

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791966

研究課題名（和文）遺伝子損傷に対する応答調節因子 Pin1 の活性阻害による口腔癌細胞の増殖制御

研究課題名（英文）Inhibition of Pin1 activity suppresses tumor growth 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（和文）：(1) 口腔がん細胞株を用いて Pin1 高発現細胞株の樹立を行った。その増殖能について control と比較した所細胞増殖速度の上昇を示唆する結果が得られた。(2) Pin1 高発現株では CyclinD1 の発現も有意に増加しており、細胞増殖における Pin1-CyclinD1 機構が口腔がん細胞株においても確認された。(3) 口腔がんを含む各種（大腸がん、卵巣がん等）細胞株において Pin1 蛋白の発現を定量したが、特に肝がん細胞株ではいずれも発現量が他のがんより少ないことが分かった。(4) 上記全がん細胞株において Pin1 の変異は認められなかった。(5) Pin1 阻害剤を用いたアッセイにより、48 時間後に細胞周期が S 期に誘導されることを発見したが、特異的な細胞周期停止は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：(1) We established oral cancer cell line with Pin1 overexpression. The growth rate of this cell line was up-regulated. (2) In this cell line, Expression level of Cyclin D1 was also up-regulated. (3) We detected Pin1 protein levels with some kinds of cancer cell line including oral cancer, colon cancer, ovarian cancer and hepatocellular carcinoma. The expression level of Pin1 in HCC was lower than that of other cance. (4) No mutation was found in all of those cell line. (5) Treatment with Pin1 inhibitor increased the population of cells in S phase at 48hr. However, there was not a specific cell cycle arrest.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
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：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) プロリリソメラーゼPin1は、mitosisの制御に必須の酵素として最初に報告 (*Nature* 1996)された。
- (2) 乳癌においてPin1が高発現しており、Rasと協調してc-Jun→CyclinD1への転写活性を増強させることが明らかになると共に (*EMBO J* 2001)、APCとの相互作用を阻害する事で、 $\beta$ -cateninの代謝回転と細胞内局在を制御している事が解明 (*Nat Cell Biol* 2001)された。
- (3) 本共同研究者の内田らは、世界に先駆けてPin1ノックアウトマウスを作成することに成功し、Pin1<sup>-/-</sup>MEFではG0から細胞周期が回転しないことを報告 (*BBRC* 1995) した。さらにプロリリソメラーゼPin1が、遺伝子損傷毒性に対する応答において、癌抑制遺伝子p53の調節因子であること (*Nature* 849-85, 2002) (*Nature* 853-857, 2002) 癌遺伝子c-Mycの分解を調節することで細胞の癌化を制御していること (*Nat Cell Biol* 2004)を報告した。
- (4) 臨床的には、肝癌でPin1の高発現とこれによる $\beta$ -cateninの蓄積が癌化に深く関与し (*Oncogene* 2004)、非小細胞肺癌においてPin1過剰発現がリンパ節転移と相関すること (*Lung Cncer* 2007)が報告された。近年、Pin1 RNAiにより前立腺癌が抑制されること (*Cli Cancer Res* 2005)、Erk/Pin1経路の阻害で骨髄性白血病細胞が減少すること (*Cancer Res* 2008)が報告されている。

## 2. 研究の目的

リン酸化により活性変化を生じる様々な転写因子を統括しているPin1は、上記報告からも分かるように正常組織と癌細胞とは全く異なる変化を誘導する分子である。

即ち、正常組織においては遺伝子損傷に対し、Pin1がリン酸化p53と結合しp53応答を活性化することで細胞周期やアポトーシスを調節する。また、c-Mycの分解を促進させて癌化を制御している。

それに対して、口腔癌や乳癌をはじめとする種々のヒト癌細胞でPin1は高発現しておりその活性も高く、肝癌や肺癌、乳癌ではPin1高発現と癌転移あるいは予後とが相関していることという点においてである。

⇒口腔癌において、Pin1過剰発現の直接的意義、p53制御機構および細胞増殖活性の詳細について、本研究課題によりその解明を目指そうとするに至った。

- (1) 口腔癌細胞の増殖活性におけるPin1分子機構をcyclin D1活性経路、p53制御機構を中心に解析することで、Pin1過剰発現の意義を明らかにする。
- (2) 最終的にはPin1の阻害により口腔癌細胞の増殖制御を目指す事が目的である。

## 3. 研究の方法

- (1) Pin1 高発現ヒト口腔癌細胞株を樹立し、細胞増殖能について評価を行う
- (2) Pin1 高発現口腔癌細胞株を用いて上記分子の発現レベルの増減について評価し、合わせて細胞増殖能との関係についても解析する。他種の癌細胞株について

も同様に行う。

- (3) ノードマウスに移植可能なヒト口腔癌細胞株でも Pin1 高発現株を樹立し、これをノードマウスに移植し、その細胞増殖能について検討する
- (4) RNAi を用いた Pin1 の活性阻害による癌細胞の増殖制御を検討する

#### 4. 研究成果

我々は既に

- ・Pin1 が口腔癌において過剰発現していることを免疫染色にて確認した、
- ・Pin1 の発現が CyclinD1 の過剰発現と相関していることを mRNA 及び蛋白レベルで明らかにした。

本研究の成果として、

- (1) 口腔癌細胞株を用いて Pin1 高発現細胞株の樹立を行った。

口腔癌細胞株  
Control Pin1 高発現



- (2) その増殖能について control 細胞株と比較した所、細胞増殖速度の上昇を示唆する結果が得られた。口腔癌以外の細胞株においても同様であった。
- (3) Pin1 高発現細胞株では CyclinD1 の発現も有意に増加しており、細胞増殖における Pin1-CyclinD1 機構が口腔癌においても確認された。

(4) 口腔癌 (HSC2, HSC4)、大腸癌 (HCT116)、卵巣癌 (OVK2, SKOV3)、肝癌 (HLE, HEPG2, Huh7) cell line において、Western blotting によ

り Pin1 蛋白の発現を定量したが、特に肝がんの cell line では発現量が他の cell line より少ないことが分かった。

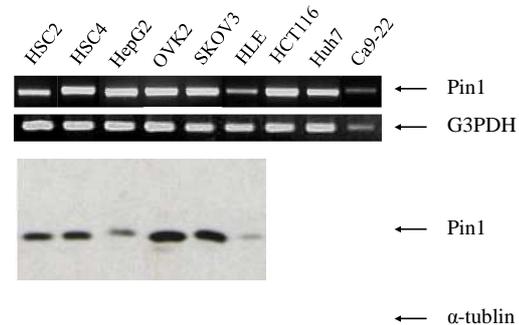


Fig.3. Pin1 mRNA and protein expressions in each cell line

- (5) 上記全 cell line において Pin1 の mutation は認められなかった。
- (6) Pin1 阻害剤を用いた assay により、口腔癌を含む各種癌細胞 (大腸癌、卵巣癌等) 株においても細胞増殖が制御されることを確認した。

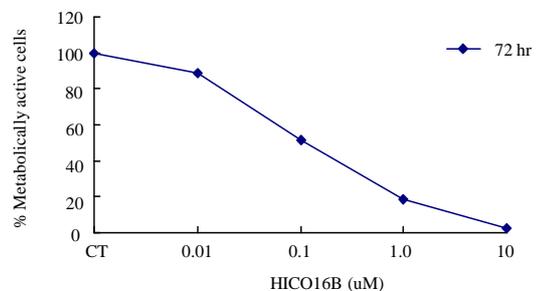


Fig.2. Inhibition of proliferation by Pin1 inhibitor.

