

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791383

研究課題名 (和文) 核内蛋白の動向からみた悪性腫瘍の病態解明

研究課題名 (英文) Investigation of the behavior of nuclear proteins in human cancer cells

研究代表者

鬼頭 慎司 (KITO SHINJI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80347682

研究成果の概要 (和文)：口腔癌細胞に紫外線等で細胞死を誘導し核内蛋白の動向を調べる為に研究を行った。具体的にはヒト扁平上皮癌細胞や顎下腺癌細胞にアポトーシスを誘導し蛋白解析や免疫組織化学解析を行った。結果としては紫外線によるアポトーシス誘導で核内蛋白であるニュークレオリンや AgNORs 蛋白は大きくその量を変化させた。また蛍光顕微鏡による観察でその局在は激変した。この結果は核内蛋白の変化が DNA の断片化あるいはアポトーシスの最終段階と関連していることを示唆するものであった。

研究成果の概要 (英文)：To investigate the behavior of nucleolin and AgNORs proteins in ultra-violet ray (UV)-induced oral cancer apoptotic cells. Dynamic alteration of nucleolin and AgNORs proteins in UV-induced SCC-25 and HSG cells were examined using Western blot analysis and histochemistry methods. Dynamic alteration of nucleolin and AgNORs proteins are observed. Nucleolin disappeared or diffusely spread out into nucleus in apoptotic body of oral cancer cells. This results indicate that alteration of nucleolin is associated with the induction of DNA fragmentation or the final active phase of apoptosis induced by UV in oral cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	480,000	2,780,000

研究分野：歯科放射線学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：(1) 悪性腫瘍細胞 (2) アポトーシス (3) AgNORs

(4) ニュークレオリン (5) ニュークレオフォスミン (6) UV 照射

(7) (8)

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降これまでアポトーシスの動向を分子レベルで解明する研究が精力的に行われてきている。この間にアポトーシスの基本的骨格が次々と明らかになり、その大筋はかなり理解されてきている。ところが細胞腫による相違等なお不明な部分が多く、新規の関連遺伝子産物が同定され、新しいシグナル伝達経路が明らかになっている。我々はこれまでに口腔顎顔面領域の悪性腫瘍に対する放射線治療や抗癌剤を含む各種薬剤の物理化学的ストレスを引き金として生じる作用の解明を主目的とし、扁平上皮癌細胞、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞、顎下腺癌由来唾液腺細胞等におけるアポトーシスの誘導機構についての検討を重ねてきた。これまでに特定分子の蛋白質リン酸化状態の変化に伴い培養細胞にアポトーシスが生じ、その誘導経路の一部においては FasL/Fas 系を含むアポトーシス関連遺伝子産物が関与していることを報告した(Morimoto Y., Kito S. et al. 2000)。さらに蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤によるアポトーシス誘導細胞においてはカバーガラス上で鍍銀染色に陽性反応を示す AgNORs の局在が変化し、また蛋白を転写したPVDF膜上で抗体を用いず、鍍銀染色で強く反応する 110 kDa の核内蛋白が消失し、新たに 80 kDa の蛋白が出現してくることを発見した(Morimoto Y., Kito S. et al. 2001)。さらにこの 80 kDa の蛋白が抗体反応によりニュークレオリンの分解産物であり、鍍銀染色の結果と完全に一致することを世界で初めて明らかにした(Kito S. et al. 2003)。この現象は抗癌剤処理を施した顎下腺癌由来細胞においても同様に認められ、ニュークレオリンと AgNOR proteins の変化が DNA の断片化とアポトーシスの最終実行機構に関与している可能性が示唆された(Kito S. et al. 2005)。これらの現象は放

射線や各種薬剤による細胞のアポトーシス誘導をより簡易に示すことの出来る指標の一つとして確立出来ると考えた。またニュークレオリン分解の調節機構がアポトーシスの実行機構や抗癌剤の細胞障害性を制御する可能性があるものとして、分子イメージングの対象、新しい抗癌剤の開発、疾患治療の分子標的となりうると期待した。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究において我々は UV 発生装置による放射線照射及び蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤や口腔顎顔面領域で用いられる各種抗癌剤で処理した悪性腫瘍細胞におけるアポトーシス関連遺伝子産物について細胞化学的及び生化学的に解明していく。特に鍍銀染色に対して強力な陽性反応を示す 110 kDa のニュークレオリンとその分解産物である 95 kDa と 80 kDa の蛋白とその他の鍍銀染色陽性蛋白も含め、これらの役割を解明していく。特にニュークレオリンは核の断片化、クロマチンの凝集といったアポトーシスの最終実行機構に直接関与しているのではないかと推察しており、アポトーシスに関与する分子、あるいは関与していないと信じられてきた分子との相互作用も含めて広い視野で詳細に検討を進めていく。それらの結果を基に悪性腫瘍細胞の細胞死のメカニズムを解明し、各種細胞株別の最も合理的な薬剤投与方法や放射線照射法、細胞増殖と密接に関与するニュークレオリンやニュークレオフォスミンといった核内蛋白群が分子イメージングや治療上の分子標的の対象となる可能性を秘めるものであるのかを考察し、究極的には悪性腫瘍の予後の判定も含めて総合的な診断、治療法の構築を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 悪性腫瘍細胞におけるアポトーシスの誘導経路について検討を重ねる。

口腔扁平上皮癌細胞 (SCC-25) とヒト顎下腺癌由来唾液腺細胞 (HSG) を通法通り培養する。

市販のUV 照射装置を工夫して用い、培養細胞の入ったシャーレに適正な量のUV 照射を行う。

細胞のアポトーシスを確認後、通法通りに SDS-PAGE 電気泳動法で蛋白を分離し、PVDF 膜上に転写し、膜上で硝酸銀を用いた独自の (Morimoto Y., Kito S. et al. 2001)、(Kito S. et al. 2003)、(Kito S. et al. 2005) 鍍銀染色を行う。膜上の 110 kDa の蛋白とその分解産物である 95kDa と 80kDa の蛋白を検出する。抗ニュークレオリン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、これらの蛋白を検出する。さらにこのニュークレオリンの変化が遺伝子レベルで調節されているかどうかを調べるため PCR 法、ノーザンブロッティング を行い、mRNA の発現量の変化を蛋白量の変化と比較する。

既に入手済みの悪性腫瘍細胞に加えて、外科的侵襲の際に採取された悪性腫瘍組織の一部を初代培養によって増殖し、細胞株を樹立する。上記の実験を行った後、アポトーシス誘導経路におけるニュークレオリンとニュークレオフォスミンの相互作用を調べ、さらに他のアポトーシス関連遺伝子産物や細胞増殖因子との関係を調べる。

ニュークレオリンとニュークレオフォスミンの siRNA を作製し、RNA 干渉を用いた遺伝子のノックアウトの系を構築し、核内蛋白の役割や機構を解明していく。またその際にアポトーシス関連遺伝子産物 に起こる量的変化を mRNA レベルと蛋白発現レベルに分けて詳細に分析する。

細胞の免疫染色や膜上で硝酸銀を用いた独自の (Morimoto Y., Kito S. et al. 2001)、(Kito S. et al. 2003)、(Kito S. et al. 2005) 鍍銀染色を行う。抗ニュークレオリン抗体などの目的蛋白の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、これらの蛋白を検出する。さらにこのニュークレオリンの変化が遺伝子レベルで調節されているかどうかを調べるため PCR 法、ノーザンブロッティング を行い、mRNA の発現量の変化を蛋白量の変化と比較する。

導き出された結果から NORs 構成蛋白の腫瘍細胞における意義を総括し、より正確で再現性のある診断と治療を行うことが出来る指標を作り出していく。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞 (SCC-25) とヒト顎下腺癌由来唾液腺細胞 (HSG) を通法通り培養した。市販のUV 照射装置を工夫して用い、培養細胞の入ったシャーレに適正な量のUV 照射を行った結果、DNA ladder formation により細胞のアポトーシスを確認した。UV 照射量依存的にDNA ladder formationが認められた (図1)。

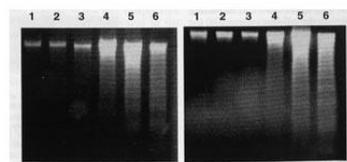


図1 DNA ladder formationによるアポトーシスの確認

(2) SDS-PAGE 電気泳動法で蛋白を分離し、PVDF 膜上に転写し、膜上で硝酸銀を用いた独自の鍍銀染色を行った。膜上の 110 kDa の蛋白は UV 照射量依存的に減少した。また新たに

