扁平上皮細胞において多少の Δ DCC 発現が起きたとしても、扁平上皮細胞はターンオーバーにより角化、脱落していくため、ベクターによる正常細胞への影響は少ないと考えられる。このような扁平上皮癌をターゲットとした新たな治療用ベクターを提案できれば、口腔扁平上皮癌に対して非常に有効な治療法となりうる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず新たに作製したアポトーシス誘導因子 (Δ DCC) の効果を *in vitro* 実験および *in vivo* 実験にて詳細に検討することを目的とした。また、扁平上皮癌に特異的に発現上昇しているプロモーター領域に、 Δ DCC を組み合わせた新規扁平上皮癌治療用ベクターを作製するストラテジーを立案した。

3. 研究の方法

(1) DCC はシグナルペプチド (SP) と netrins 1 などの様々なリガンドと結合する部位 (RP) と細胞膜を貫通しているアポトーシスを誘導する部分 (NC) で構成されている。この RP を切断除去した SP と NC をコードする領域からなるアポトーシス誘導因子を pcDNA3.1 ベクターに組み込んだアポトーシス誘導ベクター (Δ DCC) の作製を行った。

(2) Δ DCC を Lipofection 法によって口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 に導入し、その影響を *in vitro* 実験にて検討した。

MTS assay を用いて HSC3 における細胞生存率を Δ DCC 導入の有無による違いを比較検討した。

この細胞増殖抑制がアポトーシス誘導によるものかどうかを検討する目的で、アポトーシス関連因子である caspase-3 の active form の発現に対する影響を Western blotting 法にて分析した。

また、TUNEL 染色によりアポトーシス誘導能を比較検討した。

(3) 免疫不全マウスの背部皮下に移植した癌細胞への Δ DCC 添加の影響について検討した。

扁平上皮癌細胞株 HSC3 をマトリゲルと混合後、注射器でヌードマウスの背部皮下に移植し、発育した腫瘍組織へウイルスエンベロープ HVJ-E を用いて Δ DCC を注入し、癌組織への影響を検索した。

マウスの体内の癌組織の発育状態を経時的に観察し Δ DCC 注入の有無による違いを比較検討した。

次に、癌組織を取り出し、腫瘍の最大断面の HE 染色を行い、その大きさを計測して比較検討した。

さらに、組織固定後、TUNEL 染色によりアポトーシス誘導能を比較検討した。

(4) 口腔扁平上皮癌細胞株における DCC とそのリガンドである netrin-1 の発現について検討した。

DCC mRNA と netrin-1 mRNA の発現をヒト表皮角化細胞株 HaCaT と扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4 で real-time PCR を用いて発現量の比較検討をした。

(5) 口腔扁平上皮癌組織において DCC と netrin-1 の抗体を用いて免疫染色を行い、発現パターンについて検討した。

(6) 口腔扁平上皮癌組織において KRT17 の抗体を用いて免疫染色を行い、発現パターンについて検討した。

(7) S100A7 プロモーター領域を利用した新規扁平上皮癌治療用ベクターの作製を行った。

扁平上皮癌に特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域に(1)で使用した新規アポトーシス誘導因子の Δ DCC 遺伝子の配列部分を接合し、pcDNA3.1 ベクターに組み込み新規扁平上皮癌治療用ベクターの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) DCC の RP を切断除去した SP と NC をコードする領域からなるアポトーシス誘導因子を pcDNA3.1 ベクターに組み込みアポトーシス誘導ベクター (Δ DCC) を作製した。

この Δ DCC を癌細胞に導入すると、細胞内領域の一部 (IC) が切断されアポトーシスを誘導できると考えた。そこで、 Δ DCC の効果を検討するために(2)と(3)の実験を行った。

(2) Δ DCC を Lipofection 法によって口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 に導入し、その影響を in vitro 実験にて検討した。

MTS assay を用いて HSC3 における細胞生存率を Δ DCC 導入の有無による違いを比較検討したところ、 Δ DCC 導入群は、control 群および空ベクター導入群と比較して有意に細胞生存率が低くなった。

この細胞増殖抑制がアポトーシス誘導によるものかどうかを検討する目的で、アポトーシス関連因子である caspase-3 の active form の発現に対する影響を Western blotting 法にて分析したところ、 Δ DCC 導入した HSC3 における Active caspase-3 蛋白の発現量は、control 群および空ベクター導入群と比較して有意に上昇していた。

また、TUNEL 染色によりアポトーシス誘導能を比較検討したところ、 Δ DCC ベクター導入 HSC3 において TUNEL 陽性細胞数が control 群および空ベクター導入群と比較して有意に多く認められた。

これらの in vitro 実験より Δ DCC 導入による扁平上皮癌細胞のアポトーシス誘導が認められた。

(3) 免疫不全マウスの背部皮下に移植した癌細胞への Δ DCC 添加の影響について検討した。

腫瘍の体積変化を測定、算出した結果、 Δ DCC vector 導入群では、control 群および空ベクター導入群と比較して腫瘍の体積が減少した。

また、 Δ DCC 導入群では癌細胞が減少し、癌胞巣が縮小し、腫瘍外周部の線維化を認めた。この腫瘍の面積および癌組織の面積を定量した結果、 Δ DCC 導入群では癌組織の面積がコントロール群および空ベクター導入群と比較して有意に減少し、癌組織の腫瘍に占める割合も有意に小さくなった。

