

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670843

研究課題名(和文) 口腔癌におけるシナプス接着因子を標的とした新規抗血管新生療法の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel antiangiogenic therapy against oral cancer targeting synaptic adhesion molecules

研究代表者

柳川 徹 (Yanagawa, Toru)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10312852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス接着因子とは、細胞外ドメインを介した分子間相互作用により、シナプスの形成や機能面での修飾を担う細胞接着因子である。近年の研究より、血管の走行をシナプス接着因子が決定することが報告されたため、口腔癌における血管新生についてシナプス接着因子に着目し、これらを標的とした新規抗血管新生療法が可能かどうか探索するために、臨床的には口腔癌での発現と臨床病態の関連を調べ、基礎的な解析として子宮内エレクトロポレーションによるシナプス接着因子の導入を用いた解析を行い、発生生物学的手法による検討を加えた。その結果、臨床的には予後との関連が見られたが、マウスの実験では血管の変異は明らかでなかった。

研究成果の概要(英文)：Synaptic adhesion molecules are cell adhesion factors that modulate synaptic formation and function through interaction of molecules by the extracellular domain. Recent study showed some synaptic adhesion molecules regulated during vessel remodeling and form endogenous complexes. Then, we focused angiogenesis of oral cancer, and we investigated if we can use synaptic adhesion molecules as novel molecular target for antiangiogenic therapy for oral cancer. We investigated the relation between the expression of synaptic adhesion molecules and clinical factors of oral cancer. On the other hand we investigated molecular basis of synaptic adhesion molecules by using biochemical and developmental biological methods, such as in utero electroporation. We found there was significant difference in prognosis, however, supportive result which suggest abnormal angiogenic change was not obtained by in vivo experiment.

研究分野：口腔外科学

キーワード：シナプス接着因子 ニューロリギン ニューレキシン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の増殖・浸潤では癌細胞自体のもつ特性のみだけでなく、癌細胞を取り囲む癌の微小環境(Cancer micro environment)との相互作用が深く関わっていることがわかってきた。特に癌の血管新生は必要不可欠なもので、血管新生阻害薬などに代表される癌治療のターゲットとして注目されている。従来、抗血管新生療法のターゲットとして、VEGF 受容体を中心としたサイトカインシグナルの研究がさかんであるが、まだ、完全に実用化に至っていない。

(2)近年、シナプス接着因子は血管周囲細胞や血管内皮細胞に発現し、血管伸長の誘導をしていることが報告された。我々は、これに着目し、これらのシナプス接着因子が腫瘍血管の増生にどのように関わっているかを解析し、抗血管新生療法のターゲットとしての可能性を探るために、本研究の着想に至った。

(3)従来、血管新生については、血管新生因子の VEGF やトランスフォーミング増殖因子 (TGF $\beta$ )、アンジオポエチン-1/Tie2 シグナル、EphB4/エフリン-B2 シグナル、低酸素応答の転写因子の HIF などを中心に解析が行われているが、シナプス接着因子の血管誘導作用については、検討された例はく、国内・外ともに研究としては新規な着目点である。

## 2. 研究の目的

(1) 従来、抗血管新生療法のターゲットとして、VEGF 受容体を中心としたサイトカインシグナルの研究がさかんであるが、本研究では、シナプス接着因子のニューレキシン、ニューロリギンが血管の構築に重要な役割を果たすことが発見されたことに着目し研究を計画した。

(2)本研究は、シナプス接着因子の口腔癌の血管新生における役割を解明し、これをターゲットとした新規抗血管新生療法の開発に向けての統合的解析を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究方法の全体像

本研究は、I.臨床的探索として、口腔癌の手術標本を用いたシナプス接着因子の発現と臨床病態との関連の探索、II.基礎的探索として、*in vivo* の検討：マウス個体レベルでの血管の形成の変化の確認に分かれる。*in vivo* の検討では子宮内エレクトロポレーションによる部位特異的な強制発現での血管の変化を観察し、腫瘍の増殖とシナプス接着因子との関わりを探り、口腔癌の抗血管新生療法の標的となり得るか検討をおこなった。

### (2)臨床的探索

症例の選択：症例は1997年～2005年に筑波大学附属病院歯科口腔外科を受診した口腔癌患者の中から手術標本と予後が検討できる症例を選択した。

染色方法：LsAB法の免疫染色で、シナプス接着因子の中からニューレキシンとニューロリギンを選択し、免疫染色を行った。

臨床指標および対照となる免疫染色の選択：臨床指標として、患者の年齢、性別、Stage、分化、pN、p53の発現、Ki67スコア、YK分類、喫煙歴、アルコール歴を選択し、統計的にシナプス接着因子の発現の有無と臨床病態の関連性の解析を行った。

### (3)子宮内エレクトロポレーション：

#### 導入遺伝子の選択

Neurologin-2のDNA配列をコンピュータプログラムにかけて、shRNAのターゲット候補配列を複数見出し、それに対するオリゴを作成して、培養細胞HEK293に導入して、Neurologin-2の発現が抑えられるものを選択し、導入すべきshRNAのターゲットを選定した。

#### 子宮内エレクトロポレーション

選定したshRNAのプラスミドはEndo Free plasmid Kit(Qiagen)を用いて調整した。妊娠したICRマウスをペントバルビタール下で麻酔し、腹部正中に2cmの切開を加えて子宮を取り出し、E14.5のマウス胎児にDNAのマイクロインジェクションに径50 $\mu$ m以下のガラスキャピラリーを使用し、DNA溶液は3mg/ml CST shRNA, 2mg/ml EGFP and 0.1% fast green含有のPBSで調整し、1-3 $\mu$ lのDNA溶液を側脳室に注入した後、電気パルスを与えた。これらの操作は30分以内で終了し、遺伝子導入が行われたかは生後EGFPをマウスの頭蓋にブルーライトを当てて判別した。

以上によって、導入された脳の大脳皮質II/III層の錐体ニューロン特異的に遺伝子導入されたものを観察し血管の走行に変異ができるかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床的探索

口腔癌症例60例に対し、ニューレキシンとニューロリギン抗体で免疫染色を行い、発現群と非発現群に対し、年齢、性別、Stage、分化、pN、p53染色、Ki67スコア、YK分類、喫煙歴、アルコール歴などの臨床病態と、ニューレキシン・ニューロリギンの発現の有無で2群に分け、単変量解析および多変量解

析ロジスティック解析で分析したところ、いずれの変数にもシナプス接着因子の発現と関連して有意な差がなかった。

Kaplan-Meier法による生存曲線および Log Rank 検定によると、ニューレキシン発現群については、発現陽性群と陰性群では生存率に有意な差は無かった。一方、ニューロリギンについては、発現群、非発現群に有意な差 ( $P < 0.05$ ) を認め、発現群は非発現群に比べて有意に長期生存が認められた。

以上より、ニューロリギンについては、従来の因子とは異なる何らかの機序による生存率に寄与する因子であることが示唆された。

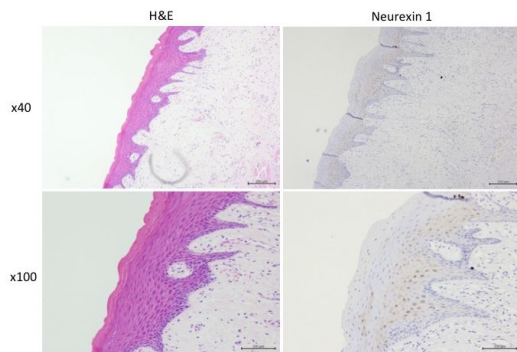


図 1. 口腔癌におけるニューレキシンの発現

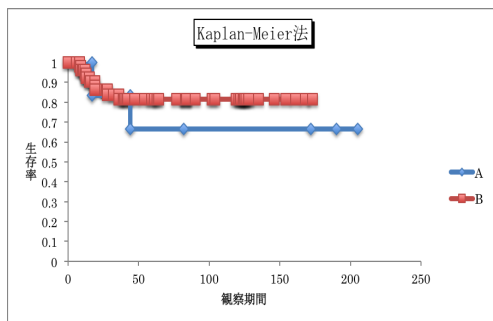


図 2. カプランマイヤー法による生存曲線  
A ニューレキシン発現群, B 非発現群  
 $P=0.47$

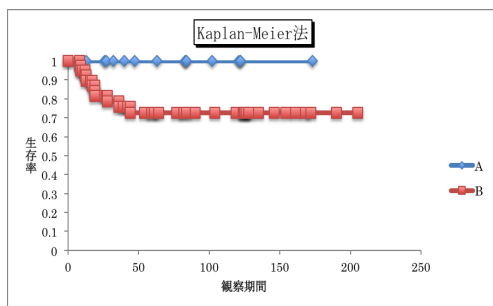


図 3. カプランマイヤー法による生存曲線

A ニューロリギン発現群  
B 非発現群  
 $P < 0.05$

## (2) 基礎的探索

基礎的探索は、子宮内エレクトロポレーションによる部位特異的ノックダウンを行うために、shRNA 配列の選択と導入を行った。

### 導入遺伝子の選択

Neuroigin-2 の DNA 配列から得られた shRNA 候補の配列は下表のとおりであった。

shRNA-oligos	Sequences	Position
Nlgn2-S1	5' GATCCCCGGGAAACCCGGTCATGCTGTTCAAGAGAACGACGATGACCGTTCTCTCTTTTA	935
Nlgn2-A1	5' AGCTTAAAAAGGAAGAAACCGGTGCTGTTCTTGAACAGCATGACCGTTCTCTCCGGG	
Nlgn2-S2	5' GATCCCCGCTGCTATGGCAATGTCATCTTCAAGAGATGACATTGCCATAGGCAGCTTTTA	1015
Nlgn2-A2	5' AGCTTAAAAAGCTGCTATGGCAATGTCATCTTGAAGATGACATTGCCATAGGCAGCGGG	
Nlgn2-S3	5' GATCCCCGGAGCAAGTTCAACAGCAAGGTTCAAGAGACCTGCTGTTGAACCTGCTCTTTTA	2120
Nlgn2-A3	5' GCTTAAAAAGGAGCAAGTTCAACAGCAAGGTTCTTGAACCTGCTGTTGAACCTGCTCCGGG	
Nlgn2-S4	5' GATCCCCGCACATAGGCTTGAACCCAGTTCAGAGACGTGGTTCAAGCCTATGTGCTTTTA	2154
Nlgn2-A4	5' GCTTAAAAAGCACATAGGCTTGAACCCAGTTCCTTGAACCTGTTTCAAGCCTATGTGCGGG	

表 1. 予測された shRNA 候補の配列

これらを HEK293 細胞に導入し、ノックダウンの効率の最も良い配列を選択した結果、Nlgn2-S1 の配列が効果が高かったため、これらを行ったため、これを選択し、子宮内エレクトロポレーションに使用する事とした。

### 子宮内エレクトロポレーション

子宮内エレクトロポレーションによって、選んだコンストラクトと、GFP を発現するコンストラクトを E14.5 のマウス胎児の脳室に打ち込み、エレクトロポレーションによってこの時期の脳室周辺 neuroblast に導入したところ、神経成熟後、LED ライトを外から当てて GFP が光っているマウスのいることを確認した。これらを選択し、大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロン特異的に遺伝子導入されたかを確認したところ図のように発現が確認された。

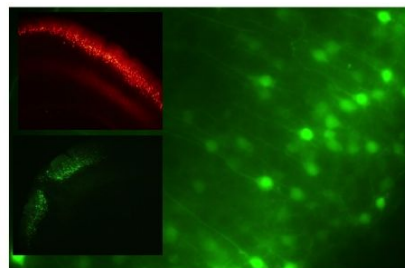


図 4. 子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子導入 : 大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロン特異的に遺伝子導入されている。

血管の走行の観察：  
血管の走行については、顕微鏡観察上は明らかな差異は認められなかった。

以上により、ニューロリギンが血管の走行に変化をもたらすかは、本研究では確証を得られなかったが、臨床的な長期予後では有意な差が出るのがわかっており、他のニューロリギン2以外のシナプス接着因子が何かしらの作用を起している可能性が示唆された。今後、新たなターゲットの絞り込みや評価法を検討し、より原因を明確にできるようにしたいと考えている。

#### 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5件)

Ko, J. S., Pramanik, G., Um, J. W., Shim, J. S., Lee, D., Kim, K. H., Chung, G. Y., Condomitti, G., Kim, H. M., Kim, H., de Wit, J., Park, K. S., Tabuchi, K. and Ko, J. PTPsigma functions as a presynaptic receptor for the glypican-4/LRRTM4 complex and is essential for excitatory synaptic transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 112(6): 1874-9. 2015. (査読有り)

Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., Takumi, T. and Okabe, S. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. **Nat Commun**. 5: 4742. 2014. (査読有り)

Um, J. W., Pramanik, G., Ko, J. S., Song, M. Y., Lee, D., Kim, H., Park, K. S., Sudhof, T. C., Tabuchi, K. and Ko, J. Calsyntenins function as synaptogenic adhesion molecules in concert with neurexins. **Cell Rep**. 6(6): 1096-109. 2014. (査読有り)

Aoto, J., Martinelli, D. C., Malenka, R. C., Tabuchi, K. and Sudhof, T. C. Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. **Cell**. 154(1): 75-88. 2013. (査読有り)

Azuma M, Yanagawa T, Ishibashi-Kanno N, Uchida F, Ito T, Yamagata K, Hasegawa S, Sasaki K, Adachi K,

Tabuchi K, Sekido M, Bukawa H. Mandibular reconstruction using plates prevent to fit rapid prototyping 3-dimensional printing models ameliorates contour deformity. **Head Face Med**. 2014 Oct 23;10:45. doi: 10.1186/1746-160X-10-45. (査読有り)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA, TORU)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 10312852

##### (2)研究分担者

田淵克彦 (KATSUHIKO, TABUCHI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 20546767