

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893166

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼ阻害剤を用いた口腔癌に対する分子標的治療薬の開発研究

研究課題名(英文) Development research of molecular targeted therapy for oral cancer mediated by ubiquitin ligase inhibitor

研究代表者

坂上 泰士 (SAKAUE, TAISHI)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：00735160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：HDM2は、インテグリン 8のEGF-like repeat domainに結合することで、インテグリン 8のユビキチン化を制御するユビキチンリガーゼであることが明らかになった。口腔扁平上皮癌細胞においてHDM2阻害剤はインテグリン 8蛋白発現を亢進させた。さらに、HDM2発現亢進は口腔扁平上皮癌細胞の運動能を促進させた。これらの結果より、HDM2がユビキチン/プロテアソーム系によるインテグリン 8の蛋白分解を厳密に調節し、口腔癌の浸潤・転移の制御に関与している可能性が示唆された。したがって、HDM2を標的とした分子標的治療薬が、口腔扁平上皮癌の新しい治療法になり得る可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that HDM2 was the ubiquitin ligase which regulated the ubiquitination of integrin beta 8 by binding to EGF-like repeat domains in integrin beta 8 subunit leg. Treatment of oral squamous cell carcinoma cells with HDM2 E3 ligase inhibitor led to the enhancement of expression of integrin beta 8 protein. In addition, the enhancement of expression of HDM2 protein promoted cell motility of oral squamous cell carcinoma cells. These findings indicated that HDM2 might tightly regulate the degradation of integrin beta 8 protein by ubiquitin-proteasome system, and participate in regulation of invasion and metastasis of oral cancer. Therefore, it is expected that molecular targeted therapy targeting HDM2 ubiquitin ligase has the potential to be the novel therapy for oral squamous cell carcinoma.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 インテグリン ユビキチンリガーゼ



Inverse PCR 法によるインテグリン 8 の deletion mutant の作製

8-pVP16 を鋳型として inverse PCR 法を行った。これにより 6 種の 8-pVP16 の deletion mutant ( $\Delta 1-384$ ,  $\Delta 385-769$ ,  $\Delta 577-769$ ,  $\Delta 385-576$ ,  $\Delta 385-480$ ,  $\Delta 481-576$ ) を作製した。

Mammalian two-hybrid 法

Wild type の 8-pVP16 または (4) で作製した 8-pVP16 の deletion mutant を、(3) の方法に準じて HDM2-pM および pG5SEAP とともに A431 に導入し、48 時間後の培養上清中のアルカリホスファターゼ活性を測定することで、インテグリン 8 における HDM2 の結合部位を検索した。

(5) 扁平上皮癌細胞のインテグリン 8 蛋白発現に及ぼす HDM2 阻害剤の影響についての解析

各濃度の HDM2 E3 Ligase Inhibitor で 12 時間処理した扁平上皮癌細胞におけるインテグリン 8 蛋白の発現を Western Blot 法にて解析した。

(6) HDM2 が口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に与える影響についての検討

HDM2 の open reading frame を哺乳動物ベクター pCI-neo (Promega) にサブクローニングし、pCI-neo/ HDM2 を作製した。pCI-neo または pCI-neo/ HDM2 をリポフェクタミン法にて SCCKN に導入し、得られた細胞を、それぞれ KN-Mock または KN-HDM2 とした。SCCKN, KN-Mock 及び KN-HDM2 細胞における HDM2 蛋白発現を、Western Blot 法で解析した。

ポアサイズ  $8\mu\text{m}$  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。メンブランの両面をゼラチンコートしたケモタキセルを 16mm 径培養皿に設置し、ケモタキセルの上室に  $5 \times 10^5$  個の各細胞 (SCCKN, KN-Mock 及び KN-HDM2) を浮遊させた培養液を加え、下室には培養液を加えた。12 時間培養後、メンブランをディフクイックで固定・染色し、メンブラン下面の細胞数を算定することで、細胞遊走能を評価した。

#### 4. 研究成果

抗インテグリン 8 抗体または抗 HDM2 抗体で免疫沈降した標品中に、それぞれ HDM2 とインテグリン 8 が検出されたことから、インテグリン 8 と HDM2 が複合体形成していることが示された (図 3)。

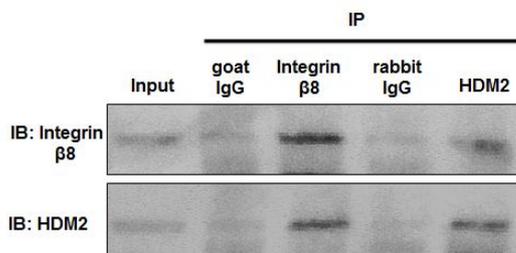


図3

HDM2-pM 及び 8-pVP16 を導入した扁平上皮癌細胞は、コントロールである pM 及び pVP16 を導入したものに比べ、アルカリホスファターゼ活性が約 5 倍に亢進したことから、インテグリン 8 と HDM2 が結合していることが示された (図 4)。

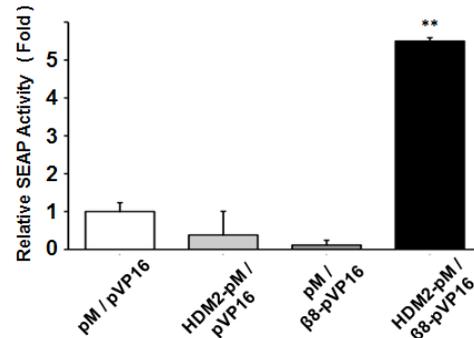


図4

インテグリン 8 の脚部の EGF-like repeat domain に存在する 481 番目から 576 番目のアミノ酸を含む領域を欠失した 8 の deletion mutant ( $\Delta 385-769$ ,  $\Delta 385-576$ ,  $\Delta 481-576$ ) では、アルカリホスファターゼ活性が、ほぼコントロールレベルまで低下した。これに対し、同領域のアミノ酸配列が欠失していない deletion mutant ( $\Delta 1-384$ ,  $\Delta 577-769$ ,  $\Delta 385-480$ ) では、アルカリホスファターゼ活性の低下がみられなかった (図 5)。インテグリン 8 の脚部に存在する EGF-like repeat domain の 481 番目から 576 番目のアミノ酸領域が、HDM2 の結合に参与している可能性が示唆された。

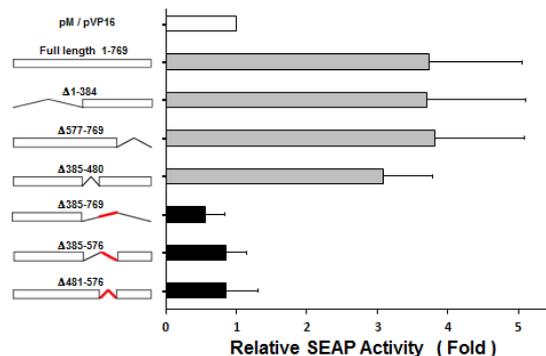


図5

扁平上皮癌細胞において、HDM2 阻害剤は濃度依存性に、インテグリン 8 蛋白発現を亢進させた。HDM2 がインテグリン 8 の蛋白分解を調節していることが示された。

SCCKN, KN-Mock 及び KN-HDM2 における HDM2 発現を、Western Blot で解析した結果、SCCKN 及び KN-Mock と比較し、HDM2 発現ベクターが導入された KN-HDM2 では HDM2 蛋白発現が亢進していた。KN-HDM2 は、SCCKN 及び KN-Mock に比べて、細胞遊走能が約 5~8 倍に亢進していたことから、HDM2 は口腔扁平上皮癌細胞の運動能を促進させることで、がん浸潤の亢進に関与することが示唆された。

以上の結果より，口腔扁平上皮癌細胞においてHDM2がユビキチン/プロテアソーム系によるインテグリン 8の蛋白分解を厳密に調節し，口腔癌の浸潤・転移の制御に関与している可能性が示唆された．したがって，ユビキチンリガーゼHDM2を標的とした分子標的治療薬が，口腔扁平上皮癌の新しい治療法になり得る可能性が期待される．

#### 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 1件)

1. Hayashido Y, Kitano H, Sakaue T, Fujii T, Suematsu M, Sakurai S, Okamoto T, Overexpression of integrin  $\alpha$  v facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin  $\alpha$  v 8 with type collagen, *Int J Oncol*, 査読有, 45(5), 2014, 1875-1882. doi: 10.3892/ijo.2014.2642.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 坂上泰士，小泉浩一，中瀬洋司，小川郁子，虎谷茂昭，岡本哲治，顎下部に髄外性病変を生じた多発性骨髄腫の1例，第60回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会，2015年10月18日，名古屋
2. 末松美玲，林堂安貴，坂上泰士，藤井隆彦，岡本哲治，扁平上皮癌細胞における sequestosome 1 を介した選択的オートファジーによるインテグリン  $\alpha$  v の蛋白翻訳後修飾，第69回NPO法人日本口腔科学会学術集会，2015年5月14日，大阪
3. 末松美玲，林堂安貴，坂上泰士，藤井隆彦，岡本哲治，扁平上皮癌細胞における sequestosome 1 を介した選択的オートファジーによるインテグリン  $\alpha$  v の蛋白翻訳後修飾，第51回日本口腔組織培養学会学術大会・総会，2014年11月15日，小倉

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

坂上 泰士 (SAKAUE TAISHI)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：00735160