

【要約】

Decreased expression of Cavin-2
contributes to oral cancer growth

(Cavin-2の発現低下は、口腔癌の成長に寄与する)

千葉大学大学院医学薬学府

先進医療科学専攻

(主任: 丹沢 秀樹 教授)

宇野澤 元春

caveolae は、脂質貯蔵、細胞のシグナル伝達、およびエンドサイトーシスに関与している細胞膜であり、小さな陥入を形成する特殊な脂質マイクロドメインである。caveolae の主要な構成要素は、caveolin ファミリー (caveolin-1、-2、-3) である。中でも、caveolin-1 は、主要なタンパクであり、腫瘍増殖および血管新生を含む複数の癌関連プロセスを調節に関与し、caveolae 形成のために必須である。他の研究が報告している caveolae 関連タンパクである cavin (CVN) ファミリー (CVN1、2、3、4) は caveolae 形成および組織構成のために必要とされる。CVN ファミリータンパク質は、caveolin-1 と共に複合体を形成し、caveolae 生合成と機能のために重要である。

CVN2 は、カルシウム非依存性ホスファチジルセリンに結合し、血小板における主要なリン脂質結合タンパク質である。ヒト組織における CVN2 発現は、膵臓、腎臓、脳、骨格筋、胎盤、肝臓、心臓および肺で減弱しているが、癌研究において、CVN2 の細胞応答を調節する分子メカニズムは、解明されていない。私たちは、CVN2 の発現が、OSCCs の腫瘍進展の可能性を報告する。私たちのマイクロアレイデータによる癌関連遺伝子として同定した CVN2 の発現状況を調べるために、OSCCs 由来の細胞 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS、Ca9-22、HO-1-u-1、HO-1-N-1、KOSC2、および Sa3) を用いて RT-PCR および Western blot を行った。CVN2 の mRNA は HNOKs と比較して、すべての OSCCs 由来細胞株において有意に発現減弱した。CVN2 タンパク質発現も同様に、HNOKs と比較して、すべての OSCCs 由来細胞株において有意に発現減弱した。次に、免疫組織化学 (IHC) スコアリングシステムを使用して、臨床検体における CVN2 タンパク質発現を分析した。正常な口腔組織と OSCCs のよる CVN2 の IHC スコアは、90.0-205.0 (中央値、150.0) と 22.5-150.0 (中央値、75.0) の範囲であった。OSCCs における IHC スコアが大幅に減少し、通常の口腔組織よりも有意な発現減弱を認めた。CVN2 は別名 SDPR (serum deprivation response) と呼ばれ、血清欠乏培地における CVN2 発現および細胞増殖に対する効果を調べた。結果、血清欠乏時 CVN2 の mRNA は過剰発現し、細胞増殖は有意に阻害された。次に、OSCCs 由来細胞 (KOSC2 および Sa3) に CVN2 の cDNA (oeCVN2) を過剰発現するように設計された CVN2 プラスミドおよび対照ベクター (Mock) で導入した。導入した細胞を oeCVN2 細胞として CVN2 mRNA およびタンパク質の発現を調べるために、私たちは、RT-PCR および Western blot 分析を行った。oeCVN2 細胞における CVN2 mRNA 発現は有意に Mock 細胞より発現亢進を認めた。また、oeCVN2 細胞における CVN2 タンパク質レベルは、Mock 細胞と比較して発現亢進を認めた。細胞の増殖に対する CVN2 過剰発現の効果を評価するために、私たちは、細胞増殖能試験を行った。oeCVN2 および Mock 細胞を 1×10^4 細胞/well の密度で 6well plate に播種し、168 時間まで測定したところ、oeCVN2 細胞の細胞が成

長は、Mock 細胞と比較して有意に減少した。次に CVN2 過剰発現した細胞の細胞周期分析を行い、G1 期における oeCVN2 細胞の割合が有意に Mock 細胞のより有意に高値を示した。同様に G1 周期関連遺伝子群におけるタンパク発現確認を行った。その結果、サイクリン・CDK 複合体阻害因子 p21 および p27 の発現亢進、サイクリン・CDK 複合体活性化因子 cyclinD1・E および CDK2・4・6 の発現減弱を認めた。以上より CVN2 の過剰発現が G1 期で細胞周期の停止により細胞増殖を阻害したことが示唆された。

CVN2 と caveolin-1 の間の相互関係を調べるために、私たちは免疫ブロット法、RT-PCR 免疫蛍光分析を用いて、発現状態と局在を評価した。OSCCs 由来細胞株における caveolin-1 の mRNA の発現を分析した。caveolin-1 の mRNA の発現は HNOKs と比較し、OSCCs 由来細胞株の有意な発現減弱を認めた。caveolin-1 のタンパク質の発現もまた、HNOKs に比べ OSCCs 由来細胞株において有意な発現減弱を認めた。caveolin-1 の mRNA および蛋白質発現は、Mock 細胞に比べ oeCVN2 細胞 (K05C2 および Sa3) に有意に増加した。免疫蛍光では Mock 細胞が不免疫を示した免疫蛍光値では、oeCVN2 細胞で CVN2 と caveolin-1 の強い免疫反応性を示し、CVN2 は oeCVN2 細胞の細胞質に caveolin-1 と共局在していることが示唆された。

私たちは、免疫ブロット分析によって CVN2 過剰発現した細胞における ERK のリン酸化レベルを評価した。リン酸化 ERK (pERK) タンパク質のレベルは、Mock 細胞と比較し、oeCVN2 細胞において有意に減少した。これらの結果は、ERK シグナル伝達経路は、oeCVN2 細胞において有意に減弱したことを示唆した。CVN2 の過剰発現は、ERK シグナル伝達経路を制限することによって、腫瘍の進行を抑制することを示唆している。

私たちは、CVN2 が OSCCs において大幅に発現の減弱を認め、CVN2 の過剰発現が、CVN2 /caveolin-1 / ERK 経路を介して増殖活性を減少させたことが考えられた。CVN ファミリーの発現レベルは、caveolin-1 欠損マウスでは減少し、caveolin-1 と同様の発現パターンを示した。今回示したデータは、CVN ファミリーと caveolin-1 との間に相互依存性を示した。多くの研究者らは、血清欠乏が CVN2 と caveolin-1 アップレギュレーションを引き起こすことを報告している。しかしながら、血清飢餓細胞におけるこれらの分子間の相互作用は、これまで報告されていない。CVN2 は血清欠乏応答タンパク質であるので、私たちは CVN2 が血清欠乏時の最初の応答者であることを推測した。私たちの仮説と一致して、CVN2 は caveolin-1 の上流遺伝子のあることを示唆し、CVN2 過剰発現した細胞で caveolin-1 発現は劇的に増加した。caveolin-1 はシグナル伝達および細胞骨格の動態を調節し、ERK 経路と相互作用する。過剰発現した caveolin-1 は、p21 依存性経路を介して、G1 停止を誘導することによって細胞周期の進行を調

節する。CVN2 過剰発現が caveolin-1 の発現増加を介して ERK シグナル経路を不活性化し、G1 細胞周期停止を減衰させることを示唆している。caveolae は、受容体非依存性エンドサイトーシス、細胞内シグナル伝達に関与し、初期エンドソームと融合している。caveolae は、上皮成長因子受容体 (EGFR) の劣化を防止し、同時に細胞内の EGFR キナーゼ結合型シグナルを可能にする。したがって、CVN2 の発現状態は、OSCCs 患者に使用される分子標的薬：EGFR 阻害薬 (セツキシマブ) に関連し得ることが示唆された。

結論として、私たちは CVN2 が OSCCs で頻繁にダウンレギュレートされ、この分子は、ERK シグナル伝達経路の不活性化を通じて G1 期における細胞周期の進行を促進することにより腫瘍の進行に関連しているかもしれないことを示した。さらなる研究が CVN2 /caveolin-1 の相互作用および ERK シグナル伝達経路を研究するために必要とされているが、現在のデータは CVN2 が細胞増殖において重要な役割を果たしており、OSCCs ための潜在的な治療標的であり得ることを示唆した。