

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791812

研究課題名(和文)

口腔扁平上皮癌のインターフェロン耐性を克服するための分子基盤の確立

研究課題名(英文)

Molecular mechanisms of resistance to interferon-gamma in human oral squamous carcinoma.

研究代表者

関根 圭輔 ( SEKINE KEISUKE )

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

研究成果の概要(和文)：

本研究ではヒト口腔扁平上皮癌細胞での IFN $\gamma$  による増殖抑制の分子メカニズムの解明を試みた。申請者等はこれまでに IFN $\gamma$  による Rb の活性化が増殖抑制を引き起こすことを明らかにしている。そこでまず、IFN $\gamma$  刺激による Rb の活性化が IFN $\gamma$  下流のシグナル分子 STAT1 を介することを明らかにした。次に IFN $\gamma$  刺激により Rb の活性化を引き起こす分子を探索し、IFN $\gamma$  刺激により Rb の活性化より上流で発現が上昇する分子を見いだした。IFN $\gamma$  刺激により細胞増殖阻害に至る IFN $\gamma$ →STAT1→MYC, E2F 抑制→Rb 活性化→CyclinA2, Cdk2 抑制→細胞増殖抑制という一連の経路が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

In this study, I examined the molecular mechanisms underlying the IFN-gamma dependent cell cycle arrest observed in human oral squamous cell carcinoma. I have previously revealed that IFN-gamma induced Rb activation results in cell cycle arrest. First, it is revealed that STAT1, a signal transducer of IFN-gamma mediate IFN-gamma dependent Rb activation. Second, it is revealed that there are several molecules that is up-regulated through IFN-gamma stimuli and which is observed up-stream of Rb activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでIFN $\gamma$ の抗腫瘍活性、特にその細胞増殖抑制作用についてはいくつかの研究がなされている。しかしながら、これまで口腔癌細胞におけるIFN $\gamma$ 作用を詳細に解析した報告は無い。

さらに、既報の他の細胞種でのIFN $\gamma$ による細胞増殖抑制作用についてもp53経路によるもの以外、いくつかの細胞周期関連遺伝子の発現解析のみで、実際にどのようなシグナル経路により、それら細胞周期関連遺伝子の発現に影響を及ぼすのか明らかにされていない。さらに最も重要なIFN $\gamma$ 耐性の分子メカニズムはJak-STAT経路に異常のある癌細胞が存在するという以外、Jak-STAT経路が正常な癌細胞におけるIFN $\gamma$ 耐性の分子機構は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

IFN $\gamma$ の細胞増殖抑制の直接の標的を明らかにし、その一方でCa9-22細胞で見られるIFN $\gamma$ 抵抗性がどの分子の異常で起こるのかを明確にすることを目的としている。

本研究課題を行うことにより、IFN $\gamma$ 抵抗性細胞の抵抗性の分子メカニズムを明確にしその抵抗性を克服する方策を見出し、口腔癌の診断、治療、予後の改善に役立てることが可能になると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) IFN $\gamma$ による細胞増殖抑制がIFN $\gamma$ の主要なシグナル分子であるSTAT1を介しているか否かを明らかにする目的で、siRNAを用いてSTAT1の発現を抑制し、Cyclin A2とCdk2の発現抑制が解除されるか否か検討した。

(2) HSC-2におけるIFN $\gamma$ による細胞増殖抑制のメカニズムを解明するため細胞周

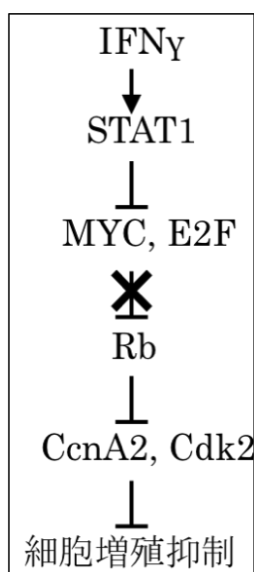
期に関わる分子の発現をWestern blotおよびquantitative PCRにより検討した。

(3) 上記(2)で抽出された分子がIFN $\gamma$ シグナルによるRbを活性化(リン酸化抑制)よりも上流で機能するか否かを明らかにするためRbの抑制下でもIFN $\gamma$ 刺激によりこれら分子が制御されるか否か検討した。

