

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791964

研究課題名(和文) 新規遺伝子 RIG-I を用いた細胞周期制御による新たな癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development for the cancer therapy to regulate cell cycle by novel gene RIG-I

研究代表者

榊 宏剛 (SAKAKI HIROTAKA)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90374850

研究成果の概要(和文)：

常在性の細菌やウイルスの侵入に常にさらされる口腔内において組織が恒常性を保つためには、口腔内に特異的な免疫機構を有するものと推測される。それゆえ申請者は、RIG-I の役割について解析を行い、同遺伝子を用いた遺伝子治療につながる基礎的研究を行ってきた。

本研究においては、これまで遂行してきた RIG-I 遺伝子の機能解析に加えて、口腔癌由来細胞株を用いて同遺伝子のシグナル伝達経路を明らかにし、口腔癌細胞の細胞周期を制御することを目的とする。

本研究は臨床的応用においても有用であり、新たな遺伝子治療に発展する可能性を包含している。即ち、将来的には、遺伝子治療による細胞周期制御と免疫治療を包含した全く新たな癌治療法の開発につながる可能性も想定される。

研究成果の概要(英文)：

The interior of the mouth is constantly exposed to its resident bacterial flora and to invasion by viruses, and there is thought to be a specific intraoral immune system for the tissues to maintain homeostasis. We have been analyzing the role of RIG-I as basic research that could lead to gene therapy using this gene.

In the present study, we aimed to perform functional analysis of RIG-I using an oral carcinoma-derived cell line in order to clarify the signal transduction pathway of RIG-I, with the aim of controlling the cell cycle in oral cancer cells.

The present study is useful from the point of view of clinical application, as it incorporates the possibility of development into a novel gene therapy. We envision the future development of a completely novel cancer therapy incorporating cell cycle regulation by gene therapy and immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：遺伝子、癌、歯学、RIG-I

1. 研究開始当初の背景

RIG-I(retinoic acid-inducible gene I)は分

化誘導遺伝子として遺伝子バンクに登録されているが、その機能はいまだ明らかにされていない新規の遺伝子である。

申請者は平成 17・18 年度科学研究費補助金(若手 B: 口腔粘膜における感染防御機構の解明ならびに遺伝子治療の基礎的研究)の交付を受け、RIG-I 遺伝子が細菌・ウイルス感染の際に口腔粘膜における免疫反応を賦活化させ、口腔粘膜における感染防御機構に重要な役割を果たしていることを明らかにし、報告した。

加えて、平成 19・20 年度科学研究費補助金(若手 B: 新規分化誘導遺伝子 RIG-I の導入による新たな口腔癌治療法の開発)の交付を受け、RIG-I 遺伝子の腫瘍抑制遺伝子としての可能性を検討した。上記研究の過程で施行した cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析によって、RIG-I 遺伝子が歯肉癌細胞の細胞周期に深く関与し、アポトーシスを誘導している可能性を見出した。

以上の研究過程で RIG-I は免疫機構の賦活化を促している可能性が高く、癌細胞のアポトーシスを誘導して抗腫瘍効果を示すものと推測された。

近年、免疫療法的一端として、頭頸部や肺の悪性腫瘍に対し、二本鎖 RNA を癌細胞に導入することによって、効果的な腫瘍抑制効果が期待されることが報告されている。しかしながら、生体に対し、ウイルス(二本鎖 RNA) 導入を行うことは危険性を伴い、臨床応用への妨げになることが予想される。

そこで申請者は RIG-I 遺伝子を用いた、ウイルス導入を行うことなく、ウイルス導入や化学療法と同等の効果が期待される新たな遺伝子治療の可能性に着目した。

2. 研究の目的

常在性の細菌やウイルスの侵入に常にさらされる口腔内において組織が恒常性を保つためには、口腔内に特異的な免疫機構を有するものと推測される。それゆえ申請者は、RIG-I の役割について解析を行い、同遺伝子を用いた遺伝子治療につながる基礎的研究を行ってきた。

本研究においては、これまで遂行してきた RIG-I 遺伝子の機能解析に加えて、口腔癌由来細胞株を用いて同遺伝子のシグナル伝達カスケードを明らかにし、口腔癌細胞の細胞周期を制御し、加えてアポトーシスに導くことを目的とする。

3. 研究の方法

平成 21 年度

口腔癌由来細胞株における RIG-I 遺伝子導入による細胞周期制御の検討

ここでは、平成 17・18 年ならびに平成 19・20 年度科学研究費補助金で施行した mRNA レ

ベルでの発現変化を cDNA マイクロアレイによって検討した結果をもとに、蛋白産生レベルで包括的に検討した。

①細胞培養と RIG-I 遺伝子導入ならびにウイルス刺激

口腔癌由来細胞株として、HSC-3(舌癌由来細胞株: 高転移性)、HSC-4(舌癌由来細胞株: 低転移性)、Ca9-22(歯肉癌由来細胞株)、を培養ディッシュ上で継代培養した。培地中に二本鎖 RNA (口腔内のウイルス感染を想定) として poly IC

(polyinosinic-polycytidylic acid) を添加し、一定時間刺激後細胞より RNA または蛋白を回収した。また、過去に申請者が行った検討で得られた導入条件で、RIG-I 遺伝子を細胞内に導入し、同様に RNA または蛋白を回収した。この際、随時、RIG-I、各種サイクリン関連遺伝子、転写因子 E2F に対して定量的 RT-PCR およびウエスタンブロッティングを施行し、癌細胞株に対し細胞周期抑制効果が期待できる至適な刺激条件を検討した。

②口腔癌由来細胞株におけるプロテインアレイを用いた包括的蛋白解析

①で刺激条件決定後、回収した蛋白を用いてプロテインアレイを施行し、RIG-I 刺激あるいは poly IC 刺激によって発現変化が認められる蛋白を包括的に検討した。過去に申請者が行った予備的な検討では、歯肉癌由来細胞株において、mRNA レベルでは RIG-I 遺伝子導入によって G1/S 期および G2/M 期進行が抑制されることを確認しているため、プロテインアレイでも同様の結果が予測された。

③RIG-I および関連蛋白刺激による細胞周期の変動を検討

②のスクリーニングでしぼり込まれた目的遺伝子の蛋白および RIG-I 刺激による細胞周期の変動をフローサイトメーターを用いて詳細に検討した。

平成 22 年度

平成 21 年度の細胞周期制御の検討に加えて、本年度は細胞増殖を抑制したうえで不活化した癌細胞をアポトーシスに導くのが目的である。

①統計解析によるシグナル伝達カスケードの解明

平成 21 年度に施行したプロテインアレイを用いた網羅的蛋白解析の結果と、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果を併せて統計解析を行う。データ間の総合的な統計解析処理に関しては、東北化学薬品(株)生命システム研究所に依頼した。

②RIG-I が bc1-2 遺伝子発現および蛋白産生

におよぼす影響の検討

申請者が過去に行った検討では癌細胞のアポトーシスを抑制している bcl-2 遺伝子発現が、RIG-I 刺激で減少し、腫瘍抑制遺伝子として機能していることが予測された。

そこで、前述した複数の癌細胞株に対して bcl-2 の遺伝子シーケンスを施行し、野生型か変異型かを見極めた後、RNA interference の手法で bcl-2 遺伝子を抑制する。bcl-2 mRNA を抑制した細胞に RIG-I 刺激を加え、定量的 RT-PCR およびウエスタンブロットリングを施行し、RIG-I のアポトーシス誘導能を検討した。

