

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791483

研究課題名 (和文) ウリジンリン酸化酵素 UP の発現抑制による口腔癌転移制御への応用

研究課題名 (英文) Downregulation of uridine phosphorylase expression suppresses tumor metastasis in oral cancer.

研究代表者

宮下 仁 (MIYASHITA HITOSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70372323

研究成果の概要：

口腔癌において、

- ① 口腔扁平上皮癌において RT-PCR により UPmRNA の発現を確認した。また、細胞株における高発現を Western blotting により確認した。
- ② 口腔扁平上皮癌細胞株を用いて UP 高発現癌細胞株の樹立を行った。
- ③ その増殖能についてコントロール細胞株と比較した所、有意に細胞増殖レベルの上昇が認められた。
→ UP の過剰発現により癌細胞増殖活性が高まることが示唆された。
- ④ UP 高発現口腔癌株では p53 の発現が低下していることを示す結果が示唆された。
- ⑤ 口腔癌において、p53 を始めとするがん抑制遺伝子、PTHR1、THRB その他 3p、9q 領域の Locus において LOH および MSI が確認された。

⇒これにより、UPの過剰発現により癌細胞増殖活性が高まること、UPを介在したp53の発現抑制が、その分子機構として機能している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	330,000	2,830,000

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

1. 研究開始当初の背景

・UPはピリミジンヌクレオシドの異化作用に必要な酵素であり、ウリジン⇄ウラシルにおける可逆的リン酸化を触媒すると共に、細胞膜におけるウリジン濃度を恒常的に保つのに必須とされている。

・共同研究者である内田らは、世界で初めてマウス及びヒト UP のクローニングに相次いで成功した (*J Biol Chem* 1995) (*Biochem Biophys Res Commun* 1995)。

・さまざまな癌において正常組織と比較してその発現及び活性の上昇が確認され、さらにその発現と活性が p53 依存性に抑制されることが報告されている (*Cancer Res* 2001)。

<これまでの研究成果>

- ① 我々は UP 抗体を作成し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いて UP の発現を確認後、口腔扁平上皮癌 (OSCC) で免疫染色を施行し局在が細胞壁・細胞膜であること、浸潤部先端の癌細胞で特に強く発現していることを明らかにした (*Cancer* 2002)。
- ② OSCC において、UP の発現が増強していると共に、その発現レベルが頸部リンパ節転移および予後と関連していることを報告した (*Cancer* 2002)。
- ③ 正常組織と比較して乳癌においても UP が mRNA レベルで過剰発現していることを明らかにすると共に、その発現レベルが予後と関連していることを報告した (*Int J Cancer* 2002)。

2. 研究の目的

もう一つのピリミジンヌクレオシドであるチミジンフォスホリラーゼ (TP) は血管新生因子として、大腸癌をはじめ様々な癌で腫瘍血管新生と悪性度及び予後との関連が報告されており、その活性阻害による抗腫瘍効果も確認されている。

一方、現時点において UP は血管新生作用をほとんど有していないことがわかっているが、癌における過剰発現の直接的意義、細胞

増殖活性および転移能の誘導との関連については解析されおらず、今尚不明のままである。そこで、

①「癌細胞増殖活性と転移における UP 介在性の分子機構を p53-UP 経路を中心とし分析する」ことで癌における UP 過剰発現の意義を解明すること。

②「癌における UP の発現抑制により、口腔癌転移制御への応用を目指す」こと。

上記が本研究の目的である。

3. 研究の方法

①UP を NIH3T3 線維芽細胞及びヒト口腔癌細胞株にトランスフェクトし UP 高発現癌細胞株を樹立し、その細胞増殖能について評価を行う。

②UP を高発現させた NIH3T3 及び口腔癌細胞株を用いて p53 発現レベルの増減について評価し、細胞増殖における p53-UP 経路の分子機構について解析する。

③ヌードマウスに移植可能なヒト口腔癌細胞株でも UP 過剰発現株を樹立し、これをヌードマウスに移植し原発巣から早期に転移を来すかどうか、その転移能について検討する。

④RNAi を用いた UP の発現・活性の抑制により、口腔癌の転移を制御するための応用を目指す。

4. 研究成果

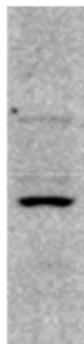
本研究の 2007 年度実績概容として、

①口腔扁平上皮癌において RT-PCR により UP mRNA の発現を確認した。また、細胞株における高発現を確認した。

UP mRNA 発現



口腔癌細胞株におけるUP高発現
(Western Blotting)



②口腔扁平上皮癌細胞株を用いて UP 高発現癌細胞株の樹立を行った。

③その増殖能についてコントロール細胞株と比較した所、有意に細胞増殖レベルの上昇が認められた。

2008 年度研究内容として、

④UP 高発現口腔癌株では p53 の発現が低下していることを示す結果が得られつつある。
→これにより、UPの過剰発現により癌細胞増殖活性が高まること、UPを介したp53の発現抑制が、その分子機構として機能している可能性が示唆された。

⑤口腔癌において、p53 を始めとする Locus において、下記 Figure および Table の如く LOH および MSI が確認された。

(Miyashita H. et al *Mol Med Rep* 1 : 821-825, 2008.)

Total Proportions of LOH and MSI

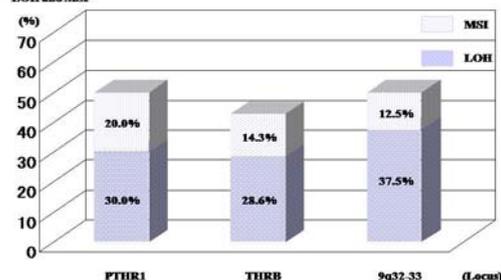


Fig 2. H.Miyashita et al.

Table II. Proportion of loss of heterozygosity and microsatellite instability in OSCC

Case	Locus	MSI/inf (%)	LOH/inf (%)
Endocrine hormone receptor			
<i>PTHR1</i>	D3S1406	2/10 (20.0)	3/10 (30.0)
<i>THRB</i>	THRB	1/7 (14.3)	2/7 (28.6)
Tumor suppressor gene			
<i>p53</i>	TP53	0/12 (0.0)	4/12 (33.3)
<i>APC</i>	D5S196	0/15 (0.0)	2/15 (13.3)
<i>KRCA1</i>	D17S179	0/10 (0.0)	1/10 (10.0)
<i>KRCA2</i>	D18S267	0/12 (0.0)	1/12 (8.3)
<i>DCC</i>	D18S29	1/13 (7.7)	1/13 (7.7)
<i>PIK3</i>	D3S1300	1/13 (7.7)	1/13 (7.7)
The frequency of LOH reported at loci for OSCC			
	D3S1562	0/11 (0.0)	1/11 (9.1)
	D3S1296	0/9 (0.0)	1/9 (11.1)
	D3S192	4/13 (30.7)	2/13 (15.4)
	D8S298	3/10 (30.0)	1/10 (10.0)
	D9S171	0/7 (0.0)	2/7 (28.6)
	D26	3/11 (27.3)	0/11 (0.0)
	D9S162	0/10 (0.0)	3/10 (30.0)
	D9S246	0/10 (0.0)	2/10 (20.0)
	D9S177	1/8 (12.5)	2/8 (25.0)
Microsatellite instability			
	DAT25	1/15 (6.7)	0/15 (0.0)
	D2S123	0/17 (0.0)	1/17 (5.9)
	D8S7	0/14 (0.0)	0/14 (0.0)
	D18S175	0/15 (0.0)	1/15 (6.7)
	D18S153	0/14 (0.0)	1/14 (7.1)
	D17S259	0/16 (0.0)	0/16 (0.0)
	D18S5	0/15 (0.0)	0/15 (0.0)
	D20S100	0/16 (0.0)	0/16 (0.0)

MSI/inf, number of microsatellite instability / informative case; LOH/inf, number of loss of heterozygosity / informative case

今後の課題として、

- ・ヌードマウスに移植可能な口腔癌細胞株においてもUP高発現株を樹立
- ・これらUP高発現株を用いて、初発転移までの期間および転移巣の増殖速度を評価
- ・UPの発現をRNAiにて抑制した場合の、抗腫瘍効果、転移制御を検討を行う予定である。

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3件)

- ① Miyashita H, Mori S, Fukumoto Y, Sato A, Fukumoto M, Kawamura H : Loss of heterozygosity of the PTH/PTHrP type 1 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 1 : 821-825, 2008.

(査読有)

② Ohki K, Miyashita H, Yamaguchi K, Mori S, Kumamoto H, Kawamura H : A case of Leiomyosarcoma of the mandible.

***Tohoku Univ. Dent. J* 27 : 57-63, 2008.**

(査読有)

③ Miyashita H, Kurihara J, Nakagawa H, Kumamoto H, Kawamura H : A case of eccrine porocarcinoma metastasizing to the upper gingiva.

***JJOMS* 53 : 373-377, 2007.**

(査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 「ナノバブルと超音波を用いた抗癌剤および抗腫瘍分子の導入による新たな癌治療法の開発」

第 53 回日本口腔外科学会総会:2008. 10. 20

(徳島)

宮下 仁 (筆頭演者 : 示説)

② 「ナノバブル超音波システムを用いた抗癌剤および抗腫瘍分子の導入による新たな癌治療法の開発」

第 32 回日本頭頸部癌学総会:2008. 6. 12

(横浜)

宮下 仁 (筆頭演者 : 口演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

○学会賞

演題名 : 「ナノバブルと超音波を用いた抗癌剤および抗腫瘍分子の導入による新たな癌治療法の開発」

学会 : **第 53 回日本口腔外科学会総会**

日時 : **2008. 10. 20 (徳島)**

筆頭演者 : 宮下 仁

発表 : 示説

上記発表により、学会賞としてゴールドリボン賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 仁 (MIYASHITA HITOSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 70372323

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :