

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3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791987

研究課題名（和文） 口腔癌におけるSTATシグナル関連蛋白の網羅的解析と新規治療法への応用

研究課題名（英文） The exhaustive analysis of proteins related with STAT signaling and the possibilities for new treatments of oral cancer patients

研究代表者

石川 詔子（ISHIKAWA AKIKO）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90444760

研究成果の概要（和文）：

口腔癌培養細胞が細胞同士で接着すると細胞表面の E-cadherin が結合し、STAT シグナルが活性化され、結果として癌細胞の細胞死を回避させる。今回の研究では、細胞間接着に続いて Rac1 および Cdc42 がリン酸化される傾向が示された。また、STAT3 の発現を抑制した研究の結果、STAT3 は癌細胞の細胞死を回避させて細胞活性を促すが、増殖、遊走、浸潤における影響は少ないと思われた。

研究成果の概要（英文）：

STAT signaling is activated by E-cadherin binding following cell-cell adhesions, which lead the avoidance of cancer cells death. This study showed that both Rac1 and Cdc42 were phosphorylated after cell-cell adhesions. As the result of STAT3 inhibition by using siRNA, STAT3 activation promotes cancer cell activity by avoiding cells death, but little affects cell growth, migration and invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：口腔癌、STAT、細胞間接着、E-カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

STAT シグナルは、口腔癌をはじめとして乳癌、前立腺癌、肺がんなど多くの固形癌で活性化されていることが知られている。またリン化された STAT 蛋白質は2量体となって

核内に移行し、核内で転写因子として働き、結果として細胞の抗アポトーシスや細胞周期異常に作用することが報告されている。しかし、シグナルが活性化されるメカニズムや活性化された STAT 蛋白質が核内へ移行するに至るシグナルなど、その詳細については未だ

明らかになっていない点が多い。

研究代表者による過去の実験結果から、口腔癌培養細胞の細胞間接着は STAT1 および STAT3 シグナルの活性化を誘導することが示されていた。その誘導には E-カドヘリンのホモフィリックな結合が不可欠であることが明らかになっていたが、E-カドヘリンからどのような伝達経路で STAT シグナルの活性化に至るのか、そのメカニズムについては不明であった。

今回の研究では、STAT シグナリングに新たな知見を加える。さらに、口腔癌の浸潤・転移への関与について解析を加える。

2. 研究の目的

STAT シグナルが活性化されるメカニズムや、活性化された STAT 蛋白が核内移行するに至るシグナルなどの詳細なメカニズムを解明する。また、解明されたメカニズムを基に、このシグナル伝達を有効に阻害する手法を検索し、新たな治療法の開発に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞間接着から誘導される STAT シグナル活性化の解析

口腔癌細胞をポリハイドロキシエチルメタクリレートでコートしたプレート上で培養して細胞-細胞間接着に依存した細胞塊を経時的にサンプルリングする。これらの細胞から蛋白質を抽出してウェスタンブロッティングにて解析する。ウェスタンブロッティングにおいては、STAT family である STAT1, 3 のリン酸化蛋白質と非リン酸化蛋白質の両者を検索する。また、細胞塊をカバーガラス上でホルマリン固定し、蛍光免疫染色法にて蛋白の局在を検索する。

(2) 細胞外マトリックスから誘導される STAT シグナル活性化の解析

培養ディッシュ上で培養した細胞、およびディッシュ上で培養した細胞にマトリゲルを作用させて細胞-細胞外マトリックスを介したシグナルに依存した細胞をサンプルとする。これら両者から蛋白質を抽出してウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングに使用する抗体は上記 1) で使用したものと同様とする。

(3) 細胞間接着から STAT 蛋白質の活性化に至るまでの関連シグナルの解析

ポリハイドロキシエチルメタクリレートでコートしたプレート上で培養して経時的にサンプルリングした蛋白質を用いて、Rac1 および Cdc42 のリン酸化蛋白質および非リン酸化蛋白質の両者をウェスタンブロッティングにて解析する。

(4) STAT3 発現阻害による機能解析

培養細胞に STAT3 siRNA を導入して発現を抑制する。ウェスタンブロッティングもしくは RT-PCR 法にて効率よく発現抑制されている細胞を用いて、増殖能、遊走能、浸潤能について解析を行った。

① 増殖能の解析

STAT3 siRNA とコントロール siRNA を導入した培養細胞に対して、導入後 3 日後、4 日後、5 日後にシャーレ上の細胞数をカウントすることで評価する。

