

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592588

研究課題名(和文) TRUE gene silencing 法による頭頸部癌増殖抑制の試み

研究課題名(英文) Growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cells by sgRNA based on TRUE gene silencing.

研究代表者

折館 伸彦 (Oridate, Nobuhiko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90312355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌は世界では年間50万人以上が罹患する。頭頸部癌の治療は手術、放射線治療、化学治療を複合的に組み合わせているが、予後に関しては、この20年で著しい改善は認められていない。その原因のひとつとして頭頸部癌の化学治療抵抗性が挙げられる。本研究の成果は治療成績向上が頭打ちの頭頸部癌治療において新治療法の開発へとつながる可能性を示している。化学療法併用放射線治療が頭頸部癌治療の重要なモダリティとして確立した今日にあって、その治療効果を高める補助療法の整備は医療者サイドからも患者サイドからも強く望まれるものであり、低侵襲・低コスト・高効率の補助療法を供する可能性をも示している。

研究成果の概要(英文)：Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exhibits increased expression of cyclin D1. Previous studies have shown a correlation between poor prognosis of HNSCC and cyclin D1 overexpression. tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing (TRUE gene silencing) is one of the RNA-mediated gene expression control technologies that have therapeutic potential. This technology is based on a unique enzymatic property of mammalian tRNase ZL, which is that it can cleave any target RNA at any desired site by recognizing a pre-tRNA-like complex formed between the target RNA and an artificial small guide RNA (sgRNA). In this study, we designed several sgRNAs targeting human cyclin D1 mRNA to examine growth inhibition of HNSCC cells. Transfection of certain sgRNAs decreased levels of cyclin D1 mRNA and protein in HSC-2 and HSC-3 cells, and also inhibited their proliferation. The combination of these sgRNAs and cisplatin showed more than additive inhibition of cancer cell growth.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 TRUE gene silencing 頭頸部癌治療 small guide RNA heptamer型 sgRNA 低侵襲

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は世界で年間 55 万人以上が罹患している疾患である。現在、頭頸部癌の治療としては手術、放射線治療、化学治療の 3 つがあり、これらを複合的に組み合わせて行われている。近年、個々の治療法の進歩は認められるものの、予後に関しては、この 20 年で著しい改善は認められていないのが現状であり、より効果的な薬剤の開発が望まれている。

これまでの研究から、一部の頭頸部扁平上皮癌細胞では、細胞周期の進行制御に関与するタンパク質である cyclin D1 が過剰発現し、これが予後不良因子であることが報告されている。このため、cyclin D1 の発現を抑制させることにより予後が改善され得る可能性も考えられ、cyclin D1 を標的とした分子標的薬や RNA 干渉等の研究が行われてきた。しかしながら、効果的な薬剤の開発が困難なため、これまで臨床への応用が進んでいない。そこで RNA 干渉法等に比較してより容易で低コストの新しい遺伝子発現抑制法に着目した。tRNase ZL (tRNA 3' processing endoribonuclease) は tRNA 前駆体や小さな tRNA 前駆体に類似した RNA 複合体を認識し切断することができる酵素である。すべての真核細胞に存在するこの酵素の性質を利用して、7~30 塩基の small guide RNA (sgRNA) を用いて RNA を任意の部位で特異的に切断する方法が開発されてきた。これを用いた遺伝子発現抑制法を tRNase ZL-utilizing-efficient gene silencing (TRUE gene silencing) 法と呼ぶ。

2. 研究の目的

この TRUE gene silencing 法を用い cyclin D1 を標的とした sgRNA を設計・合成し、頭頸部扁平上皮癌細胞培養系においてこれらの導入による cyclin D1 発現抑制および増殖抑制作用を調べると共に、抗癌剤との併用による効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Human cyclin D1 mRNA の二次構造を解析し、tRNaseZL に認識されうる部位を 6 ヶ所選び、5' -half-tRNA (HT) 型, heptamer (H) 型および linear (L) 型の sgRNA (sgHT1-6, sgH1-6 および sgL1-6) を設計し、これらの 2' -0-methyl 化した RNA を化学合成した。ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株である HSC-2 もしくは HSC-3 細胞を培養用プレートに播種し、lipofectamine2000 添加もしくは無添加で種々の sgRNA を導入した。対照としては cyclin D1 siRNA を用いた。さらに細胞を培養後、全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により cyclin D1 mRNA 量、ウエスタンブロット法により cyclin D1, RB および pRB のタンパク量を測定した。また、sgRNA に加えてシスプラチンの添加を行い、その効果について調べた。細胞周期を fluorescent

ubiquitination-based cell cycle indicator (FUCCI) を用いたリアルタイム観察法、生細胞数については WST-8 を用いた方法、DNA 合成量を bromodeoxyuridin (BrdU) ELISA 法、カスパーゼ 3/7 活性は Caspase-Glo 3/7 Assay System および Caspase-3/7 green detection reagent を蛍光による方法を用いて測定した。さらに、sgRNA の細胞内への取込みを Alexa568 標識した sgRNA を用い蛍光顕微鏡による観察を行った。また、核およびミトコンドリアの染色も行い細胞内での局在を観察した。

4. 研究成果

HSC-2 および HSC-3 細胞における cyclin D1 mRNA 量は、設計した各種 sgRNA の導入によって 20-70% のレベルに低下した。設計した sgRNA の標的部位によって抑制効果には差があり、HT 型では sgHT-2 および sgHT-5 による抑制効果が大きかった。これらの 2' -0-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬を用いないで培地に加えただけで、細胞内に取り込まれ核周辺の細胞質に局在し、加えた sgRNA の量に応じて cyclin D1 mRNA レベルが低下した。cyclin D1 のタンパクレベルについても同様に減少が認められた。Cyclin D1 の標的である RB のリン酸化も抑制された。これらの sgRNA の導入によって、HSC-3 細胞の細胞周期が G1/G0 期の割合が増加し、細胞の DNA 合成量が減少した。カスパーゼ 3/7 活性についても増加した。sgRNA のタイプ (HT 型, H 型および L 型) による違いは cyclin D1 発現抑制活性には大きな差異は認められなかった。また、HSC-3 細胞に抗癌剤であるシスプラチンを加え培養すると生細胞数が減少したが、sgHT-2 もしくは sgHT-5 を加えたところシスプラチン単独時に比べ、さらに減少した。

【考察】

適切に設計された 2' -0-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬等なしで HSC-2 や HSC-3 細胞に取り込まれ、おそらく細胞内で cyclin D1 mRNA と複合体を形成し tRNaseZL によって切断されたと考えられた。これにより頭頸部扁平上皮癌細胞において cyclin D1 のタンパク量が減少し、その標的である RB のリン酸化を低下させ、細胞周期を G1/G0 期にとどまらせることによって細胞増殖を抑えたと考えられた。カスパーゼ 3/7 活性の増加からアポトーシスの誘導も考えられた。sgRNA の効果は、設計部位により異なることから、適切な部位の選択が重要であると考えられた。2' -0-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬を使用せずに細胞内への導入が可能であり、今後の臨床への応用にとって有利な点と考えられた。また、cyclin D1 の発現抑制に効果的な sgRNA はシスプラチンと併用することによって、癌細胞数をさらに減少させたことから、これらの sgRNA が抗

癌剤の感受性を増大させた可能性が考えられ、癌細胞増殖に対する協同的阻害作用を示唆しており、今後より詳細な検討が必要と考えられた。

【結論】

本研究は、新たな遺伝子発現抑制法である TRUE gene silencing 法によって cyclin D1 mRNA を標的とした sgRNA を用い、頭頸部扁平上皮癌細胞の cyclin D1 の発現抑制を介して癌細胞の増殖を抑制できることを培養細胞で明らかにしたものであり、本法による頭頸部癌の有用な治療手段としての応用への可能性が示された。

【参考文献】

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, et al. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58:71-96.
3. Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9: 153-166.
4. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL (2011) Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 558-572.
5. Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarguen H, Lee JS, et al. (1998) Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 17: 2313-2322.
6. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS (2010) A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 10: 59-64.
7. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, et al. (1999) Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 5: 2810-2819.
8. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, et al. (2000) Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 36: 194-198.
9. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, et al. (2004) Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 10: 5168-5177.
10. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J (2005) Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 86: 347-363.
11. Jares P, Colomer D, Campo E (2007) Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 750-762.
12. Volavsek M, Bracko M, Gale N (2003) Distribution and prognostic significance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol* 117: 286-293.
13. Higuchi E, Oridate N, Homma A, Suzuki F, Atago Y, et al. (2007) Prognostic significance of cyclin D1 and p16 in patients with intermediate-risk head and neck squamous cell carcinoma treated with docetaxel and concurrent radiotherapy. *Head Neck* 29: 940-947.
14. Scott EN, Thomas AL, Molife LR, Ahmed S, Blagden S, et al. (2009) A phase I dose escalation study of the pharmacokinetics and tolerability of ZK 304709, an oral multi-targeted growth inhibitor (MTGI), in patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 64: 425-429.
15. Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6: 729-734.
16. Nashimoto M (1998) RNA heptamers that direct RNA cleavage by mammalian tRNA 39 processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26: 2565-2571.
17. Nashimoto M (2000) Anomalous RNA substrates for mammalian tRNA 39 processing endoribonuclease. *FEBS Lett* 472: 179-186.
18. Tamura M, Nashimoto C, Miyake N, Daikuhara Y, Ochi K, et al. (2003) Intracellular mRNA cleavage by 39 tRNase under the direction of 29-O-methyl RNA heptamers. *Nucleic Acids Res* 31: 4354-4360.
19. Takaku H, Minagawa A, Takagi M, Nashimoto M (2004) A novel 4-base-recognizing RNA cutter that can remove the single 39 terminal nucleotides from RNA molecules. *Nucleic Acids Res* 32: e91.
20. Shibata HS, Takaku H, Takagi M, Nashimoto M (2005) The T loop structure is dispensable for substrate recognition by tRNase ZL. *J Biol Chem* 280: 22326-22334.
21. Elbarbary R, Takaku H, Tamura M, Nashimoto M (2009) Inhibition of vascular endothelial growth factor expression by TRUE gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 924-927.
22. Nakashima A, Takaku H, Shibata H, Negishi Y, Takagi M, et al. (2007) Gene silencing by the tRNA maturase tRNase Z(L)

under the direction of small-guide RNA.
Gene Ther 14: 78-85.

23. Sano T, Takahashi M, Nozaki T, Takahashi Y, Tamura M, et al. (2011) Expanding the utility of heptamer-type sgRNA for TRUE gene silencing. Biochem Biophys Res Commun 416: 427-432.

24. Takahashi M, Elbarbary RA, Nakashima A, Abe M, Watanabe N, et al. (2013) A naked RNA heptamer targeting the human Bcl-2 mRNA induces apoptosis of HL60 leukemia cells. Cancer Letters 328: 362- 368.

25. Watanabe N, Narita M, Yamahira A, Taniguchi T, Furukawa T, et al. (2013) Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA. Leuk Res 37:580-585.

26. Takahashi M, Elbarbary RA, Watanabe N, Goto A, Kamiya D, et al. (2014) Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. Leuk Res. 38: 808-815.

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. Growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing.

Iizuka S1, Oridate N2, Nashimoto M3, Fukuda S1, Tamura M4.

PLoS One. 2014 Dec 1;9(12):e114121. doi: 10.1371/journal.pone.0114121.

eCollection 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

折館 伸彦 (ORIDATE, Nobuhiko)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：9 0 3 1 2 3 5 5

(2)研究分担者

梨本 正之 (NASHIMOTO, Masayuki)

新潟薬科大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：3 0 2 2 8 0 6 9

研究分担者

田村 正人 (TAMURA, Masato)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：3 0 2 3 6 7 5 7