

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25年5月30日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791991

研究課題名（和文） 唾液腺癌における抗癌薬耐性機構の解明と転写因子を利用した克服法の開発

研究課題名（英文） Investigation of the anticancer agent-resistant mechanism and development of the therapeutic method using a transcription factor : YB-1 in the salivary gland cancer.

研究代表者 小野田 慈美 (ONODA MEGUMI)

九州大学・大学病院・特別研究員

研究者番号：90464403

研究成果の概要（和文）：

本研究代表者はこれまで、抗癌剤耐性に関与する転写因子として知られる YB-1 の機能について検討してきた。本研究では、唾液腺癌、特に腺様嚢胞癌が他の口腔癌と比較して抗癌剤抵抗性を示す点に着目し、唾液腺癌の抗癌剤耐性機序における YB-1 の機能解析を目的としている。間接蛍光抗体染色法、ウェスタンブロット法で腺様嚢胞癌細胞内の YB-1 の局在・発現を検討し、更に Two-Hybrid Screening にて YB-1 と唾液癌細胞内で相互作用する蛋白を同定し、その蛋白と YB-1 との相互作用について検討した。

研究成果の概要（英文）：

YB-1 is known as a transcription factor, which participates in anticancer drug resistance. In this study, I focus to adenoid cystic carcinoma (ACC), because it frequently has anticancer drug resistance. To investigate the function of YB-1 at molecular basis in the anticancer-drug-resistance salivary gland cancer cell, we isolated the associated protein with YB-1 by using the yeast two-hybrid system. Of these proteins, I focused on B23 to understand how YB-1 has involved in stress-response through the interaction with B23.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012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：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：唾液腺腫瘍、薬剤耐性、YB-1

1. 研究開始当初の背景

唾液腺に発生する悪性腫瘍のうち最も発生頻度の高い腺様嚢胞癌（ACC）は、その増殖

が非常に早く、周囲組織にも容易に浸潤し、また早期に遠隔組織に転移しやすいため早期診断・治療が必用とされる。腺様嚢胞癌は既存の化学療法や放射線治療に対して感受性が

低いため他の治療法が望まれるが、現在のところ有用な治療法が開発されておらず、外科的切除が第一選択となっている。しかし、手術後の再発症例、転移症例に対しては化学療法を施行する以外に手段がない場合も多く、抗癌剤の効果がこれらの予後を大きく左右する。ところが、これら症例の殆どは化学療法に対して抵抗性あるいは耐性を示しており、化学療法の効果が期待できないことが多いのが現実である。このため、癌細胞の抗癌剤抵抗性の克服についての研究は早急に行われるべきものであると考えられ、近年、抗癌剤感受性を制御する分子標的の研究が活発に進められてきている。

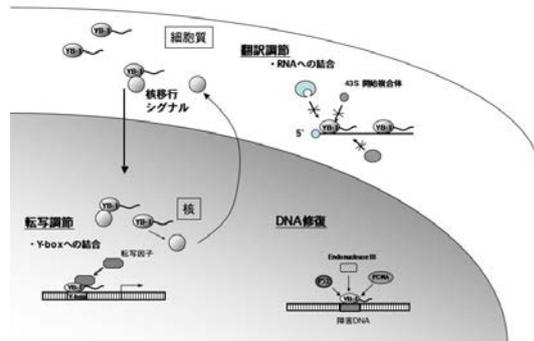
なかでも多剤耐性機構に強く関与するABCトランスポーターの一つ、P-糖蛋白は最も注目すべき因子ある。P-糖蛋白は血液—脳関門や腸管上皮などに広く生理的に発現し、異物排出に関与している一方、多くの癌患者癌細胞の細胞膜に高発現し、抗癌剤を細胞内から排出するポンプの役割をすることで化学療法を困難なものにしている。近年ではこのP-糖蛋白を癌患者の正常造血幹細胞に導入させることにより、正常骨髓細胞を抗癌剤耐性とし、副作用（骨髄抑制）を軽減するという遺伝子治療が臨床試用され始めている。

本研究者は大学院時代に共同研究者と共にこのP-糖蛋白の発現制御機構、特に発現亢進について解明を進めてきた結果、P-糖蛋白をコードするMDR1遺伝子のプロモーター領域にY-box配列が存在し、この部位に結合する転写因子YB-1（Y-box結合蛋白-1）が重要な役割を担うことを明らかにしてきた（Bioessays 2003年7月、25巻 p691-698）。