② 遊走能・浸潤能の解析

セル・カルチャー・インサートを用いてフィルター下面に存在する細胞をトリパンブルー染色してカウントすることで評価する。浸潤能の解析のためには、マトリゲルコートが必要である。

4. 研究成果

(1) 細胞間接着から誘導される STAT 蛋白質のリン酸化と関連シグナルの解析

過去の実験結果に一致して、ポリハイドロキシエチルメタクリレートでコートしたプレート上で培養した培養細胞のうち、培養開始から約6-12時間で蛋白抽出したサンプルにおいて、リン酸化 STAT1, 3 の発現が高度に認められた。これらの蛋白を用いて他から報告のある Rho ファミリー (Rac1, Cdc42) のリン酸化蛋白質についてもウェスタンブロッティングで解析を行った。その結果、細胞種によってばらつきはあるものの、STAT のリン酸化とほぼ同時期において Rac1, Cdc42 ともにリン酸化される傾向があることが明らかになった。蛍光免疫染色法では、リン酸化した STAT 蛋白質が核内に移行していることが確認できた。

つまり、過去のデータと総合すると、口腔

癌細胞が E-cadherin のホモフィリックな結合によって細胞間接着を獲得すると、Rhoファミリーである Rac1 や Cdc42 のリン酸化が誘導され、それによって STAT シグナルの活性化が導かれるという可能性が示唆された。

(2) 細胞外マトリックスから誘導される STAT シグナル活性化の解析

培養ディッシュ上で培養した細胞、およびディッシュ上で培養した細胞にマトリゲルを作用させて細胞—細胞外マトリックスを介したシグナルに依存した細胞における STAT シグナルの活性化を解析した。その結果、STAT1, 3 のリン酸化蛋白質はわずかに発現が高くなっているサンプルもあるが、明確な結果を得ることができなかった。原因としては、STAT シグナルを活性化する因子は EGF や IL-6 をはじめとして数多く知られており、これらが複雑に関連しているため特定の経路を明確にするのが困難であると考えられる。

(3) STAT3 発現阻害による機能解析

① 増殖能の解析

STAT3 siRNA とコントロール siRNA を導入した培養細胞に対して、導入後 3 日後、4 日後、5 日後にシャーレ上の細胞数をカウントした。コントロール siRNA 導入細胞に比べて STAT siRNA 導入細胞の方がわずかに細胞活性が低下しているように観察されたが、細胞数のカウントにおいては有意な差は認められなかった。

② 遊走能・浸潤能の解析

セル・カルチャー・インサートを用いてフィルター下面に存在する細胞をトリパンブルー染色してカウントを行った。浸潤能の解析においては実験に先立ってインサート部にマトリゲルコートを行った。STAT3 siRNA とコントロール siRNA を導入した培養細胞をフィルター上部に撒き、6 時間後、12 時間後、24 時間後に対して細胞数を計測した。その結果、STAT3 siRNA とコントロール siRNA を導入した培養細胞間で、遊走能、浸潤能ともに有意な差は認められなかった。

今回の結果をまとめると、口腔癌培養細胞においては、E-cadherin を介した細胞間接着

によって Rho ファミリー蛋白質がリン酸化され、これらを介して STAT シグナルが活性化されている可能性が示唆された。これを明らかにするためには、Rac1, Cdc42 の発現を抑制した実験データの追加が必要であると考えている。一方で、細胞—細胞外マトリックスと STAT シグナルの関連についての解析では、実験方法の工夫などを含めて今後の検討課題である。STAT シグナルが活性化されることによって癌細胞は細胞死を回避するという事は過去の実験で示してきた。今回の結果から増殖、遊走、浸潤における関与は有意ではなかったが、STAT シグナルは癌の進展において重要であることは確実である。今後新たな知見を加えていくことで口腔癌治療に応用できるものと考えている。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Murase R., Sumida T., Ishikawa A., Murase R., McAllister SD., Hamakawa H., Desprez PY. Novel therapeutic strategies for malignant salivary gland tumors: lessons learned from breast cancer. Int J. Otolaryngol. 2011; 2011: 187623 Epub 2011 Nov 21、査読有り

[学会発表] (計 1 件)

1. 八塚恵輔、石川詔子、中城公一、浜川裕之
ヒト口腔扁平上皮癌細胞における dystroglycan の発現と機能 第 59 回日本口腔科学会 中国・四国地方部会 H23. 11. 26 愛媛

[図書] (計 1 件)

1. T. Sumida, A. Ishikawa. Hormone therapy for the treatment of patients with malignant salivary gland tumors. Sex Steroids INTECH 2011 p315-330

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 詔子 (ISHIKAWA AKIKO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90444760