

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463109

研究課題名(和文) HBp17 / FGFBP蛋白を標的とした口腔癌の分子標的診断・治療法の開発研究

研究課題名(英文) Development of molecular target diagnosis and therapy targeted HBp17/FGFBP protein

研究代表者

新谷 智章 (Shintani, Tomoaki)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：90403518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1,25(OH)2D3がOSCCのHBp17/FGFBP-1の発現に及ぼす影響を検討した。1,25(OH)2D3により、UE、NAおよびA431細胞におけるHBp17/FGFBP-1の遺伝子発現とタンパク発現は低下していた。I β Bの発現は有意に増加していた。レポーターアッセイにおいてUE細胞ではレポーター活性が約30%低下した。養上清中のFGF-2とHBp17/FGFBP-1の発現量は対照群に比べ減少していた。以上の結果から、OSCC細胞株において1,25(OH)2D3は、NF- κ B活性阻害を介してFGFBP/HBp17-1発現を抑制している可能性が強く示唆された。

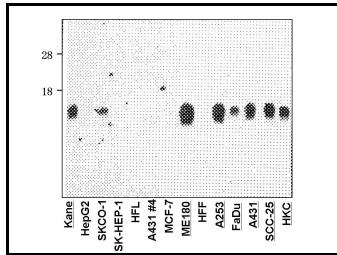
研究成果の概要(英文)：We tested the hypothesis that HBp17/FGFBP-1 expression was regulated by NF- κ B by manipulating this particular binding site, and then studied the possibility to inhibit the activation of FGF-2 in OSCC cells by repressing the expression of HBp17/FGFBP-1 using VD3. HBp17/FGFBP-1 mRNA and protein level were significantly down-regulated by VD3. The level of I β B, which is known as an NF- κ B regulator was up-regulated. As a result of a luciferase reporter assay, promoter activity of HBp17/FGFBP-1 was 30% suppressed by the VD3 treatment. Although VD3 did not show to have direct effect on FGF-2 expression, it has been revealed by ELISA that the level in the medium conditioned by the cells treated with VD3 significantly decreased. The data from quantitative RT-PCR, western blotting, and ELISA clearly showed that down-regulation of HBp17/FGFBP-1 resulted in inhibition of the FGF-2 release from the extracellular matrix.

研究分野：口腔外科学

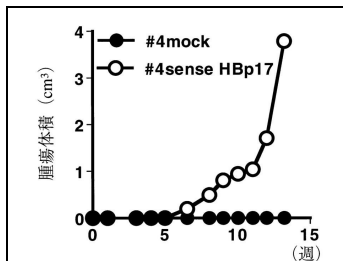
キーワード：HBp17 口腔癌 血管新生

1. 研究開始当初の背景

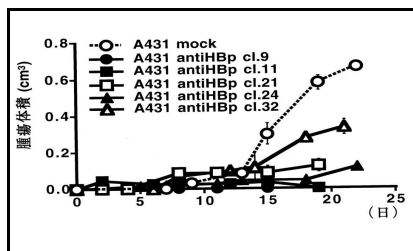
HBp17/FGFBP は上皮細胞で特異的に発現し、FGF-1、FGF-2 と可逆的に結合することから、FGF のスイッチ分子として標的細胞での FGF の遊離・活性化に深く関与していることが考えられる。そこで、SCC における HBp17/FGFBP の機能および分子標的としての可能性を明らかにするため、我々はこれまでに以下の実験を行ってきた。



(1) 造腫瘍性を欠かし HBp17/FGFBP 遺伝子を発現していない A431 の亜株である #4 クローンに HBp17/FGFBP 遺伝子を導入すると、*in vitro*での増殖能は A431 #4 細胞に比べ著しく亢進し、ヌードマウス背部皮下での造腫瘍性を獲得した。



(2) HBp17/FGFBP を高発現する A431 細胞に HBp17/FGFBP の anti-sense 遺伝子を導入し、HBp17/FGFBP の発現を抑制すると *in vitro* および *in vivo*での増殖能は著明に低下し、一部のクローンの造腫瘍性は消失した。



ビタミン D が骨代謝の重要な要素であることは以前より知られているが、近年、癌や心

臓病さらには若年での死亡リスクを低減させる効果があることを示す報告が増加し、特にビタミン D の癌予防効果に関心が集まっている。これまでの有力なエビデンスとして、大腸癌になるリスクが低い個体の半数は、ビタミン D3 値が高い個体群であることが報告されている。また、複数の臨床試験で、ビタミン D3 値が高いと、口腔癌、食道癌、膵臓癌および白血病のリスクが減少することも示唆されている。ビタミン D3 が転写因子 NF- κ B シグナル伝達経路を抑制することにより、上皮細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが知られている。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用については報告がない。そこで、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が OSCC の HBp17/FGFBP-1 の発現に及ぼす影響を検討し、さらにそのメカニズムを解明するために以下の研究を行った。

3. 研究の方法

無血清培養系で、OSCC 細胞株 UE, NA 細胞および A431 細胞に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (40nM) を添加し、12 時間後に RNA および細胞蛋白を抽出し、HBp17/FGFBP-1, FGF-2, ビタミン D3 レセプター (VDR) および NF- κ B 関連分子群 (I κ B, p65 および p50) の遺伝子および蛋白の発現を、定量 PCR 法およびウエスタンブロット法にて検討した。さらに、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、UE 細胞に遺伝子導入後、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるレポーター活性について検討を行った。また、ELISA 法を用いて、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が UE 細胞培養上清中の HBp17/FGFBP-1 と FGF-2 の蛋白量に及ぼす影響を検討した。UE 細胞に VDRi を遺伝子導入することで VDR 発現を抑制した UE 細胞に、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加し、HBp17/FGFBP-1 発現への影響を検討した。対

照として scramble siRNA を用いた。さらに、HBp17/FGFB-1 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、1,25(OH)₂D₃ の細胞内 HBp17/FGFBP-1 の局在に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

1,25(OH)₂D₃ (40nM) により、UE, NA および A431 細胞における HBp17/FGFBP-1 の遺伝子発現とタンパク発現は低下していた。また、FGF-2, VDR, p65 および p50 の発現は、1,25(OH)₂D₃ 群で変化は認められなかったが、I B の発現は有意に増加していた。レポーターアッセイにおいて、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列を遺伝子導入した UE 細胞では 1,25(OH)₂D₃ によりレポーター活性が約 30%低下した。1,25(OH)₂D₃ により、siVDR 細胞では対照群と比べ、HBp17/FGFBP-1 の遺伝子発現は約 20%抑制されたが、対照 siRNA 導入細胞では、約 70%の発現抑制を認めた。siVDR 細胞では、1,25(OH)₂D₃ により I B 発現の上昇は認められなかったが、対照 siRNA 導入細胞では、約 70%の発現増加を認めた。さらに、免疫蛍光染色の結果、1,25(OH)₂D₃ 群では HBp17/FGFBP-1 蛋白の核への局在が増加していた。培養上清中の FGF-2 と HBp17/FGFBP-1 の発現量を、ELISA 法を用いて定量した結果、1,25(OH)₂D₃ 群では対照群に比べ減少していた。

以上の結果から、OSCC 細胞株において 1,25(OH)₂D₃ は、NF- B 活性阻害を介して FGFBP/HBp17-1 発現を抑制している可能性が強く示唆された。また、FGFBP/HBp17-1 発現の低下に伴い、培養上清中における FGF-2 濃度も減少することが明らかとなった。これらの結果は、口腔癌に対して 1,25(OH)₂D₃ が FGFBP/HBp17-1 および NF- B を標的とした新たな治療薬となりうることを示している。

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 3 件)

Rosli SN, Shintani T, Toratani S, Usui E, Okamoto T. 1,25(OH)₂D₃ inhibits FGF-2 release from oral squamous cell carcinoma cells through down-regulation of HBp17/FGFBP-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50:802-6, 2014. (査読有)

Rosli S.N.Z, Shintani T, Hayashido Y, Toratani S, Usui E, Okamoto T. 1,25(OH)₂D₃ down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression via NF- B pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 136:98-101, 2013. (査読有)

Rosli SNZ, Shintani T, Hayashido Y, Toratani S, Usui E, Okamoto T. 1,25(OH)₂D₃ suppresses HBp17/FGFBP-1 expression via NF B pathway in oral squamous cell carcinoma cell line. *日本口腔組織培養学会雑誌*, 22: 49-52, 2013. (査読無)

[学会発表](計 5 件)

Rosli SNZ, Shintani T, Hayashido Y, Toratani S, Usui E and Okamoto T: 1,25(OH)₂D₃ down-regulates FGF-BP expression through NF B pathway. The 2th International Symposium Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster, Hiroshima, Feb. 10th 2013.

Rosli SNZ, 新谷智章, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 笛吹恵美子, 岡本哲治: Down-regulation of HBp17/FGFBP-1 by 1,25(OH)₂D₃ inhibits FGF-2 activity in oral squamous cell carcinoma cell line. 第 67 回日本口腔科学会学術集会, 宇都宮, 2013 年 5 月 22 日.

Rosli SNZ, Shintani T, Toratani S, Usui E and Okamoto T: Down-regulation of HBp17/FGFBP-1 by 1,25(OH)₂D₃

inhibits FGF-2 activity in oral squamous cell carcinoma cell line. 16th Workshop on Vitamin D, Sanfrancisco, USA, Jun. 11th 2013.

Rosli SNZ、新谷智章、林堂安貴、虎谷茂昭、笛吹恵美子、岡本哲治 : 1,25(OH)₂D₃ down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression in oral squamous cell carcinoma cell line through VDR-NF- κ B pathway. 第46回広島大学歯学会総会, 広島, 2013年6月22日.

Rosli SNZ、新谷智章、虎谷茂昭、笛吹恵美子、岡本哲治 : Down-regulation of HBp17/FGFBP-1 by 1,25(OH)₂D₃ inhibits FGF-2 distribution in oral squamous cell carcinoma cell line. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 智章 (SHINTANI TOMOAKI)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号 : 90403518

(2) 研究分担者

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)

広島大学・病院(歯)・講師

研究者番号 : 70243251

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 00169153

(3) 研究協力者

笛吹 恵美子 (USUI EMIKO)