

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791580

研究課題名（和文）頭頸部癌増殖・浸潤における G691S RET polymorphism の機能解析

研究課題名（英文）Functional analyses of G691S RET polymorphism in proliferation and invasion of head and neck cancers

研究代表者

成田 憲彦（NARITA NORIHIKO）

福井大学・医学部・助教

研究者番号：80345678

研究成果の概要（和文）：チロシンレセプターキナーゼの1つである RET の polymorphism、G691S RET が下流にある ERK および AKT のリン酸化を亢進・延長させ、頭頸部癌の増殖・浸潤能を亢進させる可能性を証明した。頭頸部癌手術時採取標本において神経向性を示す例には G691S RET polymorphism が高率に内包されることが解った。これらのことから G691S RET polymorphism は頭頸部癌の増殖・浸潤転移を亢進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It was proven that G691S RET polymorphism, one of the tyrosine receptor kinase could enhance the proliferation and invasion of head and neck cancer through enhanced and extended phosphorylation of ERK and AKT in the downstream of RET. It was shown that the samples of head and neck cancers with neurotropism had high frequency of G691S RET polymorphism. The observation suggested G691S RET polymorphism could enhance growth, invasion, or metastasis of head and neck cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌, RET, polymorphism

1. 研究開始当初の背景

近年の Gene chip (SNPs chip)技術の飛躍的進歩に伴い、ヒト genomic DNA の single nucleotide polymorphisms (SNPs)が発癌などの様々な生物学的事象に影響を与えることが明らかになってきた。特に細胞膜に存在する各種レセプターの

SNPs は、下流の細胞内シグナル伝達系を過剰に亢進あるいは抑制することが報告されており、ヒトの発癌メカニズムとの関係が深く、近年注目されている分野である。我々は proto-oncogene として知られる RET レセプターの頭頸部癌における機能について着目した。RET のリガンド

は glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)であり、そのシグナルは MAPK や PI3K に及ぶが、我々は RET の遺伝子多型である G691S RET polymorphism がこれらのシグナル伝達系を亢進し、頭頸部癌の増殖と浸潤を増強する可能性を見いだした。この研究をさらに進め、頭頸部癌治療、抑制技術に貢献する目的で本研究を行った。

2. 研究の目的

G691S RET polymorphism の頭頸部癌増殖、浸潤における影響を分子生物学的に解析する。

- (1) Real time quantitative PCR および免疫染色を用い、頭頸部癌細胞株と頭頸部癌手術時採取標本における RET の発現を mRNA、蛋白レベルで確認する。
- (2) 頭頸部癌細胞において G691S RET polymorphism を内包する細胞株を PNA 併用 real time PCR、direct sequencing を用いて確認する。これにより G691S RET および RET wild type を確立する。
- (3) GDNF による癌細胞の増殖能、浸潤能の変化を G691S RET および RET wild type で比較検討する。増殖能解析には MTT assay および cell counting を用いる。浸潤能解析には matrigel coated invasion chamber を用いて検討する。
- (4) Alexa Fluor™ 568 phalloidin によるアクチン重合体の染色を行い、GDNF 投与後のフィロポディアやラメリポディア形成を蛍光顕微鏡で観察し、G691S RET および RET wild type で比較検討する。
- (5) GDNF による RET 下流のシグナ

ル伝達系である ERK1/2 および AKT のリン酸化をウェスタンブロットにより解析し、リン酸化の程度、持続時間を G691S RET および RET wild type で比較検討する。

- (6) 頭頸部癌手術時採取標本より DNA を採取し、G691S RET polymorphism を持つ症例を確認する。G691S RET ありとなしの群に分け、生存率や無病期間などの臨床データとの相関を統計学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) RET および GFR α 1,3 の発現解析

11 種類の頭頸部癌細胞株より RNA を採取し、real time quantitative PCR により、RET および RET と複合体を形成する GFR α 1,3 の mRNA 発現レベルを解析する。さらに頭頸部癌手術時採取標本を RET 特異抗体を用いて免疫染色を行い、RET が実際に発現していることを確認する。

(2) G691S RET polymorphism の解析、判定

RET の DNA 配列より、RET のプライマーと G691S RET polymorphism を認識する real time PCR 用プローブをデザインする。また wild type の amplification を抑制するため、wild type を認識する peptide nucleic acid (PNA) をデザインし、real time PCR に併用することで、G691S polymorphism が有る場合のみ PCR 産物が得られることとなる。この方法で、複数種の頭頸部癌細胞株および頭頸部癌手術時採取標本における G691S RET polymorphism の

有無を解析、判定する。Templateには頭頸部癌細胞株および頭頸部癌手術時採取標本から分離精製したgenomic DNAを用いる。またこのDNAをdirect sequencingすることでreal time PCRの結果を確認する。Direct sequencingにはBeckman CoulterのCEQ genetic analysis systemを用いる。これらの解析によって頭頸部癌細胞株のG691S RETとRET wild typeを確立し、さらにG691S RET polymorphismの機能解析を行う。

(3) glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)による癌細胞増殖能の解析

頭頸部癌細胞株を無血清培地で処理した後、リコンビナントGDNF(50ng/ml)を添加し、24および48時間37℃で培養した後の細胞数の変化を測定する。細胞数の測定にはMTT assay、および確認のためdirect cell countingを用いる。細胞増殖能をG691S RETとRET wild typeで比較することで、G691S polymorphismがGDNFに誘導される細胞増殖に及ぼす影響を解析する。またRETの下流であるMEK1の阻害剤(PD98059)とPI3Kの阻害剤(Wortmannin)によってG691S RET polymorphismの細胞増殖増強効果が抑制されるかを解析する。これによりこの増強効果が、RET-MEK(MAPK)系およびRET-PI3K系のシグナル伝達系を介する反応であることを確認する。

(4) GDNFによる癌細胞浸潤能の解

析

頭頸部癌細胞株を無血清培地で処理した後、リコンビナントGDNF(50ng/ml)を添加し、24および48時間37℃で培養した後の癌細胞浸潤能の変化を測定する。解析にはmatrigel coated invasion chamberを用いる。細胞浸潤能をG691S RETとRET wild typeで比較することで、G691S RET polymorphismがGDNFに誘導される細胞浸潤に及ぼす影響を解析する。またRETの細胞外ドメインを認識する特異抗体もしくはRETに対するsiRNAをあらかじめ反応させておき、GDNF投与後の浸潤能増強が抑制されるかを解析する。これによってこの反応が真にRETを介した反応であり、他のレセプターからのcross talkでは無いことが証明できる。

(5) GDNFによるERK1/2およびAKTのリン酸化の解析

頭頸部癌細胞株を無血清培地で処理した後、リコンビナントGDNF(50ng/ml)を添加し、0、5、15、30、45、60分後に細胞を回収し、タンパク質を抽出する。抗リン酸化ERK1/2抗体および抗リン酸化AKT抗体を用いてウェスタンブロットを行うことで、GDNFによるERK1/2とAKTのリン酸化の経時的変化を解析する。リン酸化の程度、持続時間をG691S RETとRET wild typeで比較検討することで、G691S RET polymorphismが下流のシグナル伝達系に及ぼす影響を確認できる。Loading controlには非リン酸化ERK1/2、AKTもしくはGAPDHを用いる。

(6) GDNF によるアクチン重合体形成の解析

頭頸部癌細胞株をガラスボトムディッシュにて培養し、無血清培地で処理した後に GDNF(50ng/ml)を添加する。48時間 37℃で培養した後に細胞を固定し、Alexa Fluor™ 568 phalloidin を用いてアクチン重合体を染色し、蛍光顕微鏡で観察する。特に細胞移動、浸潤に重要とされているフィロポディア、ラメリポディアの形成を G691S RET と RET wild type で比較検討する。これにより G691S RET polymorphism が GDNF による細胞浸潤を増強する効果を裏付けることができる。

4. 研究成果

(1) 複数種の頭頸部癌細胞株で RET と GFR α 1,3 の mRNA の発現を確認した。また手術時採取標本においても蛋白レベルで RET の発現を確認した。

(2) G691S RET を内包する頭頸部癌細胞株では GDNF 刺激後に細胞増殖能、浸潤能が RET wild type よりも亢進することが解った。G691S RET により誘導される高増殖、高浸潤能は抗 RET 特異抗体または RET RNAi によって抑制されることから、他のレセプターからのクロストークは介在しないことが解った。また ERK 阻害剤は PI3K 阻害剤よりも優位に G691S RET によって増強される細胞増殖を抑制した。このことから RET の下流シグナルは Ras-BRAF-MEK-ERK が PI3K-AKT よりも優位である可能性が示された。

(3) GDNF リガンド刺激後の RET 下

流にある ERK や AKT などのシグナル伝達因子のリン酸化をウェスタンブロットにより比較検討したところ、G691S RET を内包する細胞株では GDNF 刺激後に ERK および AKT のリン酸化が RET wild type よりも亢進、延長することが解った。

(4) GDNF リガンド刺激後のアクチン重合体形成を Alexa Fluor™ 568 phalloidin で染色で観察した結果、G691S RET を内包する頭頸部癌細胞株では GDNF 刺激後にアクチン重合体形成が RET wild type よりも亢進することが解った。これにより G691S RET が GDNF 刺激後の浸潤能を亢進する裏付けが得られた。

(5) また頭頸部癌において神経浸潤傾向を示す症例では G691S RET が高率に内包されていることが解った。これらの結果から G691S RET は頭頸部癌の増殖、浸潤を亢進させる機能を有した polymorphism であり、再発・予後に関係する可能性が示された。

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 12 件)

1. Yamada T, Jiang X, Kubo S, Sakashita M, Narita N, Yamamoto H, Sunaga H, Fujieda S. B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced B_{Ly}S expression and production in human tonsillar fibroblasts. Clin Immunol. 2011 141(3):365-71.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015147>

2. Tanaka R, Koyanagi K, Narita N, Kuo C, Hoon DS, Prognostic Molecular Biomarkers for Cutaneous Malignant Melanoma. Journal of Surgical Oncology 2011 104(4):438-46.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557225>

3. Saito T, Narita N, Yamada T, Ogi K, Kanno M, Manabe Y, Ito T. Length of nerve gap defects correlates with incidence of nerve regeneration

but not with recovery of taste function in patients with severed chorda tympani nerve. *Otol Neurotol* 2011 32 (8): 1352-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892118>

4. Saito T, Narita N, Yamada T, Manabe Y, Ito T. Morphology of human fungiform papillae after severing chorda tympani nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2011 120(5): 300-306.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21675585>

5. Saito T, Ito T, Narita N, Yamada T, Manabe Y. Light and electron microscopic observation of regenerated fungiform taste buds in patients with recovered taste function after severing chorda tympani nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2011 120(11):713-21.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224312>

6. Higashino M, Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Narita N, Kojima A, Hyo S, Kawata R, Takenaka H, Fujieda S. Interleukin-19 downregulates Interleukin-4-induced eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Allergology International*. 2011 60(4):449-57.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593579>

7. Yamamoto H, Yamada T, Takabayashi T, Sunaga H, Oh M, Narita N, Kojima A, Fujieda S. Platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase enhanced human IgE production. *Allergology International*. 2011 60:79-85.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252618>

8. Narita N, Fujieda S, Kimura Y, Ito Y, Imoto Y, Ogi K, Takahashi N, Tanaka T, Tsuzuki H, Yamada T, Matsumoto H. Suppression of histone deacetylase 3 (HDAC3) enhances apoptosis induced by paclitaxel in human maxillary cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 396:310-6.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20417177>

9. Arigami T, Narita N, Mizuno R, Nguyen L, Ye X, Chung A, Giuliano AE, Hoon DS. B7-h3 ligand expression by primary breast cancer and associated with regional nodal metastasis. *Ann Surg*. 2010 252:1044-51.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107115>

10. de Maat MF, Narita N, Benard A, Yoshimura T, Kuo C, Tollenaar RA, de Miranda NF, Turner RR, van de Velde CJ, Morreau H, Hoon DS.

Development of Sporadic Microsatellite Instability in Colorectal Tumors Involves Hypermethylation at Methylated-In-Tumor Loci in Adenoma. *Am J Pathol*. 2010 177:2347-56.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952593>

11. Yamada T, Lizhong S, Takahashi N, Kubo S, Narita N, Suzuki D, Takabayashi T, Kimura Y, Fujieda S. Poly(I:C) induces BLYS-expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. *Cytokine*. 2010 50:163-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089415>

12. Goto Y, Koyanagi K, Narita N, Kawakami Y, Takata M, Nguyen L, Nguyen T, Ye X, Morton DL, Hoon DS. Aberrant fatty acid-binding protein-7 gene expression in cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2010 130:221-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587692>

[学会発表] (計 8 件)

国際学会

1. Norihiko Narita, Yumi Ito, Dai Susuki, Yuichi Kimura, Shigeharu Fujieda

A novel molecular target to overcome cisplatin-resistance in human maxillary cancer.

11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology, Head and Neck Surgery 2011. 12. 8-9 Kobe

2. Narita N, Matsumoto H, Yamamoto H, Kimura Y, Fujieda S Analysis of molecular targets to overcome cisplatin-resistance in human maxillary cancer. 29th International Symposium of Infection and Allergy of the Nose (ISIAN) 2010 June 20-24 Juneva

国内学会

3. Norihiko Narita, Yumi Ito, Yuichi

Kimura, Dai Susuki, Chizuru Sugimoto, Shigeharu Fujieda Analysis of molecular targets in chemo-radiation therapy for human head and neck cancer. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2011 Oct. 3-5 Nagoya

4. 成田憲彦 伊藤有未 木村有一
鈴木 弟 杉本千鶴 藤枝重治
ヒト舌癌細胞株における放射線耐性に関与する標的分子の解析 第35回日本頭頸部癌学会 2011.6.8-10 名古屋
全国学会 一般演題 (ポスター) 選考あり
日本語

5. 成田憲彦¹ 伊藤有未¹ 能美 希² 扇和弘¹ 木村有一¹ 杉本千鶴¹ 藤枝重治¹
1. 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科
2. 大分大学耳鼻咽喉科
ヒト上顎癌細胞株におけるシスプラチン耐性に関与する新規分子の解析 第112回日本耳鼻咽喉科学会総会 2011.5.19-21 京都

6. 成田憲彦, 木村有一, 杉本千鶴, 藤枝重治 HDAC3抑制はヒト上顎癌細胞株においてパクリタキセルにより誘導されるアポトーシスを増強した 第69回日本癌学会学術総会 2010.9.22-24 大阪

7. 成田憲彦, 鈴木 弟, 木村有一, 杉本千鶴, 藤枝重治 ヒト上顎癌細胞株におけるシスプラチン耐性に関与する標的分子の解析 第34回日本頭頸部癌学会 2010.6.9-11 東京

8. 成田憲彦, 加藤幸宣, 高林哲司, 木村有一, 藤枝重治 魚骨異物が原因と考えられる食道壁内膿瘍の1症例 第20回日本頭頸部外科学会総会 2010.1.28-29 東京

[図書] (計0件)
[産業財産権]
○出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)
[その他]

6. 研究組織

研究代表者 成田憲彦
福井大学・医学部・助教
研究者番号 80345678

