

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 5 日

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390524

研究課題名 扁平上皮癌への c-FLIP の siRNA 導入によるアポトーシス誘導に関する研究

研究課題名 Study of apoptotic induction through siRNA of c-FLIP in squamous cell carcinoma cells

研究代表者

岩瀬正泰 (IWASE MASAYASU)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50193743

研究成果の概要：FasL/TRAIL はデスレセプター(Fas/DR4, DR5)と結合すると、速やかに FADD と caspase-8 との複合体、DISC を形成する。c-FLIP は、DISC 形成に際して caspase-8 とヘテロダイマーを形成して caspase-8 の活性化を抑制する。本研究では、扁平上皮癌細胞の c-FLIP の発現に着目し、その制御機序について検討した。その結果、c-FLIP のアンチセンスを導入した扁平上皮癌細胞が抗 Fas 抗体や TRAIL 誘導アポトーシスの感受性を亢進することを確認した。

扁平上皮癌を含む種々の癌細胞は Fas や TRAILR を高発現しているが、FasL や TRAIL によるアポトーシスに抵抗性を示すことが多い。頭頸部癌治療に汎用されている、CDDP、5-FU および DOC は癌細胞の Fas の発現増強や c-FLIP の発現抑制を介してデスレセプター誘導アポトーシスを亢進することを示した。すなわち、扁平上皮癌細胞のアポトーシス誘導経路として extrinsic 経路も重要であることを示唆するものである。

本研究では、分子標的として臨床的に注目されている薬剤について、扁平上皮癌細胞のデスレセプター誘導アポトーシスへの影響について検討した。分子標的薬剤として抗 EGFR 抗体(C225)、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(AG1478)、PI 3-K 阻害剤(LY294002、wortmannin)、プロテアソーム阻害剤(MG132)と HDAC 阻害剤(SAHA)を用いた。EGFR 阻害剤、PI 3-K 阻害剤およびプロテアソーム阻害剤で処理した扁平上皮癌細胞は、抗 Fas 抗体および TRAIL 誘導アポトーシスが c-FLIP の発現抑制を介して亢進された。プロテアソーム阻害剤は、DR4 および DR5 の発現も増強した。さらに、これらの阻害剤は癌細胞の Bcl-2 ファミリーや IAP ファミリーの発現変化も誘導した。

交付額	(合計単位：円)		
	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

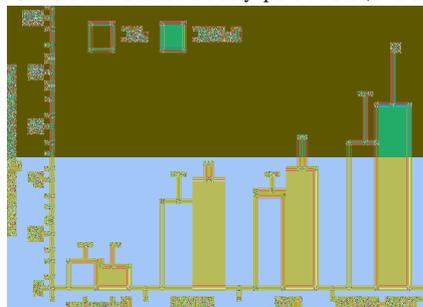
キーワード：臨床腫瘍学・分子標的治療。アポトーシス・デスレセプター・

## 1. 研究開始当初の背景

近年、mRNA を標的とした遺伝子抑制技術が急速に発展している。ある標的 mRNA に対する 21-23 塩基程度の small interfering RNA (siRNA) を導入することによって、遺伝子の発現を抑制し治療に応用する方法が考案された。癌細胞の遺伝子発現系には一般的に、2 つの異常があると考えられている。細胞周期の抑制機構の破綻およびアポトーシスの制御因子の異常が挙げられる。従って、癌細胞に効率よくアポトーシスを誘導することは癌治療に貢献できうと考える。現在、癌細胞にアポトーシスを誘導するような siRNA を導入する研究が盛んに行われている (Clin Cancer Res 12:5096-5103, 2006, Cancer Sci 97:1115-1124, 2006)。アポトーシスの誘導機序のひとつに Fas や TRAIL などのデスレセプターを介する経路の存在がある。通常、癌細胞はデスレセプター誘導アポトーシスに抵抗性を示すことも知られているが、機序については不明な点も多い。デスレセプター誘導アポトーシスの制御因子である cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) は、扁平上皮癌を含む癌細胞において高発現し、アポトーシス抵抗性の一因とされている (J Pathol 194:15-19, 2001, Oncogene 14:7753-7760, 2004)。従って、癌細胞の c-FLIP を発現抑制することで抗腫瘍効果が期待される。従来から、抗癌剤は癌細胞に対して Fas や TRAIL 依存性アポトーシスによる殺作用を増強することが報告されている (J Natl Cancer Inst, 89:783-789, 1997)。

