

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20587

研究課題名(和文) 転写因子Brachyury及びID1を用いた口腔癌細胞における休眠療法の開発

研究課題名(英文) A development of Dormancy treatment for oral cancer cell using transcription factor Brachyury and ID1

研究代表者

小林 洋輔(kobayashi, yosuke)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60636554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では2つ遺伝子、T-box転写因子Brachyuryと、E-box転写因子に働くID1転写因子を用いて腺様嚢胞癌細胞にて発現を抑制し、休眠状態(Dormancy)が得られるかを調べた。まず、In vitroにおけるBrachyuryとID1発現抑制による細胞増殖抑制効果の確認とIn vivoにおけるBrachyuryとID1発現抑制による移植腫瘍増殖抑制効果の確認を行った。いずれの調査でも、両転写因子の発現の調節により、細胞の増殖効果や移植腫瘍増殖抑制効果に影響を及ぼすことが確認できた。今後はIn vivoにおいて、腫瘍の遠隔転移の抑制が可能かどうかの検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：This study was planned to investigate and to acquire the tumor dormancy in the salivary gland cancer cell line by suppressing of the expression of transcription factor Brachyury and/or ID1. First, the effect of the suppression of these two genes was investigated in vitro. The drastically suppression of cell proliferation ability by down regulation of these two genes was observed in the salivary gland cancer cell line. Next, the in vivo experiment was performed using nude mice to check the tumor growth of xenograft. These experiment also indicated suppressive effect of the tumor formed in the lateral flank of the mice. The result of these two investigations suggested that the down regulation of Brachyury and/or ID1 must be effective for the suppression of salivary gland cancer cell proliferation and tumor growth, which could lead to the tumor dormancy therapy.

研究分野：腫瘍

キーワード：Brachyury ID1 Dormancy

1. 研究開始当初の背景

これまで当研究室では、様々な癌腫において治療耐性の原因として癌幹細胞の存在が指摘されており、その制御に転写因子 Brachyury が関与する事を明らかにしてきた。そして、Brachyury が癌幹細胞を標的とした治療に有用な標的分子であり、臨床応用へ発展させるための遺伝子治療の新しいツールとして応用できる可能性を証明してきた。しかし、癌のみならず、このような胎生期の発生、分化の過程にも関わる転写因子は Brachyury の他にも数多く存在する。E-box 転写因子である ID1 などはその候補としてあげられる

しかしこれらの遺伝子独立では、癌細胞を死滅させるには至らず、これは他の遺伝子でも同様である。このように、癌のアキレス腱となる遺伝子は当然一つではなく、複数の遺伝子の変異や増幅、欠失が関与しているの言うまでもない。

このような結果から、より効果を期待し、Brachyury と ID1 のダブルノックダウンにより、特定の癌腫に限れば、癌細胞そのものを全て死滅させなくても、Dormancy が得られれば患者の得られるメリットは大きいと思われた。

2. 研究の目的

ヒト口腔癌の組織型は約 90% は扁平上皮癌であり、残りの 10% を唾液腺癌、肉腫と言われている。残り 10% の中で肉腫が占める割合は多い物ではなく、唾液腺癌がほとんどと言っても良い。全癌腫を考えたときに、唾液腺癌の占める割合は決して多いものではなく、さらに、この癌腫は外科的

切除以外の有効な治療法は現在確立されていない。

ただ、発育が遅い特徴を持つ物も多く、今までの多くの癌治療のアプローチと異なり、癌の休眠、すなわち「Dormancy」を得ることの有効性が期待できる唯一の口腔癌である。従って、癌細胞の死滅を目指す物ではなく、眠らせることを目的とした独創的なアプローチの研究を今回は計画した。

3. 研究の方法

研究者はこれまで、唾液腺癌の研究を一貫して続け、各種検討を行ってきた。その中で唾液腺癌細胞における Brachyury の強発現と細胞増殖に大きな影響を与えることを示してきた。だが、癌細胞の特性である「浸潤・転移」への影響は確認できても、それによりどれだけの *in vivo* における意義があるかは未知数であった。

従って今回はまず *in vitro* でもう一つの分子 ID1 を作用させることにより、効果を検証することを行い、次いで、*in vivo* における検証を行いたいと考えた。

つまり、

① *In vitro* における Brachyury と ID1 発現抑制による細胞増殖抑制効果の確認。

② *In vivo* における Brachyury と ID1 発現抑制による移植腫瘍増殖抑制効果や生存期間の確認を行うこととした。

4. 研究成果

1. ID1 および Brachyury shRNA を ACCM 細胞に発表の論文 (Yosuke K. et al. Knockdown of the T-box transcription factor Brachyury increases sensitivity of adenoid

cystic carcinoma cells to chemotherapy and radiation in vitro: implications for a new therapeutic principle. Int J Oncol. 2014 ;44(4):1107-17.) の手法を用いて Transfection を行い、ウエスタンブロッティングにてタンパクレベルでの抑制作用を確認後、細胞増殖を MTT assay にて確認した。

2. *In vivo* での実験ではアテロコラーゲンを使用し、腫瘍細胞と混合させることにより腫瘍の局所注入も可能となった。

また、ヌードマウス尾静脈からの投与により、その混合物は腫瘍に集まりやすい性質を持っていることがよく知られている。

また、腺様嚢胞癌は肺に転移しやすい傾向を持つため、アテロコラーゲンと ACCM 細胞混合し、尾静脈より注入し、肺転移巣を作った後、その増殖を確認した。

肺転移の評価はインディアインクを摘出肺に注入し、転移巣の数をはかることで評価すると共に、別の実験系で、生存曲線を作ることを行った。

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. Deregulation of Nicotinamide N-Methyltransferase and Gap Junction Protein Alpha-1 Causes Metastasis in Adenoid Cystic Carcinoma.

Ishibashi K, Ishii K, Sugiyama G, Sumida T, Sugiura T, Kamata YU, Seki K, Fujinaga T, Kumamaru W,

Kobayashi Y, Hiyake N, Nakano H, Yamada T, Mori Y.

Anticancer Res. 2018;38(1):187-197.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 洋輔 (KOBAYASHI Yosuke)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：60636554

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()