

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592178  
 研究課題名（和文） 新規アポトーシス制御因子 GRIM19 の口腔癌細胞における機能解析  
 研究課題名（英文） Functional Analysis of Apoptosis Regulatory Factor GRIM19 in Oral Carcinoma Cells  
 研究代表者 森 一 将

## 研究成果の概要：

GRIM-19 は、IFN $\beta$  とレチノイン酸の共刺激により誘導されるアポトーシスの実行因子である。これまでにある種の癌細胞で GRIM19 の発現が報告されているが、GRIM19 の口腔癌細胞における機能的役割については明らかにされていない。そこで、本研究課題では GRIM19 の口腔扁平上皮癌由来細胞株における発現動態および機能的役割について検討を行った。その結果、恒常的に GRIM19 を発現している細胞株では転写因子 STAT3 の発現が弱く、逆に GRIM19 の発現していない細胞株では STAT3 の構成的な発現が認められ、STAT3 と GRIM19 の発現に逆相関の関係が認められた。さらに GRIM19 の発現が認められない細胞株に GRIM19 を強制発現させると STAT3 のリン酸化が抑制され、GRIM19 が STAT3 による遺伝子発現の制御に係わっていることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、アポトーシス、STAT3、GRIM-19、インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

インターフェロン(IFN)は、現在脳腫瘍や腎細胞癌などの固形癌やウイルス性肝炎の治療薬として使用されているサイトカインである。従来から IFN による抗腫瘍活性は、レチノイン酸 (RA) により増強されることが報告されており、その実行因子として GRIM-19 (the genes-associated with retinoid-interferon induced mortality) が同定された。一方、転写因子 STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) は、多くの癌細胞においてその構成的な活性化が報告されており、oncoprotein として機能していることが報告されている。GRIM-19 は、EGF など

の成長因子のシグナル伝達に関与している STAT3 と結合し、STAT3 依存性遺伝子発現を抑制することにより、癌細胞の増殖およびアポトーシスを抑制すると考えられている。したがって、構成的な STAT3 の活性を抑制することは、癌細胞の細胞増殖の抑制、腫瘍の増大の抑制につながり、その抑制因子として作用する GRIM19 は今後の癌の分子標的治療戦略を考える上での重要な分子の一つであると考えられる。

## 2. 研究の目的

GRIM-19 は、ある種の癌細胞では構成的に発現していることが報告されている。しかしな

がら、これまでに GRIM19 の口腔癌細胞における役割について検討を行った報告は少ない。そこで本研究では口腔癌細胞における発現動態や局在、またその機能的な役割について解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

実験には、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-2、HSC-3、HSC-4、Ca9-22 細胞を供試した。これら細胞は、L-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン、10%牛胎児血清 (FBS) を含む RPMI1640 培地にて培養を行った。

#### (2) ウェスタンブロット法

各口腔癌細胞より細胞抽出液を調製したのち、SDS-PAGE にて分離後、抗 STAT3 抗体、抗 STAT3 チロシン (Tyr705) リン酸化抗体および抗 GRIM19 抗体にてウェスタンブロットを行った。ウイルス感染細胞の場合は、HSC-2 細胞をウイルスに感染させ、3 日後に細胞抽出液を抽出し、ウェスタンブロットを行った。

#### (3) レンチウイルス発現ベクターの作製

GRIM19 を強制発現させるために、Gateway® クローニングシステムを用いて GRIM19 cDNA を destination vector に組み込んだ。このベクターをウイルスパッケージングベクターとともに 293FT 細胞に遺伝子導入後、レンチウイルスを得た。

### 4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株において GRIM19 が発現しているか否かを検討するために、ウェスタンブロット法により検討した。その結果、HSC-3、HSC-4、Ca9-22 では GRIM19 の構成的な発現が認められたが、HSC-2 では認められなかった。

(2) GRIM19 は転写因子 STAT3 と結合して STAT3 の転写活性を抑制することが知られているため、STAT3 の発現をウェスタンブロット法にて検討した結果、構成的に GRIM19 の発現している Ca9-22 では STAT3 の構成的な発現が弱く、GRIM19 の発現していない HSC-2 では STAT3 の構成的な発現が認められた。

(3) そこで次に GRIM19 の構成的な発現が認められない HSC-2 に GRIM19 を強制発現させ、STAT3 の発現や STAT3 依存性遺伝子発現に及ぼ

す影響を検討するため、レンチウイルス発現ベクターを作製した。このレンチウイルスベクターを HSC-2 に感染させ、GRIM19、STAT3 の発現を検討したところ、興味深いことに、HSC-2 は構成的な STAT3 のチロシン 705 (Tyr705) のリン酸化が認められるが、GRIM19 の強発現によりその構成的な Tyr705 リン酸化が抑制された。現在この発現系を用いて、GRIM19 が STAT3 依存性遺伝子発現に影響するか否かについて検討中である。

### 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)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 新規アポトーシス制御因子 GRIM-19 の口腔癌細胞における機能解析: 森 一将、廣井美紀、嶋田 淳、大森喜弘, 2008 年 9 月, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会、東京
- 2) 新規アポトーシス制御因子 GRIM-19 の口腔癌細胞における発現: 森 一将、廣井美紀、嶋田 淳、大森喜弘, 2008 年 10 月, 第 53 回日本口腔外科学会総会、徳島

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

森 一将 (MORI KAZUMASA)  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号: 80372902

#### (2) 研究分担者

大森喜弘 (OHMORI YOSHIHIRO)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50194311