更にその後の培養細胞を用いた観察の結果、通常YB-1は細胞質に局在し翻訳制御をおこなっているが、細胞に紫外線やUV等のストレスが加わると核移行してMDR1遺伝子の転写を活性化し、P-糖蛋白の発現を増加させることが明らかになった（Nucleic Acids Research, 2004年1月,32(2)巻,p611-622.、Molecular and Cellular Biology, 2002年9月,22(18)巻,p.6375-6383）。他にも乳癌や卵巣癌など臨床の腫瘍検体を用いた検索でもYB-1の核移行とP-糖蛋白の発現や患者の予後とは強い相関があることが報告されている。

このため、抗癌剤耐性に強く関与すると考えられるYB-1の機能解析、発現制御および核移行抑制は薬剤抵抗性制御を含む新しい唾液腺癌治療に発展する可能性が非常に

図1.ヒト細胞の細胞質と核におけるYB-1の多様な制御—翻訳、転写とDNA修復—



高いと考えられ、本研究を始めるに至った。

2. 研究の目的

唾液腺癌は種々の抗癌剤に対して抵抗性（耐性）を示すことが多く、抗癌剤耐性細胞で高発現しているP-糖蛋白が、その耐性に深く関与することが知られている。本研究者は今まで、転写因子YB-1がP-糖蛋白の発現を調節していることなどを明らかにしてきた。本研究では唾液腺癌の抗癌剤耐性機能を解明し、YB-1など機能を調節することによって耐性を克服し、新規治療法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

1) YB-1局在の検討：

① 手術組織を材料とした免疫組織学的染色、In situ hybridizationにより唾液腺癌組織および唾液腺癌培養細胞におけるYB-1の発現および局在を検討した。更に局在部位と予後との相関についても検討した。

② 蛍光抗体染色法にて腺様嚢胞癌細胞株（ACCS、ACCT）におけるYB-1の局在を検討し、更にCDDPや5-Fuの等の抗癌剤存在下での培養し、抵抗性を示す細胞でのYB-1の局在を検討した。

2) YB-1相互作用蛋白の同定：

① ACC細胞を用いてcDNA libraryを作成し、酵母細胞を用いたTwo-hybrid screeningにてYB-1と相互作用する蛋白を検索した。

② DNA マイクロアレイハイブリダイゼーションにて抗癌剤刺激をおこなった ACC 細胞での遺伝子の発現変化を検討し、①で得られた蛋白遺伝子のうち複数個について、刺激後に発現が増加していることを確認した。

3) YB-1 との相互作用の確認 :

2) で得られた蛋白のうち、核-細胞質間をシャトルする活性を持つ蛋白 : NPM に着目し、YB-1 との相互作用について検討した。

① GST-pull down assay にて *In vitro* での YB-1 と NPM の相互作用を確認した。更に YB-1 の deletion mutant を作製し、NPM との相互作用に関与する部位を特定した。

② ACC 細胞を用いた免疫沈降法を行い、YB-1 と NPM との相互作用を確認した。

4) NPM の細胞内での局在の検討 :

抗癌剤存在下で ACC 細胞を培養し、耐性を示す細胞内での NPM の局在を蛍光抗体法で確認した。さらに、NPM の発現量についてもウェスタンブロット法で確認し通常の ACC 細胞と比較した。

5) siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法 :

NPM のノックダウンを行う目的で siRNA を作製し、腺様嚢胞癌細胞株に導入した。NPM の発現を抑制した ACC 細胞内での YB-1 の発現量、局在をウェスタンブロット法・蛍光抗体法にて検討した。

4. 研究成果

1) ACC 細胞で YB-1 は細胞質に局在し、抗癌剤耐性細胞株では核に局在していた :

腺様嚢胞癌細胞株 (ACCS、ACCT) における YB-1 の局在を蛍光抗体染色法にて検討したところ、YB-1 は通常細胞質に局在していた。さらに、これらの細胞を CDDP や 5-Fu 等の抗癌剤を存在下で培養したところ、これらの抗癌剤に抵抗性を示した細胞では YB-1 が核に局在することが蛍光抗体染色法にて確認され、ウェスタンブロット法にて YB-1 の蛋白レベルも上昇していることが確認された。