## 2. 研究の目的

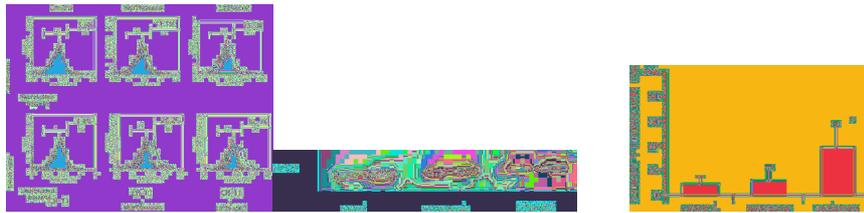
口腔扁平上皮癌細胞は、フルオロウラシル (5FU) やシスプラチン (CDDP) により Fas 依存性アポトーシスの感受性が亢進されることを報告した (頭頸部腫瘍, 27:239-243, 2001, Int J Cancer, 106:619-625, 2003)。抗癌剤による Fas 誘導アポトーシスの感受性亢進は、従来から報告されている Fas 発現の増強と共に caspase-8 の活性化を阻害する抗アポトーシスタンパクのひとつである FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) の発現抑制によることを明らかにした。



c-FLIP control CDDP 5-FU CDDP/5-FU

(扁平上皮癌細胞に対する抗癌剤処理による Fas 誘導アポトーシスの増加と c-FLIP の発現抑制)

更に、口腔扁平上皮癌細胞は、PI3K/Akt 活性阻害剤 (wortmannin, LY294002) の処理により c-FLIP の発現抑制を介して Fas および TRAIL 誘導アポトーシスが亢進されることも明らかにした (Oral Oncol, 42:745-752, 2006, Submitted)。



(扁平上皮癌細胞の PI3K 阻害剤処理による Fas 誘導アポトーシスの亢進、c-FLIP の発現抑制および c-FLIP アンチセンス導入による Fas 誘導アポトーシスの亢進)

最近、分子標的治療薬として臨床適応されている EGFR レセプター活性阻害剤 (EGFR 中和抗体: C225、EGFR チロシンキナーゼ阻害: AG1478) やプロテアソーム阻害剤も c-FLIP の発現制御を介して同様にデスレセプター誘導アポトーシスを促進した(投稿中)。これら一連の研究から、抗癌剤や分子標的治療薬による癌細胞へのデスレセプター誘導アポトーシスの亢進機序のひとつとして、抗アポトーシス因子である c-FLIP の発現抑制によることが証明された。以上の経緯から、本研究では扁平上皮癌に c-FLIP の siRNA を導入することによる抗腫瘍効果について *in vitro* および *in vivo* において検討する予定である。

近年、c-FLIP の siRNA を導入した大腸癌、乳癌、前立腺癌や甲状腺癌細胞にデスレセプターを作用させるとアポトーシスの促進が報告された (Mol Cell Biol 24:8541-8555, 2004, Cancer Res 64:7086-7091, 2004, Cancer Res 66: 1491-1499, 2006, Cancer Res 66:8558-8569, 2006) が、扁平上皮癌細胞での報告は散見されない。今回、扁平上皮癌細胞に c-FLIP を標的因子とし、その siRNA の導入、c-FLIP をノックダウンした癌細胞のデスレセプター誘導アポトーシス感受性について *in vitro*、*ex vivo* および *in vivo* で検討を加える。この結果は、従来から汎用されている抗癌剤、分子標的治療として有望な EGFR 阻害剤、PI3K 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、HDAC 阻害剤とデスレセプターとの併用療法による抗腫瘍効果への有用性も期待される。更に、これら一連の研究成果は、新たな癌細胞のアポトーシス活性化経路の戦略として臨床医学に貢献するものと確信する。