85-, 95-, 65 kDa の蛋白が現れ、UV 照射量依存的に増加した (図 2) 。

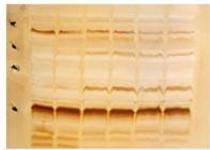


図2 膜上で行った独自の鍍銀染色

(3) 次に抗ニュークレオリン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、これらの蛋白を検出した。110 kDa の蛋白は UV 照射量依存的に減少した。また新たに85-, 95-kDa の蛋白が現れ、UV 照射量依存的に増加した (図 3) 。鍍銀染色の結果と類似する点が多いものと考えられた。

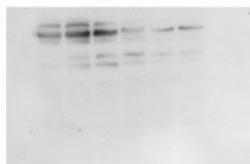


図3 抗ニュークレオリン抗体を用いたウエスタンブロッティング

(4) シャーレ上の培養細胞に鍍銀とHoechst の二重染色を行った。正常細胞ではドット状に局在したAgNOR蛋白がUV 誘導アポトーシス細胞ではその局在は劇的に変化した (図4) 。

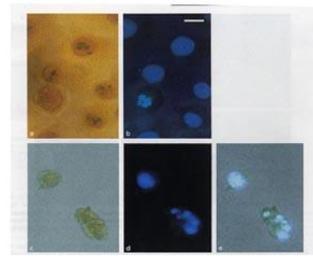


図4 鍍銀とHoechst 33342を用いた組織化学染色

(5) シャーレ上の培養細胞に抗ニュークレオリン抗体を用いた免疫染色とHoechst の二重染色を行った。正常細胞ではドット状に局在したニュークレオリンが UV 誘導アポトーシス細胞ではその局在は劇的に変化した (図5)

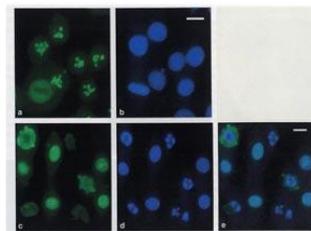


図5 抗ニュークレオリン抗体を用いた免疫組織化学染色

(6) その他ニュークレオリンの mRNA 量は UV 照射により変化しなかった。このことはアポトーシスによるニュークレオリンの発現量の減少、あるいは分解は蛋白分解レベルで調節されており、転写量の減少ではないということを示唆する。さらに RNA 干渉を用いた系では細胞の増殖能が低下し UV 照射に対する感受性が増大することが示唆された。このように悪性腫瘍細胞におけるアポトーシスにおいて核内蛋白の1つであるニュークレオリンの役割の一端が解明されつつあることに本研究の意味がある。今後は他の核内蛋白との相互作用を詳細に調べる。細胞増殖能から見た核内蛋白のダイナミクスと私の専門分野である 歯科放射線学における FDG-PET/CT を始めとする生体内の代謝画像

の相関を地道に追究する予定である。

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)

[雑誌論文] (計10件)

① 鬼頭慎司, 若杉 (佐藤) 奈緒, 小田昌史, 松本 (武田) 忍, 田中達朗, 小菌孝彰, 森本泰宏: 歯科用インプラントの術前 X 線 CT 検査に対する歯科放射線科の役割. 日口診誌査読有 2009; 22: 157-64.

② 鬼頭慎司, 若杉 (佐藤) 奈緒, 田中達朗, 小田昌史, 松本 (武田) 忍, 深井康弘, 時津高俊, 森本泰宏: 歯学部5年生の研究室配属による歯科放射線テーチングファイルの作成. 歯放 2009; 49: 41-7.

③ Tanaka T, Sakamoto E, Shiiba S, Oda M, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Imamura Y, Nakanishi O, Morimoto Y: Relationship between the curative effects of carbamazepine administration and the neurovascular compression volume of the trigeminal nerve measured using magnetic resonance cisternography. Clin J Pain 2009; 25: 752-9.

④ Yoshioka I, Shiiba S, Tanaka T, Nishikawa T, Sakamoto E, Kito S, Oda M, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Kagawa S, Nakanishi O, Tominaga K, Morimoto Y: Importance of clinical features and CT findings in numb chin syndrome: report of two cases. J Am Dent Assoc 2009; 140: 550-4.

⑤ Tanaka T, Konoo T, Yoshioka I, Habu M, Kito S, Kodama M, Oda M, Wakasugi-Sato N, Matsumoto S, Kagawa S, Terashita M, Tominaga K, Morimoto Y: Double contour-like structures”, characteristic magnetic resonance signals

on mandibular condyles seen during child growth. In RESEARCH ADVANCES IN ORAL DISEASES 1. p.15-22, GLOBAL RESEARCH NETWORK, INDIA, 2009.

⑥ Tanaka T, Ono K, Ansai T, Yoshioka I, Habu M, Tomoyose T, Yamashita Y, Nishida I, Oda M, Kuroiwa H, Wakasugi-Sato N, Okabe S, Kito S, Takahashi T, Tominaga K, Inenaga K, Morimoto Y: Dynamic magnetic resonance sialography for patients with xerostomia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 106(1):115-23, 2008.

⑦ 鬼頭慎司, 田中達朗, 若杉奈緒, 岡部幸子, 森本泰宏: 顎口腔領域の膿瘍形成部同定における FASE 拡散強調画像の有用性. 北九医工誌, 18: 39-42, 2008.

⑧ Okabe S, Morimoto Y, Ansai T, Yoshioka I, Tanaka T, Taguchi A, Kito S, Wakasugi-Sato N, Oda M, Kuroiwa H, Ohba T, Awano S, Takata Y, Takehara T: Assessment of the relationship between the mandibular cortex on panoramic radiographs and the risk of bone fracture and vascular disease in 80-year-olds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 106(3):433-42, 2008.

⑨ Yoshioka I, Tanaka T, Oda M, Kodama M, Habu M, Kito S, Okabe S, Wakasugi-Sato N, Kuroiwa H, Tominaga K, Morimoto Y: Usefulness of CT scan images for planning the bone cut for intra-oral vertical ramus osteotomy. J Maxillofac Oral Surg 7: 245-250, 2008.

⑩ Tanaka T, Ono K, Habu M, Inoue H, Tominaga K, Okabe S, Kito S, Yokota M, Fukuda J, Inenaga K, and Morimoto Y: Functional evaluations of the parotid and submandibular glands using dynamic MR

sialography. Dentomaxillofac Radiol 36: 218-223, 2007

〔学会発表〕(計5件)

① 鬼頭慎司 (代表) : FDG 高集積を認め診断に苦慮したアミロイド沈着を伴う下顎骨骨髓炎の一例. 日本歯科放射線学会 第29回関西・九州合同地方会, 2009年11月28日, 岡山大学

② 鬼頭慎司 (代表) : 80才の高齢者ではパノラマエックス線画像上の下顎骨下縁皮質骨所見と骨折あるいは血管疾患リスクとの間に関連はあるのか?. 第50回日本歯科放射線学会総会・学術大会, 2009年5月29, 30日, 大阪

③ S Kito , A Uchida , T Tanaka , N Wakasugi-Sato , S Matsumoto-Takeda , M Oda , T Hiromatsul) , K Harada2) , K Hori3) , I Yoshioka , Y Morimoto:

Correlation between the incidence of central nodal necrosis in neck node metastasis and the degree of differentiation in oral squamous cell carcinoma.

The 7th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology and The 13th Conference of Clinical Diagnostics of JSOMR, November 20-22, 2008 Nara, Japan

④ 鬼頭慎司 (代表) : インプラント術前エックス線 CT 検査における歯科放射線科の対応 -トラブル症例より学んだことと病診連携の方向性に関する考察-

第21回日本口腔診断学会・第18回日本口腔粘膜学会共催学術集会, 2008年9月, 東京.

⑤ 鬼頭慎司 (代表) : 典型的所見を呈した Garrè 骨髓炎の1症例.

日本歯科放射線学会第5回総会・第49回学術大会, 2008年5月, 名古屋.

〔図書〕(計1件)

① Morimoto Y, Tanaka T, Yoshioka I, Yamashita Y, Hirashima S, Kodama M, Ariyoshi W, Tomoyose T, Furuta N, Habu M,

Okabe S, Kito S, Oda M, Kuroiwa H, Wakasugi-Sato N, Takahashi T, Tominaga K: New diagnostic imaging modalities for oral cancers (Chapter 5). In Oral Cancer Research Advances. 125-153, Nova Science Publishers, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 慎司 (KITO SHINJI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号 : 80347682