

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007年度～2008年度  
 課題番号：19791371  
 研究課題名 (和文) 口腔扁平上皮癌細胞におけるインターフェロン耐性の分子機構の解析  
 研究課題名 (英文) Molecular dissection of interferon-resistance in oral squamous cell carcinoma  
 研究代表者 関根 圭輔 (SEKINE KEISUKE)  
 明海大学・歯学部・助教  
 研究者番号：00323569

## 研究成果の概要：

本研究課題について HSC-2 細胞において IFN $\gamma$  により Cyclin A2、Cdk2 以外にも Cdk1、Cdk4 の発現が抑制されることを見出した。

複数の細胞周期関連遺伝子の発現が IFN $\gamma$  により抑制されることが明らかとなったことから、本年度はこれら細胞周期関連遺伝子を個別に発現抑制しているのではなく、これら遺伝子上流に位置する細胞周期制御のマスターレギュレーターが IFN $\gamma$  により調節されている可能性を考え p53 および RB について検討した。p53 は口腔扁平上皮癌において高頻度に変異が見られることが知られており、HSC-2、Ca9-22 においても p53 の変異が知られている。Ca9-22 での p53 の変異は優勢抑制型変異でありタンパク質が分解されず過剰に存在していた。一方、HSC-2 では変異によりタンパク質レベルで検出できなかった。

そこで、Ca9-22 型 p53 をレンチウイルスを用いて HSC-2 細胞に発現すると Ca9-22 型 p53 は HSC-2 細胞においても安定で過剰に発現が見られた。この過剰発現細胞に IFN $\gamma$  処理すると、野生型 HSC-2 細胞と同様に Cyclin A2、Cdk2 の発現抑制が見られた。次に RB について検討すると HSC-2 では IFN $\gamma$  により Rb の活性化状態であるリン酸化抑制状態になることが明らかとなり、一方 Ca9-22 ではこのようなリン酸化抑制は見られなかった。そこでこのような IFN $\gamma$  により活性化された RB が実際に細胞周期関連遺伝子の発現に関与するか調べるため SV40 large T 抗原の RB 結合部位 (T-rb) をレンチウイルスにより発現し、RB の作用を阻害した。すると T-rb 発現 HSC-2 では IFN $\gamma$  による CyclinA2、Cdk2 等の発現抑制が解除された。以上、本研究課題により Ca9-22 型変異 p53 の優勢抑制作用が Ca9-22 における IFN $\gamma$  抵抗性の原因ではないことが初めて明らかにし、IFN $\gamma$  は RB を活性化 (リン酸化抑制) することで複数の細胞周期関連遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。また Ca9-22 での IFN $\gamma$  抵抗性は IFN $\gamma$  の RB 活性化 (リン酸化抑制) に何らかの異常があるためであることが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,100,000円	0円	2,100,000円
平成20年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	360,000円	3,660,000円

研究分野：がん、シグナル伝達、転写制御

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：(1)インターフェロン $\gamma$  (2)口腔癌細胞 (3)細胞増殖 (4) Cell cycle

### 1. 研究開始当初の背景

インターフェロン $\gamma$ は T 細胞、NK 細胞により産生されるサイトカインでウイルス増殖抑制や、免疫担当細胞の賦活化などの活性を有することが知られている。近年、免疫系の細胞や因子群が、がん細胞の発生を監視し抑制する、いわゆるがん免疫が注目されている。この中でも IFN $\gamma$ は免疫担当細胞の賦活化作用を通じ、間接的にがん細胞の抑制にかかわるだけでなく、がん細胞に直接作用しその増殖を抑えアポトーシスを誘導することが明らかとなってきたが、一方で IFN $\gamma$ の増殖抑制に抵抗性を示す癌細胞の存在が明らかとなってきた。

