

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670860

研究課題名(和文) Id蛋白脱ユビキチン化酵素阻害による口腔癌分化誘導療法

研究課題名(英文) Differentiation therapy of oral cancer by inhibiting deubiquitinase of Id protein

研究代表者

村瀬 隆一 (MURASE, RYUICHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70452696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究者は口腔癌の悪性化に関与する転写調節因子Idの発現が主に脱ユビキチン化酵素によって制御されていること明らかにした。とりわけ口腔癌ではUSP-1の過剰発現がIdの発現を促進して、細胞増殖および浸潤などの悪性形質の獲得に至ることが解明された。動物実験モデルでは、USP-1の発現を低下させることで腫瘍の増大が抑制されることが示された。これらの結果は、ある種の脱ユビキチン化酵素阻害剤の応用が口腔癌の分化誘導に繋がり、新規治療法の確立に発展する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The transcriptional factor Id is known to regulate several malignant phenotypes in oral cancers. In this study, we revealed that the expression of Id is mainly mediated by certain types of deubiquitinating enzymes, and that USP-1, known as one of deubiquitinases, promotes cell proliferation and invasion. Downregulation of USP-1 suppressed Id expression, which directly lead to tumor suppression in in vivo experiments. These results suggest that a certain type of deubiquitinases, which potentially modulate transcriptional factors, might be established as a novel therapeutic method for oral cancer patients.

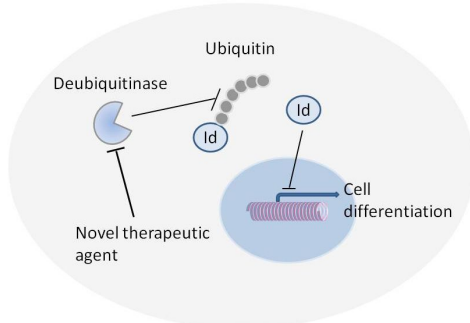
研究分野：口腔癌

キーワード：Id 脱ユビキチン化酵素 USP-1 分化誘導療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞の分化を司る転写調節因子の存在が注目を集めており、分化誘導療法の有用性を示唆する報告が年々増加傾向にある。癌の悪性形質を支持する転写調節因子は多種報告されているが、その中に Id と呼ばれるタンパク群が存在し、浸潤、転移、血管新生能などに関わることが報告されている。口腔癌においてもその役割が証明されており、低分化癌では Id が高発現していることや (Cancer Res, 2000) 発現を低下させることによって増殖、浸潤抑制効果が得られることが明らかにされている (Journal of Oral and Maxillofacial surgery, 2012)。また乳癌では、Id の発現阻害が転移抑制に直接繋がることが示されており、新規分子標的治療のターゲットになる可能性がある (Breast cancer research and treatment, 2011)。しかしながら Id の発現上昇に至るメカニズムは未だ十分に解明されていない。近年、骨肉腫において Id の発現が脱ユビキチン化酵素 USP1 によって制御されていることが報告された (Cell, 2011)。同様の報告は乳癌 (USP17)、前立腺癌 (USP26)、神経膠芽腫 (USP15) などでも報告されており、これらの阻害剤は新たな分子標的療法の確立に繋がることが期待されている。

(2) 研究者は過去の研究において、口腔癌の悪性化に転写調節因子 Id の発現が関与することを明らかにした。また Id の発現調節が主に脱ユビキチン化によって起こっていることを解明した。すなわち Id の脱ユビキチン化を制御できれば、癌細胞の増殖抑制や転移阻止に繋がる可能性がある。脱ユビキチン化を促進する因子は主に酵素であり、Id-1 の脱ユビキチン化に関わる酵素を特定し、これらの阻害剤を確立することが口腔癌の分化誘導療法になり得ると考えた (参考図)。



参考図: 脱ユビキチン化を介した Id-1 の発現上昇

2. 研究の目的

本研究は、口腔癌の Id 発現上昇に關与する脱ユビキチン化酵素を同定し、その阻害剤を用いた分化誘導療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌患者の腫瘍組織から培養した癌細胞に脱ユビキチン化酵素を強制発現させ、細胞形態や増殖速度、浸潤能への影響を評価する。ヒトに存在する脱ユビキチン化酵素は約 100 種類知られているが、本研究では予備実験にて癌との関連が示唆された 12 種類 (USP1, USP15, USP17, USP26, USP33, USP36, USP45, USP9Y, OTUD5, JOSD2, SENP3, SENP5) を対象に検討を行う。まず高分化型口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2, HSC4) にこれらの脱ユビキチン化酵素を強制発現させ、Id の発現レベル (Id-1, 2, 3) をウェスタンブロッティングでチェックし、発現の高いものに関しては invasion assay を行い浸潤能と相関しているか否か検討する。

(2)(1) で同定した脱ユビキチン化酵素の効果を、患者から採取した培養細胞を用いてスクリーニングを行う。ここでは特に高分化型の扁平上皮癌細胞に脱ユビキチン化酵素を強制発現させて、分化度の変化、浸潤能を検討する。このスクリーニングは 50 名の癌患者から採取した培養細胞を用いて入念に行う。初代培養した細胞は継代を重ねる毎に悪性度を増すと考えられるため、コントロールベクターを導入した細胞を対象群に置き、継代数を合わせて評価する。それと同時に Id の発現量をウェスタンブロッティングや RT-PCR 法で定量し、上述した細胞の悪性度と相関しているか調べる。細胞の分化抑制に寄与する脱ユビキチン化酵素が同定されれば、分化誘導療法の標的となり得る可能性があるため、動物実験レベルでさらなる検討を行う。

