

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791558

研究課題名 (和文) SCCA 発現亢進／抑制による口腔扁平上皮癌細胞の形質変化の解析

研究課題名 (英文) Analysis of alterations by stably expressing or suppressing SCCA gene in an oral squamous cell carcinoma cell line

研究代表者

橋本 憲一郎 (HASHIMOTO KENICHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00412619

研究成果の概要 (和文)：SCCA (squamous cell carcinoma antigen) の発現亢進あるいは抑制系を確立し、腫瘍形質への影響を検索することを目的とした。SCCA 発現ベクターによる発現制御系が及ぼす培養細胞への影響を観察し、口腔扁平上皮癌の個別化遺伝子治療開発の機転とする。SCCA 発現抑制細胞群では、コントロール群と比較して細胞形態、増殖能に変化を認めなかったことより、SCCA は細胞形態、増殖能へは直接的な影響は少ないことが考えられた。

研究成果の概要 (英文)：This study examined the tumorigenic effect of SCCA (Squamous cell carcinoma antigen) by stably expression or suppression in an oral squamous cell carcinoma cell line. There was no significant difference in the cellular morphology or proliferative activity, which could have been caused by SCCA transfection, between the SCCA suppressive transfectants and the controls. These results suggested that SCCA do not directly play a role in the cellular morphology or proliferative activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：医師薬学

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、SCCA、口腔扁平上皮癌、個別化治療法

1. 研究開始当初の背景

近年、癌疾患における治療のオーダーメイド化が注目されており、分子生物学的研究は

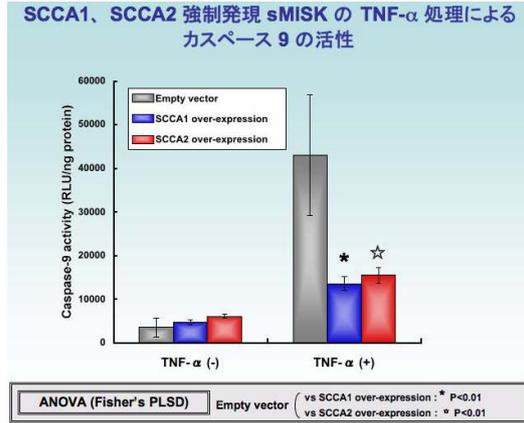
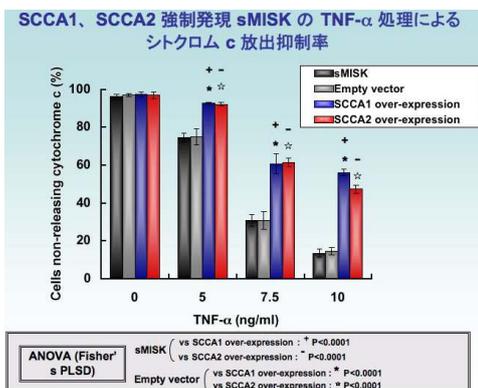
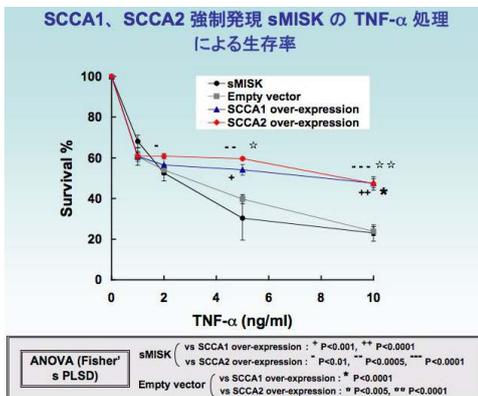
必須である。オーダーメイド化にあたり、癌細胞個別の形質究明が必要である。そのためには、①癌細胞特異的発現蛋白の同定 ②細胞内での特異的蛋白の機能検索 ③特異的

蛋白のパートナー分子の同定・機能検索 ④ 特異的蛋白の発現調節因子 (*cis*-element、*trans*-acting factor) の検索 が重要となる。これらを解明することにより、癌細胞特異的蛋白を標的分子とした発現調節機構の確立が可能となり、癌の遺伝子治療あるいは予防に役立つものと考えられる。

本研究では標的分子として、SCCA を取り扱う。SCCA は扁平上皮癌に特異的に強発現し、扁平上皮癌の特異的腫瘍マーカーとして使用されている。マーカーとしてだけでなく、腫瘍形成に直接的な影響を及ぼすとされ、その例として、抗癌剤、放射線などの細胞死誘導に対して抵抗性を示すことが報告されている。ただし、アイソフォーム (SCCA1、SCCA2) があり、それぞれの腫瘍形質への影響、パートナー蛋白、発現調節機構については詳細に解明されていない。

2. 研究の目的

以前に SCCA 強制発現細胞群を用いて、SCCA1、SCCA2 の発現が TNF-alpha による細胞死に対して抵抗性を示すことで、腫瘍形成能を上昇させることを報告した。また、SCCA 強制発現細胞群は、細胞死誘導時にミトコンドリアからのシトクロム c 放出に対して抑制効果を示した。さらに、その下流におけるカスパーゼ 9 活性の抑制も認めた (下図)。



今回は SCCA の発現抑制系を確立し、腫瘍形質への影響を検索することを目的とする。SCCA 発現ベクターによる発現抑制系が及ぼす培養細胞への影響を観察し、口腔扁平上皮癌の個別化遺伝子治療開発の機転とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現ベクターのマルチクローニングサイトに遺伝子配列と相補的な塩基配列を組み込み (アンチセンス法)、MISK81-5 (扁平上皮癌細胞株) にトランスフェクション (リポフェクション) した。単一細胞をクローニングして、その遺伝子の発現抑制は半定量的 RT-PCR にてコントロール群と比較した。恒常的に SCCA (whole SCCA) の発現を抑制させた細胞株を樹立した (図 1)。

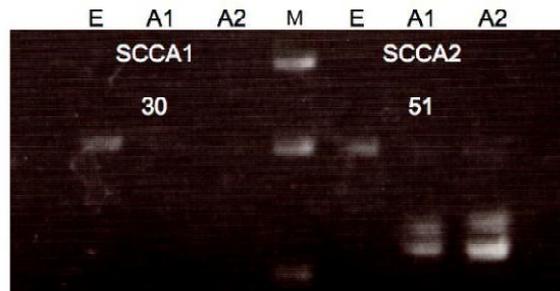


図 1. アンチセンス法を用いた MISK81-5 の SCCA 発現抑制。

SCCA1 と SCCA2 遺伝子ともに恒常的に抑制させた MISK81-5 を樹立した。SCCA mRNA 発現レベルは、特異的プライマーを用いて (SCCA1: 左側、SCCA2: 右側) 半定量的 RT-PCR にてコントロール群と比較した。PCR サイクルは SCCA1 は 30 サイクル、SCCA2 は 51 サイクルとした (白文字)。E: コントロール、A1: SCCA1 発現抑制群、A2: SCCA2 発現抑制群、M: マーカー。

樹立した細胞株を用いて、細胞形態、増殖能の検討を行った。

(2) アンチセンス法による SCCA 発現抑制は SCCA1 と SCCA2 の両遺伝子発現を抑制していた。SCCA1、SCCA2 各々の機能を解析するため、各々の遺伝子発現を抑制させることにした。SCCA1、SCCA2 は相同性が高く（アミノ酸配列・塩基配列で各々95%・92%の相同性）、微細な塩基配列の相違でも発現抑制可能とされる RNAi 法を用いることにした。siRNA の発現には p*Silencer*[™] 1.0-U6 siRNA Expression Vector (Ambion 社) を使用した。SCCA1、SCCA2 mRNA のコーディング領域に両遺伝子間での塩基配列の相違を認める箇所を確認し、siRNA ターゲットサイトを決定した。ターゲットサイトは SCCA1 で 4 箇所、SCCA2 では 2 箇所設定した（図 2）。ターゲットサイトを組み込んだ上記ベクターを作製し、MISK81-5 にトランスフェクション（リポフェクション）した。

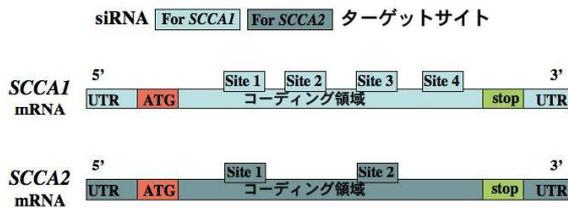


図 2. siRNA ターゲットサイトの模式図

単一細胞をクローニングして、その遺伝子の発現抑制は半定量的 RT-PCR にてコントロール群と比較した（図 3）。MISK81-5 SCCA2 site1 発現抑制群クローン②にて、SCCA2 のみを特異的に抑制した細胞株を樹立した（SCCA1 は発現抑制されていない）。SCCA1 mRNA に対する発現抑制（site 1-4）、SCCA2 mRNA に対する site 2 による発現抑制は確認できなかった。

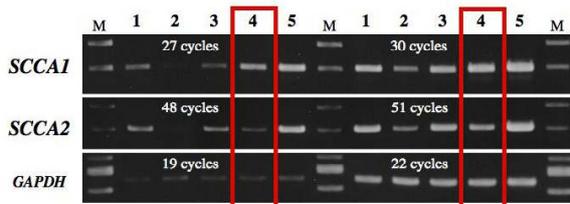


図 3. RNAi 法による MISK81-5 の SCCA2 発現

抑制。

1:MISK81-5、2:sMISK（扁平上皮癌細胞株）、3:MISK81-5 SCCA2 site1 発現抑制群クローン①、4:MISK81-5 SCCA2 site1 発現抑制群クローン②、5:MISK81-5 SCCA2 site1 発現抑制群クローン③、M:マーカー

樹立した細胞株を用いて、細胞形態、増殖能、浸潤能の検討を行った（浸潤能の検索にはインベージョンチャンバーを用いた）。

4. 研究成果

(1) Whole SCCA 遺伝子発現を恒常的に抑制する細胞株の樹立はできたが、SCCA1、SCCA2 各々が特異的に抑制できた細胞株は樹立できなかった。作製した細胞株を用いて、SCCA 発現抑制により経時的な細胞形態の変化、増殖能におけるコントロール群との比較、検討を行った。細胞形態、増殖能において、発現抑制群とコントロール群に明らかな差異は認めなかった。

Whole SCCA 発現抑制細胞群では、コントロール群と比較して細胞形態、増殖能に変化を認めなかったことより、SCCA は細胞形態、増殖能へは直接的な影響は少ないことが考えられた。

(2) SCCA2 のみの恒常的に発現抑制させた細胞株を用いて経時的な細胞形態、増殖能・浸潤能に与える影響をコントロール群と比較、検討した。細胞形態、増殖能、浸潤能において、発現抑制群とコントロール群に明らかな差異は認めなかった。

SCCA2 は細胞形態、増殖能、浸潤能へは直接的な影響は少ないことが考えられた。

SCCA2 に対する抑制が mRNA レベルで確認できたが、SCCA1 については siRNA ターゲットサイトなどを再度追試中である。また、遺伝子発現抑制細胞株の樹立後はサイトカインや抗癌剤を用いた細胞の反応、アポトーシス誘導抵抗性なども検討し、機能解析を図る予定である。

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）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 憲一郎 (HASHIMOTO KENICHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00412610

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：