

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861703

研究課題名(和文)細胞接着装置の産生量減少による癌転移機構の解明と制御薬の検索・同定

研究課題名(英文)Resolution of cancer metastasis mechanism by decrease of cell adhesion and identification of controlled drug

研究代表者

肥後 盛洋(HIGO, Morihiro)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60724383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療における重要課題は、癌の転移、抗癌剤耐性、放射線耐性の制御であると報告されている。我々は、cadherin 複合体とdesmosome の構成要素のコード遺伝子全てに共通の発現促進作用を示すKallikrein-related peptidase 13 (KLK13) 遺伝子を同定した。本研究では、KLK13 遺伝子増強作用を有する薬剤を用いてcadherin 複合体とdesmosome の構成要素の発現増強、マウスを用いた癌転移能の抑制効果を確認することができた。この研究結果により今後の癌転移抑制薬の開発の有益なデータになることが期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various studies were reported that the important issues were the regulation of cancer metastasis, anticancer drug resistance, and radiation resistance. We identified the gene of Kallikrein-related peptidase 13(KLK13) that promoted the expression of cadherin complex and desmosome component. In this study, we confirmed the enhanced expression of these elements and the depression effect of metastatic ability in vivo by a drug enhancing KLK13 action. Therefore, these results are very useful to develop a cancer metastasis inhibitor.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発がん がん遺伝子 浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

癌治療における課題は、癌の転移、抗癌剤耐性、放射線耐性などの制御であるが、未だに癌転移抑制薬は開発されていないのが現状である。細胞接着装置のうち、主要なものは、cadherin 複合体と desmosome である。私達の本研究に先行する研究で、これらの接着装置の構成要素の発現減弱と癌の易転移性の間に強い相関性があることを確認した。癌転移を促進するためには、cadherin 複合体や desmosome の産生量を減少させるか、機能的に不完全なこれらの細胞接着装置が産生されれば良いので、必ずしも全ての構成要素の産生量を制御する必要はなく、一部の要素の産生量が低下するだけでも癌の易転移性が増加すると考えられる。しかし、転移を抑制するために細胞接着性を増加させるには、完全な cadherin 複合体と desmosome を大量に産生させなければならず、全ての構成要素の産生を増強するメカニズムが必要と考えられる。そこで、cadherin 複合体と desmosome の構成要素のコード遺伝子全てに共通の発現促進作用を示す遺伝子ネットワーク上の上流遺伝子である KLK13 遺伝子を同定した。そこで、本研究が、cadherin 複合体と desmosome の量的コントロールを KLK13 遺伝子により可能であることを証明し、KLK13 遺伝子作用薬剤を検索・同定し転移抑制薬の開発に道を拓くと考えた。

2. 研究の目的

KLK13 と cadherin 複合体、desmosome の構成要素との関係を明らかにし、癌転移機構を解明する。また KLK13 に作用する発現増強剤を検索同定し、転移抑制剤の開発シーズを追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床サンプルにおいて KLK13 の発現量および易転移性の相関関係を確認する、また cadherin 複合体と desmosome の量との関係性の確認実験を行う。

口腔扁平上皮癌(OSCCs)患者の手術検体症例を用いて免疫化学染色を行い、臨床指標との相関性を統計学的に調査する。また、手術検体を用いて cadherin 複合体と desmosome の量との発現解析を real time PCR 法にて確認する。

(2) KLK13 の発現ベクターを導入し、細胞運動能と浸潤能について機能解析を行う。

KLK13 の過剰発現により、cadherin 複合体と desmosome、構成要素全ての発現増強を real time PCR 法にて確認する。また細胞浸

潤能、遊走能試験を行い、その機能についても検討する。

(3) KLK13 の発現を抑制し、cadherin 複合体と desmosome の構成要素の発現解析、および細胞運動能と浸潤能について確認する。

2)で用いた過剰発現させた細胞株に shRNA を導入し KLK 発現を抑制させて、cadherin 複合体と desmosome、構成要素全ての発現増強を real time PCR 法にて確認する。

(4) KLK13 遺伝子の形質転換細胞を用いて、ヌードマウスを使用した癌転移との相関関係の有無を検討する。

KLK13 遺伝子の形質転換細胞をヌードマウスに移植し、4 週後にマウス各臓器への KLK13 遺伝子の発現状態と癌転移との間の相関関係の有無を検討する。

(5) KLK13 に作用する発現増強剤を同定し、cadherin 複合体と desmosome の構成要素発現量の変化や細胞運動能と浸潤能の抑制を確認する。

KLK13 に作用する発現増強剤を文献と遺伝子パスウェイ解析ソフト (IPA) を用いて検索・同定する。また、培養癌細胞に候補薬剤を投与して、cadherin 複合体と desmosome の構成要素全ての発現量の変化を real time PCR 法にて確認する。

(6) ヌードマウスへの移植癌に対する候補薬剤の効果を確認する。

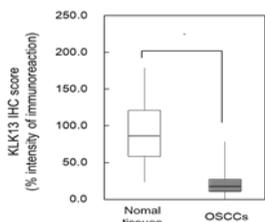
KLK13 に作用する発現増強剤を、癌細胞を移植したヌードマウスに投与し 4 週後、マウス各臓器への KLK13 遺伝子の発現状態と癌転移との相関関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 臨床サンプルにおいて KLK13 の発現量および易転移性の相関関係を確認する、また cadherin 複合体と desmosome の量との関係性の確認実験を行う。

口腔扁平上皮癌患者の手術検体症例を用いて免疫化学染色を行った。その結果、正常組織では KLK13 の発現は亢進し、OSCCs ではその発現は低下していた (図 1)。臨床指標との相関性を統計学的に調査した結果、KLK13 の発現減弱はリンパ節転移において有意な相関性を認めた。cadherin 複合体と desmosome の発現量を解析したところ、いずれの遺伝子発現も OSCCs において発

現低下していた。



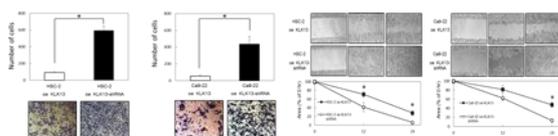
(図1 IHC スコア)

(2) KLK13 の発現ベクターを導入し、細胞運動能と浸潤能について機能解析を行う。

KLK13 を過剰発現させると、cadherin 複合体と desmosome、構成要素全ての発現増強が起こることを確認した。また、細胞浸潤能・遊走能試験では、KLK13 を過剰発現させた癌細胞において、細胞浸潤能・遊走能いずれも低下することを確認した。

(3) KLK13 の発現を抑制し、cadherin 複合体と desmosome の構成要素の発現解析、および細胞運動能と浸潤能について確認する。

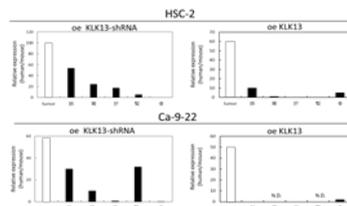
2)で KLK13 を過剰発現させた癌細胞株に shRNA を導入することで、cadherin 複合体と desmosome の構成要素全ての発現減弱が起きることを確認した。また、細胞浸潤能・遊走能ともに亢進を認めた(図2、3)。



(図2 浸潤能試験) (図3 遊走能試験)

(4) KLK13 遺伝子の形質転換細胞を用いて、ヌードマウスを使用した癌転移との相関関係の有無を検討する。

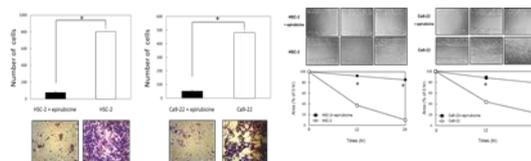
KLK13 の shRNA 導入形質転換細胞と発現ベクター導入形質転換細胞をマウスへ移植し、マウス各臓器への転移能評価を行った。結果、shRNA 導入形質転換細胞を移植した群のマウスにおいて臓器への転移割合が増加することを認めた(図4)。



(図4 マウスへの移植実験)

(5) KLK13 に作用する発現増強剤を同定し、その薬剤により、cadherin 複合体ならびに desmosome の構成要素発現量を増強し、細胞運動能と浸潤能を抑制できることを明らかにする。

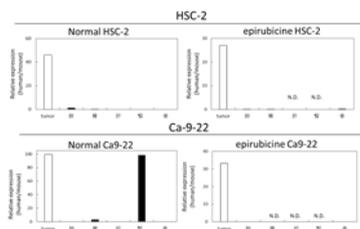
KLK13 に作用する発現増強剤を文献と遺伝子パスウェイ解析ソフト(IPA)を用いて同定した。また、培養癌細胞に候補薬剤を投与した結果、cadherin 複合体ならびに desmosome の全構成要素の発現量は増強した。コントロール群と比較し、候補薬剤を投与した群の細胞株において、細胞運動能・浸潤能の抑制を認めた(図5、6)。



(図5 浸潤能試験) (図6 遊走能試験)
(なお、特許出願のため、薬剤名を本報告では明示しない)

(6) ヌードマウスへの移植癌に対する候補薬剤の効果を確認する。

KLK13 に作用する発現増強剤を投与した癌細胞をヌードマウスに移植し、4 週間後マウス各臓器への KLK13 遺伝子の発現状態と癌転移能を評価した。その結果、KLK13 発現増強剤投与群では臓器への転移能の抑制傾向を認めた(図7)。



(図7 マウスへの移植実験)

[まとめ]

cadherin 複合体と desmosome の全構成要素産生をコントロールする KLK13 遺伝子に着目し、その遺伝子発現の変化が及ぼす癌転移能の解析を行った。また、KLK13 遺伝子増強作用を有する薬剤を検索・同定し、薬剤を用いた in vitro、in vivo における癌転移能の抑制効果を確認することができた。以上の結果は、今後の癌転移抑制薬の開発の糸口になると考えられた。現在、特許出願手続き中である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

肥後 盛洋 (HIGO, Morihiro)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60724383

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし