

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20387

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における炎症性発癌機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of inflammatory carcinogenesis mechanism in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

長井 健太郎 (Nagai, Kentaro)

宮崎大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80750570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究でJAK-STAT情報伝達系活性化に伴うOSCC発症の分子機構を明らかにすることを目的として行った。現在我々は高密度SNPアレイ解析や網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた統合的ゲノム解析を行い、OSCCに特異的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子を単離し、これまでにインターフェロン誘導遺伝子群(ISG)としてAIM2、IFI6を同定しており、今回我々はさらに検体を増やし、ゲノム解析を行っている。また、OSCC発症へ寄与が考えられるBST2の機能解析についてもOSCC細胞株にshRNA発現ベクターを導入し、細胞増殖、接着能、アポトーシス能について研究中であり、論文作成を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism of OSCC onset associated with activation of JAK-STAT signal transduction system. Currently, we performed integrated genome analysis combining high-density SNP array analysis and comprehensive gene expression analysis, and isolate cancer gene and tumor suppressor gene specific to OSCC, AIM2 and IFI6 have been identified as interferon-inducible gene group (ISG) so far, and we have further increased the number of specimens and performed genome analysis. In addition, we are also studying cell proliferation, adhesion ability, apoptotic ability and introduction of shRNA expression vector into OSCC cell line for the functional analysis of BST2, which is considered to contribute to onset of OSCC.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：OSCC 口腔腫瘍 ISGs JAK-STAT NDRG2

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、世界のトップ 10 に入る高頻度の固形がんであり、その大部分が口腔扁平上皮癌(OSCC)である。早期発見ができておらず、ステージ 3-4 に成ったの発見から、その 5 年生存率は 50%程である。治療法も特異的な分子治療薬としては抗 EGFR 抗体が近年開発されたが、治療成績が格別に良くなったわけでもなく、さらなる治療法の開発、早期診断法の開発が求められている。

我々は、OSCC の新規治療法、早期診断法の開発を目的として高密度 SNP アレイ解析、網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた統合的ゲノム解析を行い、OSCC に特異的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子を単離してきている。これまでに、インターフェロン誘導遺伝子群(ISG)として、AIM2、IFI16 を同定し発表した(kondo et al Cancer Sci. 2012)。これらの結果を基に、遺伝子発現解析を進めたところ、2 遺伝子の他に、BST2、IFI6 等の 17 ISG 遺伝子群が、同様に高発現していることが分かってきた。このように一群の ISG が高発現していることから、インターフェロン情報伝達系(JAK/STAT)の活性化が重要と考えられるため、JAK/STAT 情報伝達系の活性化状態を検討したところ、STAT1/STAT3 の恒常的高リン酸化状態を同定した。また他施設論文においても OSCC における最も活性化された情報伝達系として、Pathway 解析により JAK/STAT 系並びに IFN- γ 情報伝達系の活性化が報告されている(Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008)が、OSCC の exome シークエンス解析においては、ドライバー変異のある情報伝達系として JAK/STAT 系が含まれておらず、新たな活性化機構が考えられる。

一方我々は、OSCC のがん抑制遺伝子として、N-myc downstream gene 2 (NDRG2)を同定している(Furuta et al, BBRC 2010)。この遺伝子は、成人 T 細胞白血病(ATLL)を含む数多くの固形がんにおいてもがん抑制遺伝子候補として発表されており、我々も数多くの OSCC 検体及び細胞株において、NDRG2 がプロモーターメチル化による発現低下、さらに PI3K/AKT 情報伝達系の活性化に重要な働きをしていることを同定した。さらに我々は NDRG2 は PP2A フォスファターゼを PTEN にリクルートする PP2A リクルーターとして PTEN 脱リン酸化酵素複合体であることを突き止めた(Nature Commun. 2014)。またストレス応答遺伝子として、JAK/STAT を抑制することが報告されているため、NDRG2 を OSCC 細胞株に過剰発現させると STAT3 が脱リン酸化され、細胞増殖が抑制、さらに BST2、IFI6、IFI44 遺伝子の発現が低下した。この NDRG2 強制発現による STAT3 脱リン酸化反応は、

PP2A 阻害剤であるオカダ酸の添加により解除されることから、NDRG2/PP2A 複合体が STAT3 の脱リン酸化に関わることが示唆された。従って今回同定した OSCC における ISG 遺伝子群の活性化機構の原因の一つが、NDRG2 遺伝子発現低下による、STAT3 脱リン酸化機構の停止から、JAK/STAT 情報伝達系の恒常的活性化に繋がっている可能性が有る。従って、この研究では、新たな NDRG2 による JAK/STAT 情報伝達制御機構の解明と、OSCC における ISG 高発現に依存した OSCC 発症機構の解明に繋がる可能性が有り、将来的に、JAK/STAT 情報伝達系を抑制する新規治療法開発につなげることを目標として研究を進めたい

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌(OSCC)は世界でも罹患率が非常に多く、その生存予後は全体で 5 年生存率が 50%程度である。われわれは以前の研究によりインターフェロンの下流に存在するインターフェロン誘導遺伝子群(ISGs)が高発現している事を突き止めた。インターフェロンは炎症や感染によって活性化され、ISGs はそのシグナルにより発現する遺伝子群である。そこで、この ISGs の高発現の原因が OSCC においてどのような意義があるのか、OSCC では炎症から惹起するこのシグナルの異常活性化を踏まえて検討することにより、OSCC における発症機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

○NDRG2 発現レベルと JAK/STAT 情報伝達系の活性化

・NDRG2 発現低下 OSCC 細胞株において、NDRG2 の強制発現は STAT3 リン酸化を低下させ、下流の ISG 遺伝子群発現を抑制するが、NDRG2 発現を有する他の上皮系細胞株に対して shRNA 発現による NDRG2 knockdown 実験を行い、NDRG2 の機能を明らかにする。また、OSCC におけるにおいて interferon receptor 等を介しての JAK/STAT 活性化が考えられるため、JAK 阻害剤による検討を行う。JAK 上流からの刺激がある場合には、その特異的レセプターを検討同定し、活性化機構の一端を明らかにする。

○PP2A・NDRG2 複合体を介した STAT3 脱リン酸化機構の解明

・PP2A 阻害剤であるオカダ酸の投与により OSCC 細胞株では、NDRG2 強制発現による STAT3 脱リン酸化(Tyr705)の抑制活性を示している。そこで、STAT3/NDRG2 複合体、STAT3/PP2A 複合体、STAT3/NDRG2/PP2A 複合体の形成を coimmunoprecipitation を用いて、293T 細胞株における強制発現系と、上皮

系細胞株 HaCaT 細胞における内在性 STAT3/NDRG2/PP2A の結合様式を検討する。STAT3/NDRG2 の結合ドメイン構造を明らかにするため、各種欠失変異体を作成し、293T 細胞株に強制発現させ、結合ドメインを決定する。

NDRG2 強制発現による STAT3 脱リン酸化(Tyr705)が、NDRG2/PP2A 特異的な脱リン酸化であることを証明するために、Tyr705 を含むリン酸化ペプチドを合成し、NDRG2 と PP1、PP2A、PP5 を強制発現させた 293T 細胞抽出液を *in vitro* で混合し、脱リン酸化反応の NDRG2/PP2A 特異性を検討する。

STAT3 への PP2A のリクルートに関しては、14-3-3 が行っていると言う論文がある(Plos One, 2014)。実際に 14-3-3 が NDRG2/PP2A コンプレックスに含まれているのか NDRG2 共沈降実験により確認を行う。14-3-3 の関与が明らかになれば、その情報伝達がどのように制御されているのか、過剰発現系、knockdown 実験系にて明らかにする。