③細胞増殖アッセイを用いたアポトーシスの検討

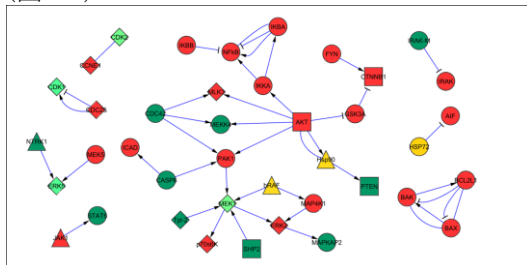
②において確認された遺伝子の発現および RIG-I 遺伝子が、実際に癌細胞のアポトーシスに与える影響を MTT アッセイを用いて検討した。

平成 21 年度に検討した条件で培養・刺激した細胞を MTT アッセイキットを用いて、プレートリーダーで測定した。

4. 研究成果

遺伝子発現レベルでのパスウェイ解析の結果、サイクリンファミリー、CDK ファミリーおよび CDC25 ファミリーに発現減少が認められた。また、RIG-I 強制発現した際には S 期移行に関連する転写因子 E2F の発現減少および細胞周期停止に関わる CDKN1A の発現上昇が認められた。蛋白産生レベルでのパスウェイ解析の結果、CDK ファミリーの発現減少が認められた。細胞周期関連遺伝子の発現挙動を描画した結果、RIG-I 強制発現することで G2/M 期進行のチェックポイントに関与し細胞周期の停止に関与する CHEK1、およびその下流に位置する CDC25C が発現上昇することが認められた。また DNA 修復経路に関連する PCNA も発現上昇傾向を示した。このことから RIG-I は口腔癌細胞株の細胞周期制御に関与していることが示唆された。

プロテインアレイによるパスウェイ解析 (図 1)

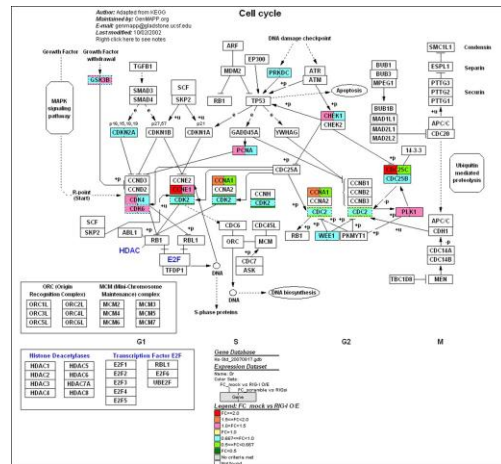


Mock VS RIG-I O/E

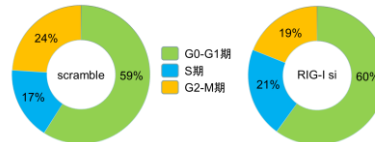
◇: cell cycle, □: cell cycle and Cancer Gene Census, △: Cancer Gene Census, ○: Neither cell cycle nor Cancer Gene Census

● fold change value ≥ 1.5 , ● $1.5 > \text{fold change value} \geq 1.0$, ● fold change value ≤ -1.5 , ● $-1.5 < \text{fold change value} \leq -1.0$

GenMAPP パスウェイ図 (図 2)



フローサイトメトリーを用いた細胞周期の変動解析 (図 3)



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 2 件)

1. Kobayashi W., Teh B. G., Sakaki H., Sato H., Kimura H., Kakehata S., Nagahata M.: Superselective intra-arterial chemoradiotherapy with docetaxel-nedaplatin for advanced oral cancer. Oral Oncol. 20 : 46(12):860-3. 2010、査読有

2. 小林 恒, 鄭 明源, 榎 宏剛, 佐藤寿, 中川 祥, 久保田 耕世, 木村博人: 口腔癌に対する docetaxel と nedaplatin を用いた超選択的動注化学放射線治療の臨床的検討. 頭頸部癌 36(3) : 297-302 2010. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. 榎 宏剛、他: 口腔癌由来細胞株における新規遺伝子 RIG-I を用いた細胞周期制御の検討、第 55 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2010 年 10 月 16 日、幕張メッセ(千葉)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊 宏剛 (SAKAKI HIROTAKA)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90374850

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：