

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792309

 研究課題名（和文）新規遺伝子ネットワークを利用した細胞周期制御と免疫機構賦活化による
癌治療法の開発

 研究課題名（英文）Development for the cancer therapy to regulate cell cycle and
stimulating immune system by novel gene networks

研究代表者

榑 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）：

本研究においては、口腔癌由来細胞株を用いて RIG-I 遺伝子のシグナル伝達のネットワークを明らかにする。さらに免疫機構の賦活化と細胞周期を制御し、新たながん治療法の開発を行うことを目的とした。RIG-I に加えて DAI (DLM-1/ZBP1) および MDA-5 についても種々の分子生物学的手法で検討を行った。その結果、RIG-I はアポトーシスの過程で caspase の活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

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 regulating the cell cycle in oral cancer cells and stimulating immune system. In addition to RIG-I, DAI (DLM-1/ZBP1) and MDA-5 were analyzed with molecular biological method. Our data indicate RIG-I may have important roles in activation of caspase in apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 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 (Oral Microbiol Immunol. 2006 Dec;21(6):399-406, Oral Microbiol Immunol.

2005 Feb;20(1):47-50)。

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、RIG-I 遺伝子が口腔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。

さらに平成 21・22 年度科学研究費補助金(若手 B: 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)の交付を受け、RIG-I 遺伝子は口腔癌細胞の細胞周期を停止する方向に作用し、細胞増殖抑制に効果があることを明らかにし、新たな癌抑制遺

遺伝子の発見に至った趣旨を報告した(第55回日本口腔外科学会総会)。

以上の研究過程でRIG-Iは口腔内の免疫機構の賦活化を促している可能性が高く、さらに口腔癌細胞に対して細胞周期停止による細胞増殖抑制および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。そこで申請者はこれまでの研究を総括すべくRIG-I遺伝子を用いて、口腔内の免疫機構を賦活化させ、さらに癌細胞の細胞周期を制御することによる、免疫療法と化学療法の両者の特色を生かした遺伝子治療としての新たな癌治療法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。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のネットワークを明らかにする。さらに遺伝子レベルで免疫機構の賦活化を達成した上に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で癌細胞の死滅を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞培養とRIG-I遺伝子導入：

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)を継代培養する。RIG-I遺伝子を細胞内に導入し、RNAまたは蛋白を回収する。この際、随時、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する。

(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、プロテインアレイの結果より発現変化が認められる蛋白を包括的に検討する。

(3)統計解析によるシグナル伝達カスケードの解明：

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。GenMAPPパスウェイに細胞周期関連遺伝子群および免疫応答関連遺伝子群の発現挙動をマッピングし描画する。細胞内および細胞間には複雑な遺伝子ネットワークが存在し、各々のcross-talkによって癌細胞は恒常性を保っていることから、RIG-I単独の遺伝子導入だけでは、効率的に

癌細胞のアポトーシスを達成することは困難と予想される。

そこで、上記で解析した遺伝子群のマッピング図をもとに細胞増殖効果を示す遺伝子ネットワークの上流カスケードをpinpoint攻撃することで効率的にRIG-Iの細胞周期制御による抗腫瘍効果が得られると予想される。上流カスケードを阻害する方法としてはRNA interferenceの手法を用いる。

(4)RIG-Iおよび関連蛋白刺激による細胞周期の変動を検討：

細胞周期の変動についてフローサイトメーターを用いて検討する。

(5)RIG-I関連遺伝子の検討：

①RIG-Iでの検討に加え、細胞質DNAウイルスセンサーとして近年注目されているDAI(DLM-1/ZBP1)について上記(1)と同様の検討を行う。

②RIG-Iと関連の深く、細胞内ウイルスセンサーの一つであるMelanoma Differentiation-Associated Gene5(MDA-5)について上記(1)と同様の検討を行う。

(6)既存の抗癌剤との比較による、RIG-Iの新規遺伝子治療としての可能性を検討

RIG-Iの細胞周期抑制効果と併せて、頭頸部悪性腫瘍において細胞周期抑制効果が明らかにされている既存の抗癌剤(タキソテル、5-FU、TS-1など)と比較検討する。上記で検討した遺伝子ネットワークについてRIG-Iを用いて口腔癌由来細胞株を刺激し、特にアポトーシスについて比較検討する。

4. 研究成果

口腔癌細胞株であるCa9-22に対して過去に施行したcDNAマイクロアレイおよびプロテインアレイの結果を再検討しG1/S期におけるパスウェイ図を描記したところ、RIG-I遺伝子導入によってCDK2の遺伝子発現および蛋白産生は減少していることが示唆された。(図1)

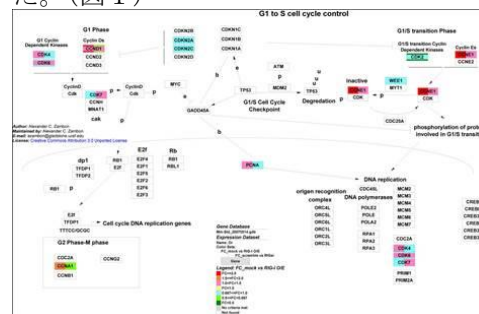


図1：細胞周期のパスウェイ

そこで、RT-PCRおよびウエスタンブロッテ

イング法によって同遺伝子の細胞周期における役割を検討したところ、RIG-I を遺伝子導入することで CDK2 の遺伝子発現および蛋白産生量を減少させ、細胞増殖抑制傾向があることを確認した。(図 2)

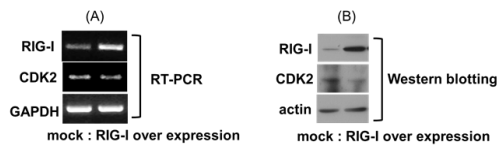


図 2 : (A) RIG-I および CDK2 の mRNA 発現、(B) RIG-I および CDK2 の蛋白産生

RNA ウイルスセンサーである RIG-I での検討に加え、細胞質 DNA ウイルスセンサーとして近年注目されている DAI (DLM-1/ZBP1) についての検討も併せて行った。口腔癌由来細胞株を用いて IFN- α 2b、IFN- γ で刺激および siRNA (DAI) transfection を行い、RT-PCR および Western Blotting での検討を行ったところ、DAI 遺伝子の発現に変動は見られるものの (図 3)、DAI の蛋白産生について明らかな変動は見られなかった。

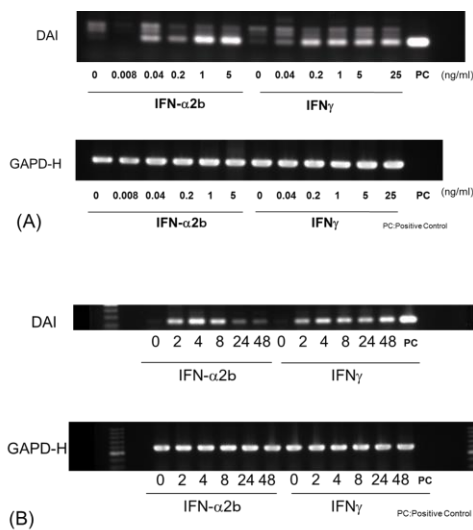


図 3 : IFN- α 2b および IFN γ 刺激による DAI mRNA 発現 (A) 濃度による検討、(B) 継時変化の検討

つぎに、RIG-I と関連の深く、細胞内ウイルスセンサーの一つである Melanoma Differentiation-Associated Gene5 (MDA-5) についても検討を行った結果、口腔癌由来細胞株において IFN- α 2b および IFN- γ 刺激によって濃度依存性、時間依存性に MDA-5 の遺伝子発現および蛋白産生に寄与していることが明らかとなった。(図 4)

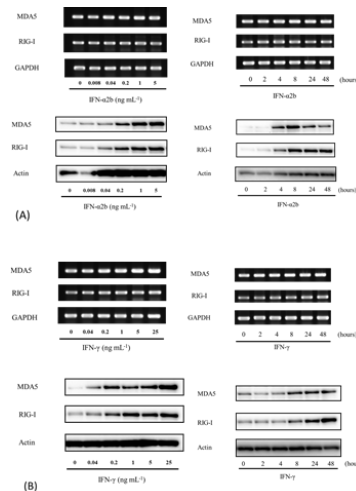


図 4 : (A) IFN- α 2b 刺激における検討、(B) IFN- γ 刺激における検討

既存の抗がん剤と RIG-I 遺伝子導入での比較検討では、細胞へのウイルス感染や癌化への生体防御機構の一つとしてアポトーシスを引き起こすカスパーゼカスケードに着目して検討を行った。アポトーシス実行型の caspase-3 について蛍光染色を行ったところ、タキソテールで活性化した caspase-3 は、RIG-I の siRNA で著明に抑制することから、RIG-I はタキソテールで引き起こされるアポトーシスの過程で caspase の活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。(図 5)

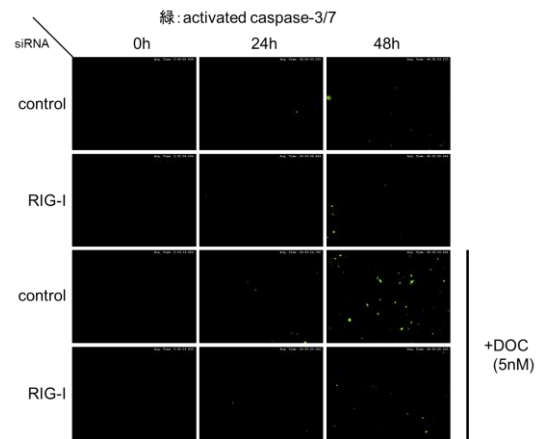


図 5 : caspase-3/7 に対する蛍光染色

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. 小林 恒、榎 宏剛、掛端 伸也、川口 英夫、鄭 明源、高井 良尋、木村 博人、機能温存を目指した口腔癌治療 進行口腔癌に対する超選択的動注化学放射線治療について、

頭頸部癌、38 卷 3 号、300-303、2012、査読有

2. 小林 恒、佐藤 寿、榊 宏剛、中川 祥、久保田 耕世、成田 憲司、今 敬生、成田 紀彦、鄭 明源、木村 博人、口腔癌頸部リンパ節転移に対するドセタキセルとネダブラチンによる超選択的動注を用いた化学放射線療法の有効性、日本口腔科学会雑誌、61 卷 1 号、8-15、2012、査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 榊 宏剛、他：RIG-I は口腔癌由来細胞株において細胞周期の制御に関与する、第 56 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2011 年 10 月 21 日、大阪国際会議場(大阪)

2. 久保田 耕世、榊 宏剛、中川 祥、成田 紀彦、小林 恒、木村 博人：Weekly Docetaxel 静注併用放射線療法を施行した高齢者頭頸部癌 5 症例の検討、第 56 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2011 年 10 月 21 日、大阪国際会議場(大阪)

3. 小林 恒、佐藤 寿、榊 宏剛、久保田 耕世、今 敬生、中川 祥、成田 紀彦、木村 博人、鄭 明源：進行口腔癌に対する動注化学放射線治療後の放射線性顎骨壊死に関する臨床的検討、第 56 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2011 年 10 月 21 日、大阪国際会議場(大阪)

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：