### 2. 研究の目的

口腔癌細胞に於いても、IFN $\gamma$ による細胞増殖抑制作用がみられるが、他の多くの癌細胞と同様に IFN $\gamma$ に抵抗性を示すものも存在する。しかしながら、口腔癌細胞における IFN $\gamma$ による細胞増殖抑制機構ならびに抵抗性を示す細胞におけるその耐性メカニズムが、他の癌細胞と同様か否かの詳細な検討はなされていない。これまで我々は、IFN $\gamma$ 感受性口腔扁平上皮癌細胞として HSC-2 と IFN $\gamma$ 抵抗性口腔扁平上皮癌細胞として Ca9-22 を同定し、これら細胞を用い口腔癌細胞における IFN $\gamma$ による細胞抑制機構と耐性機構の詳細を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- 1) HSC-2 細胞における IFN $\gamma$ による細胞増殖抑制が Cyclin A2 と Cdk2 の発現抑制で説明できるか検証するため siRNA を用いて Cyclin A2 と Cdk2 を knock down し、HSC-2 の増殖能を MTT assay により検討した。
- 2) HSC-2 における IFN $\gamma$ による細胞増殖抑制を CyclinA2 および Cdk2 の過剰発現により回復できるかどうか検討した。
- 3) 細胞周期制御のマスターレギュレーターが IFN $\gamma$ により調節されている可能性を考え p53 および RB について検討した。

### 4. 研究成果

本研究課題により Ca9-22 型変異 p53 の優勢抑制作用が Ca9-22 における IFN $\gamma$ 抵抗性の原因ではないことが初めて明らかにし、IFN $\gamma$ は RB を活性化(リン酸化抑制)することで複数の細胞周期関連遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。また Ca9-22 での IFN

$\gamma$ 抵抗性は IFN $\gamma$ の RB 活性化(リン酸化抑制)に何らかの異常があるためであることが明らかになった。

### 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 5 件)

Amano S, Sekine K, Bonewald LF, Ohmori Y.  
A novel osteoclast precursor cell line, 4B12, recapitulates the features of primary osteoclast differentiation and function: enhanced transfection efficiency before and after differentiation.  
*J Cell Physiol.* in press (2009)

Chen YR, Sekine K, Nakamura K, Yanai Y, Tanaka M, Miyajima A.  
YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase-I by suppressing C/EBP $\alpha$  function in mice.  
*Gastroenterology* in press (2009)

Sekine K, Chen YR, Kojima N, Ogata K, Fukamizu A, Miyajima A.  
Foxo1 links insulin signaling to C/EBP $\alpha$  and regulates glucoeogenesis during liver development.  
*EMBO J.* 26(15):3607-3615. (2007)

Naiki T, Saijou E, Miyaoka Y, Sekine K, Miyajima A.  
TRB2, a Mouse Tribbles Ortholog, Suppresses Adipocyte Differentiation by Inhibiting AKT and C/EBP $\beta$ .  
*J Biol Chem.* 282(33):24075-24082. (2007)

Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Sata M, Takamori N, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Kawano H, Yamada T, Fukuda T, Matsumoto T, Sekine K, Sato T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Yoshimura K, Watanabe T, Nakamura T, Oomizu A, Tsukada M, Hayashi H, Sudo T, Kato S, Matsumoto T.  
Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice.  
*J Clin Invest.* 117(6):1514-1526. (2007)

〔学会発表〕（計3件）

第50回歯科基礎医学会学術大会 2008年  
口腔癌細胞増殖抑制におけるインターフェ  
ロン $\gamma$ シグナルの解析  
関根圭輔, 廣井美紀, 大森喜弘

第50回歯科基礎医学会学術大会 2008年  
破骨細胞前駆細胞株4B12細胞への遺伝子導  
入効率  
天野滋, 関根圭輔, 大森喜弘

第49回歯科基礎医学会学術大会 2007年  
破骨細胞分化に関する核内リン酸化蛋白質  
の2次元電気泳動解析  
天野滋, 関根圭輔, 廣井美紀, 大森喜弘

〔図書〕（計1件）

肝臓が糖代謝能を獲得するしくみ  
関根圭輔, 陳彦榮, 宮島篤  
Medical Bio 5(2):76-82. (2008)

6. 研究組織

(1)研究代表者 ( )

研究者番号:

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: