

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791212

研究課題名（和文）SCCA1 蛋白の新規ターゲットプロテアーゼ同定と頭頸部癌細胞での役割に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of the biological role of SCCA1 protein in head and neck cancer cells.

研究代表者

安松 隆治（YASUMATSU RYUJI）

九州大学・大学院医学研究院・研究員

研究者番号：00444787

## 研究成果の概要（和文）：

SCC抗原は、進行扁平上皮癌症例でこの血清値が上昇することから、扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして広く臨床の場で用いられてきた。しかしながらその遺伝子座が同定され、SCC抗原は、SCCA1, SCCA2という相同性の極めて高い2種類の蛋白から構成されているということが判明した。さらにこれらはserine protease inhibitor familyに属する生物学的機能を有する蛋白であることが分かってきた。一般的に癌細胞が浸潤、増殖する際や、炎症が広がる過程では、各種proteaseの活性は増大する。従ってprotease inhibitorは、むしろ癌細胞の増殖や炎症の広がりには抑制的に働くと考えられる。そこで実際にはSCCA1蛋白に特異的に結合するproteaseが頭頸部癌細胞中に存在するのではないかと考えた。2. このproteaseがSCCA1蛋白と細胞内外で結合することによって癌細胞の浸潤、増殖が抑えられているのではないかと考えた。という仮説のもとに検討を行った。細胞外でのSCCA1蛋白の役割について解析を行うため、ヒトSCCA1蛋白を用いて培養細胞株にSCCA1蛋白を加え、増殖能、浸潤能の解析を行った。結果としてSCCA1蛋白添加群では癌細胞の増殖、浸潤能が抑制されていた。次に細胞内外でSCCA1蛋白と特異的に結合するproteaseが存在しないか解析した。細胞外でのSCCA1蛋白と結合するprotease同定のため、頭頸部癌細胞の培養メディアウムにSCCA1蛋白を添加した後immunoblot法でcomplex bandの出現の有無を解析した。細胞内でのSCCA1蛋白と結合するprotease同定には、SCCA1遺伝子導入株、コントロール株から蛋白を抽出し、immunoblot法でcomplex bandの出現の有無を解析した。その結果、培養細胞にSCCA1をいかなる条件で添加してもcomplex bandの出現は認められなかった。今検討ではcomplex bandの検出には至らなかったものの、western blot法によるSCCA1 bandの解析では本来の42kDa以外に他の蛋白と結合したあとに検出される38kDaのband (cleaved form) が検出された。この事はcomplexが非常に不安定な環境下であり、一旦結合したあとにすぐさま分解されたことを物語っている可能性が高いと考えられる。今後もさらに何らかの役割を持った未知のtarget protease同定を試みる必要があると考えている。

研究成果の概要（英文）：

SCCA1 is the member of the clade B serpin and is an inhibitor of cysteine proteases, cathepsin (cat) K, L, and S. However its physiologic function in HNSCC is unknown. Recent studies demonstrated that the expression of SCCA1 was increasing in HNSCC. We hypothesized that altered expression of SCCA1 in HNSCC could contribute to block the protease activity and investigated whether SCCA1 could make the complex with the new protease in HNSCC.

In this study, however, we could not find any new proteases which could make the complex with SCCA1 protein. Further examination is necessary to conclude that SCCA1 can block the new protease in patients with HNSCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2200000	0	2200000
2008年度	600000	180000	780000
2009年度	500000	150000	750000
年度			
年度			
総計	3300000	330000	3630000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：

キーワード：SCC 抗原、頭頸部癌、プロテアーゼインヒビター

### 1. 研究開始当初の背景

SCC 抗原は、1977 年に加藤らによって子宮頸部癌転移巣から発見された蛋白である。進行扁平上皮癌症例でこの血清値が上昇することから、頭頸部癌も含めた扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして広く臨床の場で用いられ、腫瘍細胞から特異的に放出され癌細胞増殖に促進的に働く蛋白と考えられてきた。しかしながら 1997 年に遺伝子座が同定され、臨床的に測定されている SCC 抗原は、SCCA1, SCCA2 という相同性の極めて高い 2 種類の蛋白から構成されているということが判明した。さらにこれらは serine protease inhibitor family (略: **clade B serpin**) に属する生物学的機能を有する

蛋白であることが分かってきた。

一般的に癌細胞が浸潤、増殖する際や、炎症が広がる過程では、各種 protease の活性は増大する (*Am J Respir Crit Care Med.* 2006)。従って protease inhibitor である serpin は、むしろ癌細胞の増殖や炎症の広がりには抑制的に働くと考えられる。現在まで 13 種類の clade B serpin が発見されているが、このうち我々は、**SERPINB1** が気道の炎症時に高発現し、target protease と complex を形成する事によって protease の活性を不活化し (*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006) 頭頸部癌症例においては、maspin (**SERPINB5**) 高発現群では発現が低い群に

比し、リンパ節転移が少ない事を報告した ( *Head Neck*. 2001 )。さらに共同研究を行っている当科中島講師らによりクローニングされた headpin(SERPINB13)も頭頸部癌では抑制的に働く事が報告されている。また SCC 抗原において、我々は SCCA1(SERPINB3)に着目し、

1. SCCA1 は癌細胞のみならず T リンパ球にも発現しており、何らかの腫瘍免疫に関わっている可能性がある ( *Cancer Lett*. 2001)
2. 良性腫瘍の鼻腔乳頭腫では SCCA1 発現が高く、血清 SCC 抗原値も高いのに対して、悪性転化を来した扁平上皮癌ではいずれも低下する ( *Cancer*. 2002, *Head Neck*. 2005)
3. SCCA1 発現の低い頭頸部癌細胞に SCCA1 遺伝子を導入し、SCCA1 高発現株を樹立すると、癌細胞の浸潤能が低下する ( *Head Neck*. 2006)

以上の事を報告してきた。

## 2 . 研究の目的

本研究では、さらに上記 1 , 3 の機序を明らかにするために

- 1.SCCA1 蛋白が特異的に結合する protease が頭頸部癌細胞中に存在するのではないか。
- 2.この protease が SCCA1 蛋白と細胞内外で結合することによって癌細胞の浸潤、増殖が抑えられているのではないか。

という仮説のもとに以下のことを検証したいと考えている。

- 1.ヒト SCCA1 蛋白を精製し、細胞内外での SCCA1 蛋白の頭頸部癌細胞に対する効果を解析する。

ヒト SCCA1 蛋白を大腸菌を用いて精製し、頭頸部癌細胞の培養メディウムに加え、癌細胞の増殖、浸潤能を解析する。これまでの研究では、SCCA1 遺伝子を細胞内に導入する、といった、主に癌細胞内での SCCA1 の役割について研究を進めてきた。しかしながら、臨床的に測定している血清 SCC 抗原値は細胞外のものであり、実際の扁平上皮癌症例で上昇していることから、細胞外での SCC 抗原蛋白の役割についても十分な検討が必要である。ヒト SCCA1 蛋白を精製することによって、細胞外での SCCA1 蛋白の役割についても解析が可能である。

SCCA1 蛋白が癌細胞に抑制的に働いているとすれば、蛋白添加群では、癌細胞の増殖、浸潤能が抑制されることが予想される。

2. 細胞内外で SCCA1 蛋白と特異的に結合する protease を同定する。

a.これまでの in vitro の実験で、SCCA1 蛋白は cysteine protease である Cathepsin L,S,K の活性を抑制することが分かっている。ヒト SCCA1 蛋白と他に特異的に結合する serine protease がないかをリコンビナント蛋白を用いて in vitro で解析する。

b. 細胞外での SCCA1 蛋白と結合する protease 同定のため、頭頸部癌細胞の培養メディウムに SCCA1 蛋白を添加した後、メディウムを回収し immunoblot 法で complex band の出現の有無を解析する

c.細胞内での SCCA1 蛋白と結合する protease 同定のため、以前樹立した SCCA1 遺伝子導入株、コントロール株が

ら蛋白を抽出し、immunoblot 法で complex band の出現の有無を解析する。

3. protease の解析、並びに頭頸部癌での役割について解析する。

2.において新たな complex band を確認後、mass spectrometry にて band の解析を行い、target protease を同定する。同定後、その蛋白が実際に頭頸部癌細胞で増殖、浸潤にどのように関わっているのか RNA、タンパクレベルでの解析を行う。

4. SCCA1 蛋白の臨床応用の可能性について検討する。

1-3 の検討にて細胞外での SCCA1 蛋白の腫瘍抑制効果が認められた場合、ヌードマウスを用いて移植腫瘍に蛋白を局注し、in vivo での解析を行う。

### 3 . 研究の方法

1 . SCCA1蛋白精製後、異なった濃度を用いて培養細胞株にSCCA1蛋白を加え、増殖能、matrigelを用いて浸潤能を解析する。

2 . 精製SCCA1蛋白と結合する特異的proteaseの同定のため、癌細胞の浸潤に関わっているとされるMMPをはじめとしたリコンビナント蛋白との間で蛋白結合試験を行いスクリーニングする。SCCA1(SERPINB3)がproteaseと結合した際には高分子bandが検出されることが予想される。頭頸部癌細胞内外で様々な条件下でこのようなbandが出現しないかを検討する。また、band濃度が低い場合は、SCC抗原抗体を用いて免疫沈降を行い、bandを解析する。

3 . 2.の実験で高分子bandを同定後SDS-PAGE後にGelをcoomassie blue染色し、mass spectrometryにてband内に存在する蛋白の解析を行う。高分子band内には、SCCA1蛋白と結合したtarget proteaseが存在すると考えられる。4 . Mass spectrometryでtarget proteaseを同定した後、そのproteaseの発現を頭頸部癌細胞でRNAレベル、可能であれば蛋白レベルでも解析し、実際に癌細胞に対してどのような役割を果たしているかを解析する。必要であれば遺伝子導入実験を行い解析する。

1 - 3 の実験にて細胞外でのSCCA1蛋白に腫瘍抑制効果が認められた場合、in vivoでの解析については、ヌードマウスを用いる。マウスに頭頸部癌細胞を移植し、形成された腫瘍に対して精製SCCA1蛋白を異なった濃度、間隔で局所注射し、腫瘍の大きさの変化、浸潤能を判定する。

### 4 . 研究成果

1. ヒトSCCA1蛋白を大腸菌を用いて精製し、頭頸部癌細胞の培養メディウムに加え、癌細胞の増殖、浸潤能の解析を行った。

細胞外でのSCCA1蛋白の役割について解析を行うため、ヒトSCCA1蛋白を精製し、異なった濃度を用いて培養細胞株にSCCA1蛋白を加え、増殖能、またmatrigelを用いて浸潤能の解析を行った。結果としてSCCA1蛋白添加群では、癌細胞の増殖、浸潤能が抑制されていた。

2. 細胞内外でSCCA1蛋白と特異的に結合するproteaseが存在しないか解析した。細胞外でのSCCA1蛋白と結合するprotease同定のため、頭頸部癌細胞の培養メディ

ウムにSCCA1蛋白を添加した後、メディアウムを回収しimmunoblot法でcomplex bandの出現の有無を解析した。細胞内でのSCCA1蛋白と結合するprotease同定には、以前樹立したSCCA1遺伝子導入株、コントロール株から蛋白を抽出し、immunoblot法でcomplex bandの出現の有無を解析した。その結果、培養細胞にSCCA1をいかなる条件で添加してもcomplex bandの出現は認められなかった。凍結癌組織から蛋白を抽出し、sampleに精製SCCA1蛋白を様々な条件で添加し、complex bandの解析をおこなったが明らかなband検出にはいたらなかった。

今検討ではcomplex bandの検出には至らなかったものの、western blot法によるSCCA1 bandの解析では本来の42kDa以外に他の蛋白と結合したあとに検出される38kDaのband(cleaved form)が検出された。この事はcomplexが非常に不安定な環境下であり、一旦結合したあとにすぐさま分解されたことを物語っている可能性が高いと考えられる。今後もさらに何らかの役割を持った未知のtarget protease同定を試みる必要があると考えている。

## 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)

[雑誌論文](計14件)

1. Masuda M, Ruan HY, Ito A, Nakashima T, Toh S, Wakasaki T, Yasumatsu R, Kutratomi Y, Komune S, Weinstein IB. Signal transducers and activators of transcription 3 up-regulates vascular endothelial growth factor production and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2007 Sep;43(8):785-90.
2. Yasumatsu R, Okura K, Sakiyama Y, Nakamura M,

Matsumura T, Uehara S, Yamamoto T, Komune S. Metastatic hepatocellular carcinoma of the external auditory canal. *World J Gastroenterol.* 2007 Dec;13(47):6436-8.

3. Yasumatsu R, Nakashima T, Uryu H, Masuda M, Hirakawa N, Shiratsuchi H, Tomita K, Fukushima M, Komune S. The role of dihydropyrimidine dehydrogenase expression in resistance to 5-Fluorouracil in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2009 45(2):141-7.
4. Yasumatsu R, Nakashima T, Uryu H, Ayada T, Wakasaki T, Kogo R, Masuda M, Fukushima M, Komune S. Correlations between thymidylate synthase expression and chemosensitivity to 5-Fluorouracil, cell proliferation and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Chemotherapy.* 2009 55:36-41.
5. Yasumatsu R, Nakashima T, Wakasaki T, Ayada T, Kadota H, Masuda M, Toh S, Shiratsuchi H, Komune S. Relative level of thymidylate synthase mRNA expression in primary tumors and normal tissues predicts survival of patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010 267(4):581-6.
6. 原発性副甲状腺機能亢進症症例の臨床的検討.  
安松隆治、大蔵謙治、山本智矢  
耳鼻と臨床 第53巻.P144-14
7. 上顎洞血腫  
安松隆治  
耳鼻と臨床 第54巻.P176-178
8. 副咽頭間隙腫瘍手術症例の検討  
中島寅彦、白土秀樹、安松隆治、平川直也、梅崎俊郎、小宗静男  
耳鼻と臨床 第54巻.P10-14
9. 副咽頭間隙に生じた fibromatosis の1例  
梅野好啓、安松隆治、中島寅彦、門田英輝、白土秀樹、平川直也、小宗静男  
耳鼻と臨床 第54巻.P195-199

10. 鼻腔内に生じた孤立性線維性腫瘍の1例  
**安松隆治**、平川直也、白土秀樹、中島寅彦、橋本  
 和樹、古後龍之介、小宗静男  
 耳鼻と臨床 第55巻.P74-78
11. 両側頸動脈小体腫瘍の2例  
 上園健一、**安松隆治**、中島寅彦、瀬川祐一、詠田  
 眞治、庄野禎久、佐々木富男、小宗静男  
 耳鼻と臨床 第55巻.P112-119
12. 当科における篩骨洞・蝶形骨洞膿胞の臨床的検討  
 岡正倫、**安松隆治**、吉川沙耶花、小池浩次、中島  
 寅彦、梅崎俊郎  
 耳鼻と臨床 第55巻.P142-146
13. 当科における鼻副鼻腔乳頭腫症例の検討  
 古後龍之介、**安松隆治**、中島寅彦、白土秀樹、門  
 田英輝、小宗静男  
 耳鼻と臨床 第55巻.P189-193
14. 当科における上顎洞癌症例の臨床的検討  
**安松隆治**、中島寅彦、綾田寅之進、白土秀樹、藤  
 賢史、小宗静男  
 頭頸部癌 第35巻3号.p.257-260

[学会発表](計13件)

1. **頭頸部扁平上皮癌における Dihydropyrimidine  
 dehydrogenase (DPD) 発現の意義**  
**安松隆治**、中島寅彦、伊藤彩、小宗静男  
 神奈川県横浜市(第31回日本頭頸部癌学会)
2. **アレルギー性鼻炎に対する外科的治療**  
**安松隆治**  
 福岡県福岡市(第149回福岡アレルギー研究会)
3. **A Novel SERPINB11 expression in HNSCC**  
**Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Komune S**  
 Washington DC, USA (American Academy of  
 Otolaryngology, HNS 2007)
4. **頭頸部扁平上皮癌における DPD 発現の意義につい  
 て**  
**安松隆治**、中島寅彦、伊藤彩、小宗静男  
 京都府京都市(第45回日本癌治療学会)
5. **血管新生をターゲットとした頭頸部癌の治療戦略**

(教育講演)

- 安松隆治**  
 沖縄県那覇市(第23回九州連合地方部会)
6. **頭頸部扁平上皮癌における TS 発現とその役割**  
**安松隆治**、中島寅彦、白土秀樹、平川直也、小宗静  
 男  
 東京都新宿(第32回日本頭頸部癌学会)
7. **The role of Dihydropyrimidine dehydrogenase  
 expression in resistance to 5-Fluorouracil in head  
 and neck squamous cell carcinoma cells**  
**Yasumatsu R, Nakashima T, Komune S**  
 San Francisco, USA (7th International Conference on  
 Head & Neck Cancer)
8. **頭頸部扁平上皮癌における TS 発現と5-FU抗腫瘍効  
 果について**  
**安松隆治**、中島寅彦、小宗静男  
 愛知県名古屋市(第46回日本癌治療学会)
9. **アレルギー性鼻炎に対する治療と問題点**  
**安松隆治**  
 福岡県福岡市(鼻アレルギー学術講演会)
10. **頭頸部癌に対するオーダーメイド放射線化学療法  
 の基礎的臨床的検討**  
**安松隆治**  
 福岡県福岡市(第9回九州癌懇話会)
11. **フッ化ピリミジン系代謝酵素をターゲットとした  
 頭頸部癌治療に関する基礎的臨床的検討**  
**安松隆治**、中島寅彦、古後龍之介、白土秀樹、小宗  
 静男  
 東京都芝公園(第110回日本耳鼻咽喉科学会総会)
12. **当科における上顎癌症例の検討**  
**安松隆治**、中島寅彦、白土秀樹、小宗静男  
 北海道札幌市(第33回日本頭頸部癌学会)
13. **鼻アレルギー疾患の最近の知見**  
**安松隆治**  
 福岡県太宰府市(筑紫医師会学術講演会)
6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 (安松 隆治)

研究者番号: 00444787