- (7) 48 時間後には S 期に誘導されることが分かった。但し明らかな細胞周期の停止は確認されなかった。

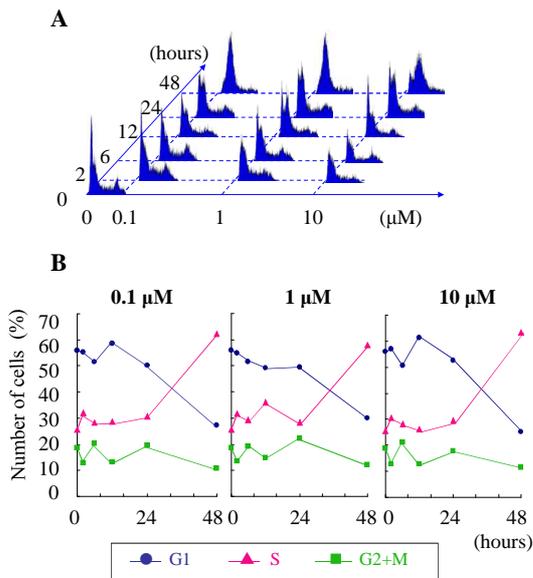


Fig.4. Cell cycle effect of Pin1 inhibitor

今後の課題及び予定は下記の通りである。

- ・ Pin1 RNAi を用いた活性阻害について
- ・ マウスを用いた in vivo における癌細胞増殖能の制御について

#### 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) **Kurihara J, Mizuta K, Miyashita H, Masaki E**: Anesthetic Management with Remifentanyl-Midazolam Sedation for the Patient Glossectomy in the Severe Cirrhotic Patient with Chronic Renal Failure. *Journal of Japanese Dental Society of Anesthesiology* 39 : 194-5, 2011 査読有
- (2) **Oikawa M, Shimizu Y, Sugawara Y, Miyashita H, Tanda N, Kumamoto H**: An autopsy case of chronic graft-versus-host-disease (cGVHD) with special reference to oral involvement.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 「ナノバブルと高周波超音波による腫瘍血管構築と VEGF の発現に関する分子学的検討」  
第 55 回日本口腔外科学会総会  
2010 年 10 月 17 日 千葉  
宮下 仁 (筆頭演者)
- (2) 「ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた口腔癌の遺伝子治療法を想定した分子導入法の検討」  
第 55 回日本口腔外科学会総会  
2010 年 10 月 17 日 千葉  
大木 宏介, 宮下 仁 他
- (3) 「口腔癌早期診断のためのナノバブルと超音波を用いた腫瘍血管画像構築と血管内皮増殖因子の発現に関する分子病理学的検討」  
第 34 回日本頭頸部癌学会総会  
2010 年 6 月 10 日 東京  
宮下 仁 (筆頭演者)
- (4) 「口腔癌早期診断のためのナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断法に関する組織学的検討」  
第 34 回日本頭頸部癌学会総会  
2010 年 6 月 10 日 東京  
柳下 陽子, 宮下 仁 他
- (5) Volumetric and angiogenic imaging system by using nanobubbles and high-frequency ultrasound for evaluation of the antitumor effect by cisplatin.  
**The 5th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics**  
2010 年 2 月 24 日 仙台  
Yagishita Y, Miyashita H, et al
- (6) 「口腔がんの早期発見における歯科医師の果たす役割と連携の向上」  
**口腔がん健診特別研修会**  
2010 年 1 月 31 日 仙台  
宮下 仁 (招待講演)
- (7) 「口腔ケアケースカンファレンス」  
**がん口腔ケア特別研修会**  
2009 年 12 月 4 日 仙台  
宮下 仁 (招待講演)
- (8) 「口腔癌治療のためのナノバブルと超音

波を用いた抗腫瘍効果増強法に関する検討」  
第54回日本口腔外科学会総会  
2009年10月9日 札幌  
宮下 仁 (筆頭演者)

(9) 「ナノバブルを用いた高周波超音波診断装置の遠隔地口腔癌診断への応用」  
第54回日本口腔外科学会総会  
2009年10月9日 札幌  
森 士朗、宮下 仁 他

(10) 「ナノバブルと超音波を用いた高周波超音波診断装置による微小転移検出に関する検討」  
第54回日本口腔外科学会総会  
2009年10月9日 札幌  
大木 宏介、宮下 仁 他

〔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  
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：