○OSCC における SOCS 遺伝子群による JAK/STAT 情報伝達系抑制機能と NDRG2 による抑制機構との相違点

・今回新たに JAK/STAT 情報系を負に制御する新たな分子機構を提唱しているが、これまで JAK/STAT 情報伝達系を負に制御していることが報告されている SOCS ファミリーは OSCC ではどのように働いているのかが明らかではない。我々のデータによると、OSCC においては SOCS 遺伝子群の変化は認められてない。つまり SOCS 遺伝子ファミリーによる JAK/STAT 情報系の制御は OSCC においては重要ではなく、他からの制御によるものと考えられる。ここで、NDRG2 が SOCS1 を介して STAT3 を活性化するという報告がある(BBRC, 2007)。そこで、NDRG2 による間接的な STAT3 の情報伝達系が存在する可能性がある。そこで、OSCC における SOCS 遺伝子ファミリーの発現とその抑制機能を調べ、さらに 293T 細胞など、正常細胞系での OSCC における JAK/STAT 情報系の活性化機構への SOCS 遺伝子ファミリーの関与を検討し、NDRG2/PP2A 複合体の働きとの相違点を明らかにする。

OSCC 細胞株 SAS に NDRG2 を強制発現すると、STAT3(Ser727、Tyr705)が特異的に脱リン酸化される。さらに SAS 細胞株をオカダ酸で処理すると、100 nM 以上の濃度で、この STAT3 Tyr705 のみが再リン酸化されることから、NDRG2 の STAT3 脱リン酸化機能は、Tyr705 に関して PP2A を主とする phosphatase の活性に依存していることを示唆している。

○ISG 遺伝子群による OSCC 発症機構への関与

・これまでに、AIM2 IFI16 遺伝子が、p53 不活化に伴い、がん抑制遺伝子からがん遺伝子として働くことを同定し、OSCC の発症への関与を明らかにしてきた。同様に OSCC 発症へ寄与が考えられる、IFI6 と BST2 について、その性状を明らかにする。IFI6 は細胞内因子で有り、アポトーシス阻害や、乳がんでの悪化因子(Oncogene 2012)として報告がある。従って OSCC においても何らかのがん細胞維持に関わることが示唆されるので、機能解析を、強制発現、knockdown 実験、並びに結合タンパク質を質量分析計により網羅的に解析し、機能を明らかにする。また BST2 は表面抗原で有り、ISG であるため、正常の上皮細胞では発現が見られないため、分子標的として考えられる。BST2 は HIV や HTLV-1 において、感染に伴い ISG として発現し、細胞表面でのウイルスの分泌を抑える生体防御を担っている。OSCC でもヒトパピローマウイルス(HPV)を初めとして、口腔内感染症が刺激となり、OSCC 発症に関わる可能性が高いことから、BST2 の機能解析を行う。BST2 特異的 ShRNA 発現ベクターを作成し、OSCC に導入し、細胞増殖、接着能、アポトーシス能等を検討する。また 抗ヒト BST2 抗体を中外製薬より供与してもらっており、OSCC 細胞株での抗体投与による細胞増殖能の阻害等の検討を行う。

○*In vivo* 実験による OSCC 発症に関わる NDRG2、JAK/STAT 情報伝達系

・NDRG2 欠損マウスは T リンパ腫を初め、肝臓がん、肺がんなどの多くの種類の固形がんが発症するが、発症まで生後 1 年ほどかかるため、付加する因子群が必要である。JAK/STAT 情報伝達系の活性化が発がんでの役割を明らかにするために、JAK2 活性化型 TG マウス(宮崎大学医学部、下田先生より供与予定)を掛け合わせ、がんの発症を検討する。

4. 研究成果

本研究で JAK/STAT 情報伝達系活性化に伴う OSCC 発症の分子機構を明らかにすることを目的として行った。現在我々は高密度 SNP アレイ解析や網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた統合的ゲノム解析を行い、OSCC に特異的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子を単離し、これまでにインターフェロン誘導遺伝子群(ISG)として AIM2、IFI6 を同定しており、今回我々はさらに検体を増やし、ゲノム解析を行っている。

また、OSCC 発症へ寄与が考えられる BST2 の機能解析についても OSCC 細胞株

に shRNE 発現ベクターを導入し、細胞増殖、接着能、アポトーシス能について研究中であり、論文作成を行っている。

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)

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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

長井 健太郎 (NAGAI Kentaro)

宮崎大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80750570

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

野海 健太 (NOUMI Kenta)