(3)(2) で同定された脱ユビキチン化酵素に対する shRNA を作成し、酵素の発現阻害を行う。特に低分化癌から培養した細胞に導入し、分化度と浸潤能の変化を評価する。shRNA による脱ユビキチン化酵素の抑制効果が Id の発現低下を惹起しているか検討を行う。また酵素特異的な阻害剤を用いた阻害実験を行い、それぞれの効果を検証する。初代培養細胞に対する効果が確認されれば、低分化型口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-3, SAS) を用いて、

より悪性度の高い口腔癌細胞株に効果が認められるか検証する。

(4) 培養細胞レベルで十分な効果が認められることを確認した後に、マウスを用いた動物実験を行う。背部皮下に腫瘍を形成させた後、脱ユビキチン化酵素阻害剤を含んだアテロコラーゲンを局注し、腫瘍の増殖抑制効果が認められるか検証する。また尾静脈から癌細胞を投与する人工転移モデルや、咬筋に腫瘍を生着させる自然転移モデルを作成し、転移抑制効果が得られるかについても検討する。人工転移モデルでは肺の転移巣、自然転移モデルでは頸部リンパ節への転移について評価を行う。生着した腫瘍や転移巣からは組織切片を作成し、免疫組織染色を含む病理組織検査を行う。脱ユビキチン化酵素阻害剤の投与方法としては、原発巣周囲への局所投与を行うほか、転移巣に対しては上述したドラッグデリバリーシステムを応用して経静脈投与を試み、それぞれの効果を検証する。

4. 研究成果

(1) まず予備実験で同定されていた12種類の脱ユビキチン化酵素を口腔癌細胞株に強制発現させた結果、USP-1とUSP-15においてId-1の著明な発現上昇を認めた。とりわけUSP-1強制発現株では、検討した全ての細胞株で2倍以上のId発現上昇(Id-1, Id-2, Id-3を含む)を認めた(図1)。USP-1を強制発現させた細胞は、増殖能、浸潤能がともに上昇しており、高悪性度の口腔癌細胞の特徴を示していた(図2)。またこれらの結果は細胞株だけでなく、患者の癌組織から採取し培養した細胞においても同様の傾向が認められた。すなわち、口腔癌細胞において脱ユビキチン化酵素USP-1が転写調節因子Id-1の発現を調節し、悪性形質を支持している可能性が示された。

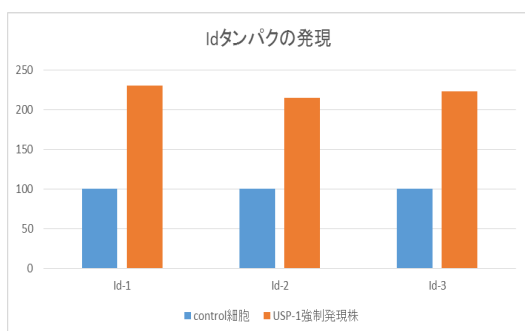


図1. 口腔癌細胞におけるIdタンパクの発現

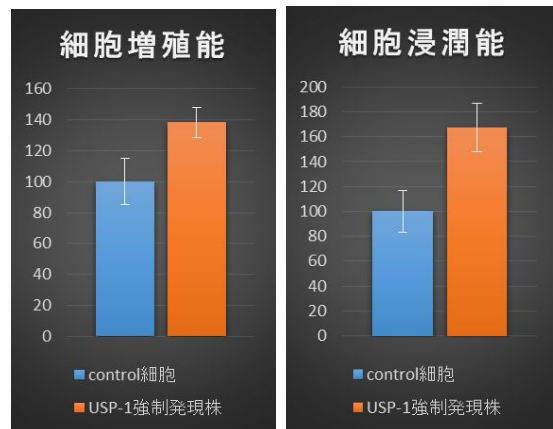


図2. 口腔癌細胞のUSP-1制御時の増殖および浸潤能

(2) 培養細胞での解析後、マウス皮下に移植し動物実験レベルで評価を行った。この結果、USP-1を強制発現させた口腔癌細胞はコントロール細胞に比べて増大速度が有意に高かった(図3)。またUSP-1の発現を抑止するために、特異的に阻害するshRNAを作製して検討を行ったところ、Idの発現低下とともに細胞増殖、浸潤能が著明に低下することが明らかとなった。

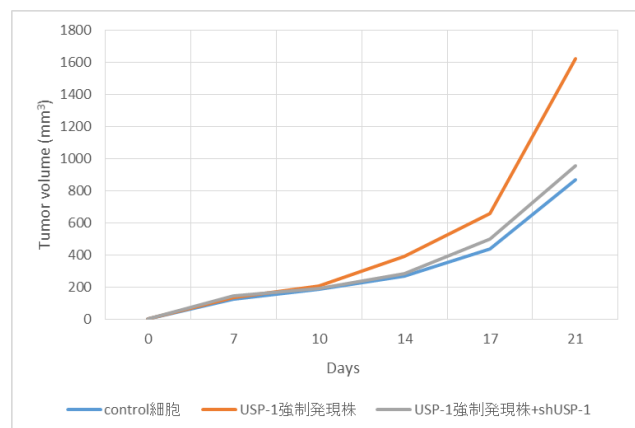


図3: マウス皮下移植モデルにおける腫瘍容積の変化

(3) またUSP-1発現を特異的に阻害する脱ユビキチン化酵素阻害剤を腫瘍周囲に直接投与して腫瘍抑制効果が見られるか検討したが、効果としてはやや弱い傾向であった。この原因としては、薬剤が計時的に失活し十分な効果を発揮できていない可能性が考えられた。現在様々な濃度のアテロコラーゲンと混和させるなど幾つかの投与方法を検討しており、阻害剤の濃度と状態を適切に保つ手法を検討している。

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 0 件)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

村瀬 隆一(Murase, Ryuichi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70452696