さらに、TUNEL 染色の結果、 Δ DCC 導入群では、コントロール群および空ベクター導入群と比較して、TUNEL 陽性細胞数が有意に多く認められた。

これらの in vivo 実験より Δ DCC 導入による癌細胞のアポトーシス誘導による癌組織縮小効果の傾向が認められた。

(4) 口腔扁平上皮癌細胞株における DCC とそのリガンドである netrin-1 の mRNA の発現について検討した。

DCC mRNA は、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT より口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4 で発現が低かった。また、netrin-1 mRNA の発現は、HaCaT より HSC-2, HSC-3, HSC-4 で発現が高かった。

これらの結果より、正常のヒト表皮角化細胞株と比較して口腔扁平上皮癌細胞株では、DCC の発現が减弱し、netrin-1 の発現が強いことから、口腔扁平上皮癌細胞株では DCC の発現减弱による抗アポトーシス作用を有する可能性が示唆された。

(5) 口腔扁平上皮癌組織において DCC と netrin-1 の抗体を用いて免疫染色を行い、発現パターンについて検索した。

DCC 蛋白は、いくつかの高分化型癌組織において、癌真珠の角化層近くの有棘細胞層に一部発現を認めたのに対し、netrin-1 蛋白は、癌真珠をともなう高分化型の癌胞巣では、基底細胞層とその上部数層に発現が強く認められた。

今後、扁平上皮癌組織における DCC 蛋白と Netrin-1 蛋白の発現と、扁平上皮癌の発生の関連性の有無については、より詳細な検討が必要である。

(6) KRT17 が扁平上皮癌において特異的に発現することが報告されていることから、口腔扁平上皮癌組織における KRT17 の発現パターンについて免疫染色を行い確認した。

KRT17 は、口腔扁平上皮癌組織において、腫瘍細胞の細胞質に発現し、隣接する非腫瘍部には発現を認めなかった。高分化型 OSCC 組織では、癌胞巣の中心部に KRT17 が高発現したが、癌胞巣外側の基底層での発現は低かった。中分化型 OSCC 組織では、癌胞巣において高分化型 OSCC 組織と同様に KRT17 が高発現した。一方、癌胞巣を呈さない個々の腫瘍細胞では、癌胞巣と比較し発現は低かった。低分化型 OSCC 組織においては、腫瘍細胞における KRT17 の発現は低いものの、確かに発現していた。

以上より、KRT17 は腫瘍特異的に発現し、KRT17 の染色強度は腫瘍細胞の分化度に関連していることが示唆された。

(7) S100A7 プロモーター領域を利用した新規扁平上皮癌治療用ベクターの作製

扁平上皮癌に特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域に(1)で使用した新規アポトーシス誘導因子の Δ DCC 遺伝子の配列部分を接合し、pcDNA3.1 ベクターに組み込んで新規扁平上皮癌治療用ベクターの作製を行った。

本研究結果から、アポトーシス誘導ベクター (Δ DCC) 導入によって扁平上皮癌細胞のアポトーシスが誘導され、癌組織縮小効果の傾向が認められた。また、臨床応用するためには、正常細胞にはアポトーシスを誘導させない選択毒性が必要であるが、扁平上皮癌細胞にのみ発現する S100A7 や KRT17 などの遺伝子を利用したベクターを用いることによって、口腔扁平上皮癌に対して新しい癌治療法の確立の可能性が考えられた。

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 1 件)

Yurie Mikami, Shinsuke Fujii, Kengo Nagata, Hiroko Wada, Kana Hasegawa, Misaki Abe, Reiko U Yoshimoto, Shintaro Kawano, Seiji Nakamura, Tamotsu Kiyoshima. GLI-mediated Keratin 17 expression promotes tumor cell growth through the antiapoptotic function in oral squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. DOI 10.1007/s00432-017-2398-2, 2017 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

三上友里恵、永田健吾、和田裕子、藤井慎介、安部みさき、吉本怜子、清島保、中村 誠司. 口腔扁平上皮癌において Gli 阻害(GANT61)は細胞死を誘導する. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 28 年 8 月 25 日(札幌)

Hiroko Wada, Aki Kinjo, Yurie Mikami, Tsuyoshi Sugiura, Tamotsu Kiyoshima. Mandibular tumor. 第 27 回日本臨床口腔病理学会学術大会、口頭発表(英語) 平成 28 年 8 月 12 日(広島)

Yurie Mikami, Hiroko Wada, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura, Tamotsu Kiyoshima. A case of adenosquamous carcinoma observed in the metastatic lymph node, but not in the primary lesion. 第 27 回日本臨床口腔病理学会学術大会、ポスター発表、平成 28 年 8

月 12 日(広島)

Katsuhiko Furusyo, Hiroko Wada, Yurie Mikami, Tamotsu Kiyoshima. The expression of Netrin-1 and its receptor DCC in oral squamous cell carcinoma. Kyudai Oral Bioscience 2015 -9th International Symposium-2015, 2, 28 Fukuoka Japan

Abe M, Nagata K, Jinnou A, Tamotsu Kiyoshima. Immunocytochemical detection of glucose-related protein 78 in oral squamous cell carcinoma cell lines. Kyudai Oral Bioscience 2015 -9th International Symposium- 2015, 2, 28 Fukuoka Japan

清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆 V-ATPase 阻害剤 Concanamycin A 抵抗性口腔扁平上皮癌細胞株に対する SAHA 併用による細胞増殖抑制効果. 第 103 回日本病理学会学術大会, 平成 26 年 4 月 26 日(広島)

〔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

和田 裕子(WADA, Hiroko)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号: 70380706

(2)研究分担者

清島 保(KIYOSHIMA, Tamotsu)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 20264054

永田 健吾 (NAGATA, Kengo)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：90189134

藤井 慎介 (SHINSUKE, Fujii)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：60452786

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()