現在、複数の研究機関において固形癌治療に対して TRAIL の抗 DR-4 および抗 DR-5 抗体による臨床試験 (Oncogene 25:5145-5154, 2006, Br J Cancer 92: 1430-1441, 2005) が行われ、その結果から有効性に期待が持たれる。更に、癌治療に対して RNAi を応用した研究が盛んに行われ、*in vitro* では有効性が示されている。しかし、*in vivo* においてその効果を発揮するために siRNA の導入方法とデリバリーに問題が多く残されている。最近、生体内への siRNA のデリバリーシステムとしてアテロコラーゲンの有用性が報告された (Cancer Res 64:3365-3370, 2004, Proc Natl Acad Sci USA 102:12177-12182, 2005)。本研究でも新たな生体への drug delivery system にアテロコラーゲンを用いるものとした。以上の経緯から本研究の主旨は、癌研究におけるトピックな領域であり、研究成果は臨床医学に反映できうるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2, -3, -4, NA, SAS, Ca9-22) の Fas および TRAIL レセプター発現は、抗 Fas および抗体 TRAIL レセプター抗体を用いて FACS で解析する。

(2) 扁平上皮癌細胞の Fas および TRAIL 誘導アポトーシス感受性は、癌細胞

を抗 Fas および TRAIL で処理した後、annexin V/PI 染色法を用いて Flow cytometer で解析する。

(3) 扁平上皮癌細胞の Fas および TRAIL 誘導アポトーシス経路は、癌細胞を抗 Fas および TRAIL で処理した後、カスパーゼの活性化を colorimetric assay で評価する。更に、カスパーゼインヒビターを用いてアポトーシス抑制を確認する。

(4) 扁平上皮癌細胞の c-FLIP の発現は、Western Blot 法で解析する。2) で解析したデスレセプター誘導アポトーシスの感受性との相関性について検討する。

(5) 扁平上皮癌細胞への c-FLIP の siRNA 導入は、合成した数種類の c-FLIP の siRNA をリポフェクション法あるいはアテロコラーゲン法 (Biochem Biophys Res Commun 289:1075-1081, 2001) で扁平上皮癌細胞に導入し、c-FLIP の導入効率について RT-PCR 法および Western Blot 法で解析する。

(6) c-FLIP の siRNA を導入した扁平上皮癌細胞の動態は、扁平上皮癌細胞の細胞増殖について MTT アッセイで解析する。

(7) c-FLIP の siRNA 導入した扁平上皮癌細胞のデスレセプター誘導アポトーシスは、siRNA 導入した扁平上皮癌細胞を抗 Fas および TRAIL で処理した後、annexin V/PI 染色法を用いて Flow cytometer で解析する。

(8) 4)~7) の結果から、最も有効な siRNA 配列と細胞株の組合せを決定し、以後の実験に供する。

(9) ルシフェラーゼで標識した c-FLIP の siRNA 導入した扁平上皮癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した後、c-FLIP の発現を発光イメージング (Proc Natl Acad Sci USA 102:12177-12182, 2005) および免疫組織学的に検索する。

(10) c-FLIP の siRNA を導入した扁平上皮癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、コントロール群との増殖変化についてルシフェラーゼ発光により評価する。

(11) c-FLIP の siRNA 導入した扁平上皮癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、抗 Fas 抗体あるいは TRAIL、抗 DR-4 抗体、抗 DR-5 抗体を腫瘍部あるいは尾静脈から投与、抗腫瘍効果 (ルシフェラーゼ発光) について観察する。

平成 19 年度の研究成果をふまえて、in vivo (c-FLIP の siRNA をアテロコラーゲン介して導入) の研究計画を遂行する予定である。

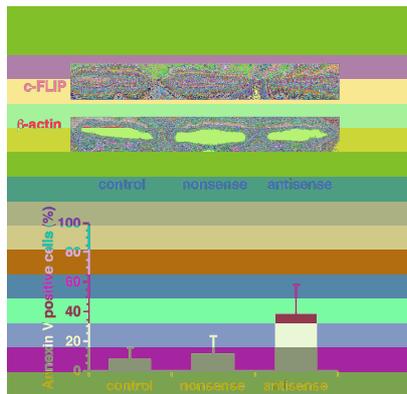
扁平上皮癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した動物モデルを作製し、以下の実験に供する。

(12) c-FLIP の siRNA 含有アテロコラーゲンを腫瘍局所あるいは尾静脈より投与、その増殖変化について発光イメージング法 (Proc Natl Acad Sci USA 102:12177-12182, 2005) で評価する。

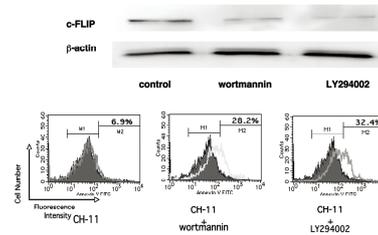
(13) 1) の実験結果から優れた投与方法を識別した後、抗 Fas 抗体あるいは TRAIL、抗 DR-4 抗体、抗 DR-5 抗体を腫瘍部あるいは尾静脈から投与、抗腫瘍効果について観察する。

(14) 2) の実験方法と同様に現在、臨床において汎用されている抗癌剤 (シスプラチン、フルオロウラシル、ドセタキセル) や放射線との併用効果について比較検討する。

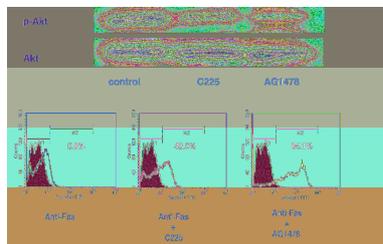
#### 4. 研究の成果



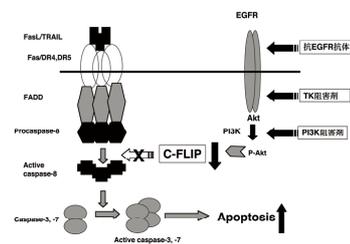
c-FLIP アンチセンス導入扁平上皮癌細胞の Fas 誘導アポトーシス



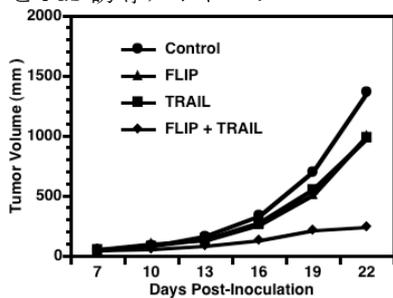
PI3K 阻害剤処理による c-FLIP の発現変化と Fas 誘導アポトーシス



EGFR 阻害剤処理による Akt リン酸化と Fas 誘導アポトーシス



EGFR および PI3K 阻害剤のデスレセプター誘導アポトーシスの機序



c-FLIP の siRNA 導入(in vivo)による抗腫瘍効果

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

①Uchida M, Iwase M, Takaoka S, Yoshiba S, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M, Shintani S. Enhanced susceptibility to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells treated with phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Int J Oncol* 30:1163-1171, 2007. 査読あり

②Takaoka S, Iwase M, Uchida M, Yoshiba S, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M, Shintani S. Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 30:1469-1476, 2007. 査読あり

③Iwase M, Yoshiba S, Uchida M, Takaoka S, Kurihara Y, Ito D, Hatori M,

Shintani S. Enhanced susceptibility to apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells subjected to combined treatment with anticancer drugs and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Int J Oncol* 31:1141-1147, 2007. 査読あり

④ Iwase M., Takaoka S, Uchida M, Yoshida S, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M. Epidermal growth factor receptor inhibitors enhance susceptibility to Fas-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 44:361-368, 2008. 査読あり

[学会発表] (計4件)

① Iwase M., Takaoka S, Uchida M, Yoshida S, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Enhanced susceptibility to TRAIL-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells through down-regulation of cellular FLIP. 19th AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. San Francisco, CA, October, 2007.

② 岩瀬正泰、近藤 元、高岡清佳、内田真紀子、葭葉清香、代田達夫、羽鳥仁志、新谷 悟。デスレセプター誘導アポトーシス感受性の増強による扁平上皮癌に対する分子標的治療の開発に関する研究。昭和大学歯学部ハイテク・リサーチ・センター平成20年度研究成果発表会、2009.3、東京。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩瀬正泰 (IWASE MASAYASU) ・昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50193743

### (2) 研究分担者

新谷 悟 (SHINTANI SATORU) ・昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80294429

伊東大典 (ITO DAISUKE) ・昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：40286844

伊藤秀寿 (ITO HIDETOSHI) ・昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80384303