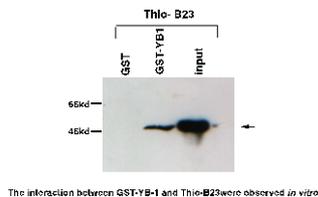
2) YB-1 相互作用蛋白として NPM を同定した :

YB-1 と相互作用する蛋白を同定する目的で ACCS 細胞を用いて cDNA ライブラリーを作成した。その cDNA を pPC86 発現ベクターに組

み込み、pDBLeu 発現ベクターに組み込んだ YB-1 とともに酵母細胞に遺伝子導入して Two-Hybrid スクリーニングを行ない YB-1 相互作用蛋白を検索したところ、転写因子を含む 17 個の細胞内蛋白が得られた。さらに DNA マイクロアレイハイブリダイゼーションにて抗癌剤刺激をおこなった ACC 細胞での遺伝子の発現変化を検討したところ、上記 Two-Hybrid スクリーニングにて得られた蛋白遺伝子が複数個発現上昇していることが確認された。

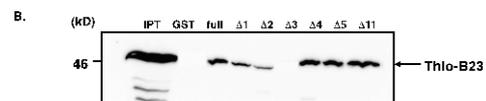
これらの蛋白の中でも DNA 障害性ストレスに関係し、核-細胞質間をシャトルする活性を持つ蛋白である NPM に着目し、GST-pull down assay にて YB-1 との *in vitro* での結合を確認した。また、ACCS 細胞を用いた免疫沈降法でもこれらの蛋白と YB-1 の結合が確認

できた。さらに、YB-1 deletion mutant を作成し YB-1 の N 末と NPM が相互作用していることを明らかにした (下 figure)。



The interaction between GST-YB-1 and Thio-B23 were observed *in vitro*.

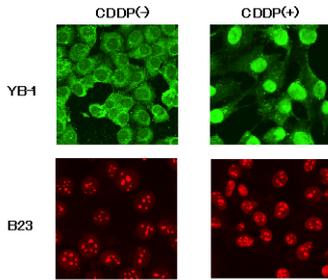
A. Schematic illustration of the full-length and deleted GST-YB-1 proteins used in this study.



B23 needs N-terminal domain and CSD but not C-terminal to interact with YB-1

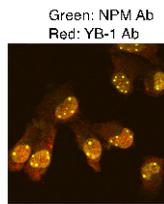
3) NPM は ACC 細胞内で核小体に局在し、抗癌剤刺激下では核質に局在する :

抗癌剤存在下で腺様嚢胞癌細胞を培養し、耐性を示す細胞内のみを抽出した。それらの細胞内での NPM の発現および局在をウェスタンブロット法、蛍光抗体法で確認したところ、NPM は通常の ACC 細胞内では主に核小体に局在するが、抗癌剤抵抗性を示す細胞内では核質全体に局在することが判明した。



B23 shifted its location from the nucleolus to the nucleoplasm after anticancer drug stimulation, and YB-1 shifted from cytoplasm to nucleoplasm.

以上の結果から、YB-1 と NPM は抗癌剤の刺激



NPM and YB-1 may co-localize after anticancer drug stimulation

下に co-localize すると考えられた。

4) siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法：
NPM のノックダウンを行う目的で siRNA を作製し、腺様嚢胞癌細胞株に導入した。NPM の発現を抑制した ACC 細胞内での YB-1 の発現量、局在をウェスタンブロット法・蛍光抗体法にて検討したところ、NPM 抑制下での YB-1 発現量に変化は認められなかった。また、NPM 抑制下での YB-1 の局在や抗癌剤耐性の変化については現在検討中である。

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)

・小野田 慈美、関 勝宏、碓 竜也、熊丸 涉、杉浦 剛、白砂 兼光。

頬粘膜に発生した clear cell carcinoma, NOS の一例。

日本口腔外科学会誌 Vol.58 : 288-291, 2012. 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[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]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野田 慈美 (ONODA MEGUMI)
九州大学・大学病院・特別研究員
研究者番号：90464403

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：