

平成30年6月22日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10822

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるバイオマーカーとしてのREG遺伝子の作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of effect of REG gene as a biomarker in head and neck cancer

研究代表者

岡本 英之 (Hideyuki, Okamoto)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80316075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌に対して治療前に化学療法や放射線療法に対する感受性を見極めるバイオマーカーを同定することで予後改善につながると考える。本研究では、下咽頭癌患者においてREG IIIの発現がある患者が発現のない患者に比べて有意に予後が良いことを見出した。さらに、resveratrolが頭頸部癌細胞に対して有意にREG III遺伝子の発現を誘導し、細胞増殖を抑制し、放射線やシスプラチンの感受性を高めることをin vivoおよびin vitroにおいて見出した。これらの結果からresveratrolがin vitro, in vivoにおいて頭頸部癌の進展抑制・治療効果増強といった予後改善効果が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study we demonstrated that Regenerating gene III (REG III) expression was such a marker associated with an improved survival rate for HNSCC patients. Moreover, we found that resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene) significantly increased the REG III expression in HNSCC cells, and significantly inhibited cell growth, enhanced chemo- and radio-sensitivity, and blocked cancer invasion of HNSCC cells in vitro. We found that resveratrol certainly increased the mRNA level of REG III in vivo with our in vitro observation previously. Moreover, REG III augmented the anti-tumor effect of radiation or cisplatin in vivo, and resveratrol sensitized HNSCC to irradiation and cisplatin in vivo. These data suggested that resveratrol increases the efficacy of cisplatin and irradiation through REG III expression pathway, resulting in decreased tumor growth in treating HNSCC in vivo.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：REG遺伝子 バイオマーカー 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌に対する治療として、手術・放射線治療・薬物療法があり治療成績は向上しつつあるも未だ満足できるものではない。また、頭頸部領域が咀嚼・嚥下・発声・呼吸など生活に重要な役割を果たす臓器が含まれており、その障害はQOLの低下を及ぼす。それゆえ、頭頸部癌に対する治療は癌の根治は勿論のこと、機能温存も視野に入れて治療を行うことが重要な課題である。頭頸部癌の死因の多くは局所再発と遠隔転移であり、つまり、いかに癌の浸潤・転移を制御するかが治療の要であると考えられる。

(2) *REG* 遺伝子は、元来、糖尿病学の研究過程で同定された遺伝子である。90%膵臓切除したラットにポリ ADP リボース合成酵素阻害物質であるニコチン酸アミドを連日腹腔内投与すると残存膵のランゲルハンス島(ラ島)が再生して糖尿病状態が改善することを見出され、この再生ラ島で特異的に発現している遺伝子を膵臓β細胞の増殖因子として単離同定したものが *Reg* (Regenerating gene) である (Terazono K, et al. J Biol Chem, 1988.)。膵臓β細胞の再生増殖の機序は、β細胞内で *Reg* 遺伝子が発現し、*Reg* 蛋白が形成され、オートクリン、パラクリンに *Reg* 受容体に作用することで、β細胞の増殖を引き起こすことがわかってきた (Okamoto H, et al. Diabetes, 2002)。

その後、*Reg* や *Reg* 関連遺伝子の存在が見出され、*Reg* family として認識されるようになっており、現在 I から IV までの subtype が同定されている。*REG* 遺伝子と病気の間連については、糖尿病以外にも潰瘍性大腸炎、クローン病、ピロリ菌感染胃炎などの慢性炎症疾患との間連を示した報告があり、さらに近年様々な悪性腫瘍の進展・予後・治療効果との間連性が報告されている(表 1)。

表 1 *REG* family と癌種の間連

<i>REG</i> family	癌種
<i>REG</i> Iα, <i>REG</i> Iβ	胃癌、食道癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌
<i>HIP/PAP</i>	大腸癌
<i>REG</i> IV	胃癌、大腸癌、前立腺癌、脳腫瘍

2. 研究の目的

頭頸部癌に対して治療前に化学療法や放射線療法に対する感受性を見極めるバイオマーカーを同定することで予後改善につながると考える。

C 型肝炎ウイルス感染と肝癌、HPV 感染と子宮頸癌、ピロリ菌感染と胃癌など慢性炎症と癌との間連に関する報告も多くみられる。*REG* 遺伝子に関しても慢性炎症疾患や悪性腫瘍との間連した報告が多くみられその間連性が考えられている。食道、胃、

大腸などの消化器系癌において *REG* 遺伝子の発現が認められ、予後や治療に対する感受性を反映することが報告されている (Macadam RC, et al. Br J Cancer, 2000 ; Violette S, et al. Int J Cancer, 2003 ; Yonemura Y, et al. Cancer, 2003 ; Dhar DK, et al. Cancer, 2004 ; Bishnupuri KS, et al. Gastroenterology, 2006 ; Hayashi K, et al. Cancer Sci, 2008)。今回、消化器系臓器の起点でもある口腔・咽頭領域においても、*REG* 関連遺伝子の発現が頭頸部癌の進展に關与する可能性があることに着目し、頭頸部癌の予後と *REG* 遺伝子の間連性を検討し、癌の増殖・浸潤・転移の制御、および治療感受性の予測への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌症例における *REG* 遺伝子の発現と、発現の有無による治療効果や予後の違いについての検討

A. *REG* 発現の解析

初期治療として化学放射線療法を施行した頭頸部扁平上皮癌症例を対象に、生検で得られた組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片から mRNA を抽出し real-time RT-PCR にて *REG* family の発現の有無を調べる。

B. 発現の有無と予後・治療効果の間連性の検討

REG (I から IV の各 subtype ごと) の発現の有無で症例を 2 群に分け、生存率や治療効果・再発の有無などを比較検討する。

(2) *REG* 遺伝子を導入した頭頸部癌細胞株における *in vitro* での細胞増殖、浸潤及び抗癌剤・放射線感受性に関する検討

A. 遺伝子導入細胞の作製

頭頸部扁平上皮癌細胞株 (FaDu) に、control vector (pCI-neo mammalian expression vector; Promega)、およびヒト *REG* の cDNA を pCI-neo に組込んだ vector を遺伝子導入し、Geneticin® (Invitrogen) で selection した後、それぞれの遺伝子の発現を real-time RT-PCR 法で確認し、安定株を作成する。

B. 細胞増殖度の解析

これらの細胞株を用いて、*REG* 発現株と非発現株における細胞増殖度の差を WST-8 assay を用いて検討する。

C. 浸潤能の解析

REG 発現株と非発現株における浸潤能の差を Matrigel invasion assay を用いて検討する。

D. 抗癌剤・放射線感受性の解析

REG 発現株と非発現株における抗癌剤・放射線に対する感受性を WST-8 assay を用いて検討する。

(3) 頭頸部癌の予後改善の観点から、REG 遺伝子発現を調節する誘導因子の検索とその因子による *in vitro* での癌増殖及び治療感受性への影響の検討

A. ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたスクリーニング

REG 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したルシフェラーゼレポーターベクター(pGL4.17 [Luc2/Neo]vector) を使用し、そのプラスミドを頭頸部癌細胞株 (FaDu) に遺伝子導入した安定型細胞株作成し、様々な候補物質を付加することによるルシフェラーゼ活性の程度を測定する。

B. real-time RT-PCR 法を用いて REG 遺伝子の mRNA の発現の違いを検討する。

頭頸部癌細胞株 (FaDu) を培養し、候補物質を付加した上で real-time RT-PCR 法で mRNA の定量を行う。

C. 候補物質による頭頸部癌細胞に対する増殖能、浸潤能、治療感受性への影響を検討

頭頸部癌細胞株 (FaDu, HSC-4) において、REG 遺伝子の誘導因子の付加による影響を (2)-B, C, D と同様の方法で検討する。

(4) *in vivo* における頭頸部癌に対する REG 遺伝子発現およびその誘導因子による治療感受性への影響の検討

A. *in vivo* モデルの作成

ヌードマウスの大腿部皮下へ頭頸部癌細胞 (FaDu) を移植した Xenograft モデルを作製する。

B. REG 遺伝子発現の有無による腫瘍増殖能、治療感受性の違いの検討

(2)-A で作成した細胞株を用いて、REG 遺伝子発現、非発現株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍容積で増殖能の差や、放射線や化学療法に対する治療の感受性の差を検討する。

C. REG 遺伝子の誘導因子の有無による腫瘍増殖能、治療感受性の違いの検討

(4)-A にて作成したモデルを用いて、誘導因子の投与による腫瘍容積で増殖能の差や、放射線や化学療法に対する治療の感受性の差を検討する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部癌症例における REG 遺伝子発現と予後

下咽頭扁平上皮癌患者の生検組織からサンプルを採取し、REG family の mRNA の発現を解析し、REG III, HIP/PAP, REG IV の発現を認めた。さらに、それぞれの遺伝子の発現の有無で予後解析をし REG III の発現がある

患者が発現のない患者に比べて有意に予後が良いことを見出した(図 1)。

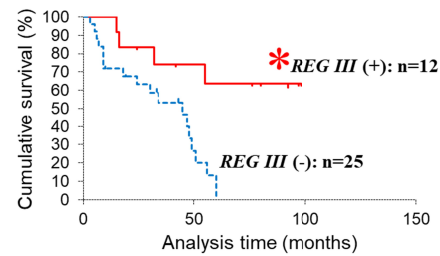


図 1 下咽頭癌患者における REG III 遺伝子の発現と予後

(2) REG III 遺伝子を導入した頭頸部癌細胞株における細胞増殖、浸潤及び抗癌剤・放射線感受性 (*in vitro*)

REG III 発現株は非発現株に比べて、有意に増殖能・浸潤能を抑制すること、さらに、放射線やシスプラチンの感受性を高めることが示唆された。

(3) REG III 遺伝子発現の誘導因子の検索とその因子による予後改善への影響 (*in vitro*)

炎症性サイトカイン、増殖因子、発がん抑制作用の報告をみるポリフェノール類、その他の REG family の発現制御の報告をみるチアゾリジン誘導体など計 31 種類を候補物質としてスクリーニングを行ったところ、ポリフェノールの一種である resveratrol が頭頸部癌細胞に対して有意に REG III 遺伝子の発現を誘導することを見出した(図 2)。

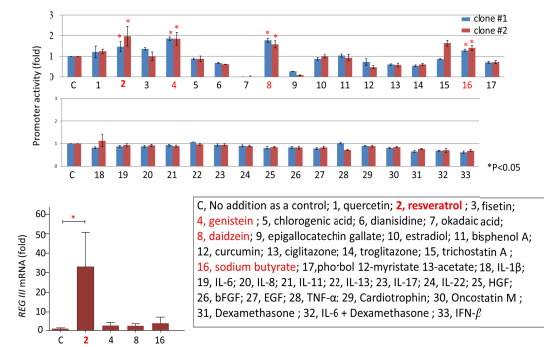


図 2 誘導因子による REG III 遺伝子発現

さらに、resveratrol による頭頸部癌細胞への影響を *in vitro* で確認すると、resveratrol 投与群は非投与群に比べて有意に増殖能・浸潤能を抑制すること、さらに、放射線やシスプラチンの感受性を高めることが示唆された。

(4) 頭頸部癌に対する REG III 遺伝子発現および誘導因子 resveratrol による治療感受性への影響 (*in vivo*)

in vivo モデルとしてはヌードマウスの大腿部皮下に頭頸部癌細胞を移植した Xenograft モデルを作製し、腫瘍組織の容積を測定して検討した。REG III 遺伝子発現によって有意に放射線・シスプラチンの感受性が増強されること、また、誘導因子である resveratrol の投

与によっても同効果が得られることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者、研究協力者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Mikami S, Ota I, Masui T, Itaya-Hironaka A, Shobatake R, Okamoto H, Takasawa S, Kitahara T. Effect of resveratrol on cancer progression through the REG expression pathway in head and neck cancer cells.

Int J Oncol. 49(4):1553-1560, 2016.

Ota I, Masui T, Kurihara M, Yook JI, Mikami S, Kimura T, Shimada K, Konishi N, Yane K, Yamanaka T, Kitahara T. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. Oncol Rep. 35(1):261-266, 2016.

[学会発表] (計 6 件)

三上慎司、太田一郎、榊井貴史、上村裕和、木村隆浩、木村直幹、西村在、岡本英之、山中敏彰、高沢伸、北原紘：頭頸部癌における *REG III* 発現誘導を介したレスベラトロールの癌増殖・浸潤への影響 第 41 回日本頭頸部癌学会 2017 年 6 月 8 - 9 日、京都。

Ota I, Masui T, Yook JI, Mikami S, Kimura T, Uemura H, Okamoto H and Kitahara T: The mechanism of cancer invasion and metastasis through EMT signaling in head and neck cancer. 5th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology (ASHNO) March 23-25, 2017, Bali, Indonesia

Mikami S, Ota I, Masui T, Takasawa S: Effect of resveratrol on cancer progression through the REG III expression pathway in head and neck cancer cells. 第 75 回日本癌学会 2016 年 10 月 6 - 8 日、横浜

Mikami S, Ota I, Masui T, Uemura H, Okamoto H, Yamanaka T, Kitahara T: Effect of resveratrol on cancer progression through REG III expression pathway in head and neck cancer cells. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer July 16-20, 2016, Seattle, USA.

三上慎司、太田一郎、榊井貴史、上村裕和、木村隆浩、岡本英之、山中敏彰、高沢伸、北原紘：頭頸部癌細胞におけるレスベラトロールの *REG III* 発現誘導効果の検討 第 40 回日本頭頸部癌学会 2016 年 6 月 9 - 10 日、埼玉。

Ota I, Masui T, Mikami S, Uemura H, Okamoto H, Yamanaka T, Kitahara T: Helicobacter pylori CagA promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. 4th ASHNO June 3-6, 2015, Kobe, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~oto/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 英之 (OKAMOTO, Hideyuki)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80316075

(2) 研究分担者

太田 一郎 (OTA, Ichiro)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00326323