## 4. 研究成果

IFN $\gamma$ による細胞増殖抑制がIFN $\gamma$ の主要なシグナル分子であるSTAT1を介しているか否かを明らかにする目的で、siRNAを用いてSTAT1の発現を抑制すると、IFN $\gamma$ 感受性のHSC-2細胞に於いてIFN $\gamma$ 依存的な細胞増殖抑制が解除された。つまり、IFN $\gamma$ 刺激によりSTAT1下流でRbのリン酸化が抑制され、その結果、細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。更に、いくつかの細胞増殖抑制に関連する遺伝子の発現がIFN $\gamma$ により制御されることをWestern blotとqPCRにより見出した。まず、サイクリン遺伝子の発現を直接制御するE2Fファミリータンパク質の発現抑制がみられた。さらにcMycの機能を抑制するタンパク質の発現が上昇することをみいだした。一方で、MycファミリーのcMyc, N-Myc, L-Mycの発現はほとんど変化しなかった。これらタンパク質の発現は細胞増殖抑制作用を持つTGF $\beta$ により制御されることから、次に、TGF $\beta$ の発現制御を介した間接的な作用である可能性を検討した。HSC-2細胞にTGF $\beta$ を添加したところTGF $\beta$ によるこれらタンパク質の発現上昇は見られなかった。よって、細胞増殖制御関連因子の発現制御はIFN $\gamma$ による直接作用であることが明らかとなった。

更に、これら細胞増殖制御関連因子の発現制御が IFN $\gamma$  による Rb の抑制の結果として起こるのか IFN $\gamma$  が直接制御するのか検討した。すると IFN $\gamma$  による細胞増殖制御関連因子の発現制御は Rb の機能を阻害した際にも観察されたため、直接作用であることが明らかとなった。以上のことから IFN $\gamma$  刺激により細胞増殖阻害に至る一連の経路が明らかになった(下図)。



#### 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)

1

Ishikawa M, Sekine K†, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J and Taniguchi H. (2011) †equal contribution.

Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor.

J Biosci Bioeng. 111, 711-718.

2

Sakagami H, Zhou L, Kawano M, Thet MM, Tanaka S, Machino M, Amano S, Kuroshita R, Watanabe S, Chu Q, Wang QT, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Sekine K, Shirataki Y, Zhang CH, Uesawa Y, Mohri K, Kitajima M, Oizumi H, Oizumi T. (2010) Multiple Biological Complex of Alkaline Extract of the Leaves of *Sasa senanensis* Rehder.

In Vivo 24, 735-743.

3

Chen YR, Sekine K, Nakamura K, Yanai Y, Tanaka M, Miyajima A. (2009)

YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase-I by suppressing C/EBP $\alpha$  function in mice Gastroenterology 137, 330-340.

4

Amano S, Sekine K, Bonewald LF, Ohmori Y. (2009)

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. 221, 40-53.

5

Hiroi M, Mori K, Sekine K, Sakaeda Y, Shimada J, Ohmori Y. (2009).

Mechanisms of resistance to interferon-gamma-mediated cell growth arrest in human oral squamous carcinoma cells.

J Biol Chem. 284, 24869-24880.

〔学会発表〕（計3件）

1

関根圭輔, 石川桃太郎, 松井智栄美, 須崎敦大, 川下金明, 大島祐二, 鄭允文, 谷口英樹 転写因子 Pdx1 の可視化による膝幹/前駆細胞の選択的分離と特性解析

日本バイオイメージング学会

2010年9月10日

慶應義塾大学日吉キャンパス(横浜)

2

関根圭輔, 藤原綾二, 小池直人, 千葉豊生, Dai Fukumura, Rakesh K. Jain, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹

血管ネットワークを有したヒト肝組織の生体内再構築系の確立

日本分子生物学会 2010年12月10日

神戸ポートアイランド(神戸)

3

Sekine K, Ohmori Y.

Regulation of pRb but not p53 by IFN $\gamma$  in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

日本分子生物学会 2009年12月12日

パシフィコ横浜(横浜)

〔図書〕（計1件）

1

「現代栄養学を理解するための 分子生物学入門」

関根圭輔 p134-p142

光生館 加藤茂明／編著 2010年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE KEISUKE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号 : 00323569

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :