

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861408

研究課題名(和文) 頭頸部癌の遠隔転移機構におけるインターフェロン調節因子の役割の解明

研究課題名(英文) Role of Interferon regulatory factor for distal metastasis in head and neck cancer

研究代表者

高橋 秀聡 (TAKAHASHI, Hideaki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50727196

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)：頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるインターフェロン調節因子の発現と転移能の関連について検討を行った。siRNAを用いたIRF1, IRF6のknock down細胞株の作成, 及びプラスミドベクターを用いてIRF1, IRF6を強制発現させたknock in細胞株の作成を行い浸潤能, 遊走能を評価したがいずれも野生株と比べて有意差は認めなかった。しかしknock in細胞株では細胞増殖能が亢進する傾向が認められ, IRF1およびIRF6は頭頸部扁平上皮癌においては細胞増殖に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the correlations the invasion ability and the migration ability and IRF in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. siRNA knockdown of IRF1, 2, 6 and over expression of IRF1, 2, 6 with IRFs vector in metastatic HNSCC cells did not suppress tumor invasion and migration. But, over expression of IRF1, 2, 6 with IRFs vector in metastatic HNSCC cells promote cell proliferation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 肺転移 IRF

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は高度に遠隔転移病変を有し、遠隔転移を有する患者の予後は極めて不良であるが、詳細な機序は解明されているとはいえない。申請者は、遠隔転移を再現、検討できる頭頸部癌遠隔転移モデルを用いて、さまざまなヒト頭頸部癌細胞株の遠隔転移巢形成能を *in vivo* で検討した。この結果と Whole gene microarray および遺伝子カスケード解析結果から、新規の頭頸部癌遠隔転移関連候補遺伝子としてインターフェロン調節因子 (IRF) 遺伝子群が同定された。

2. 研究の目的

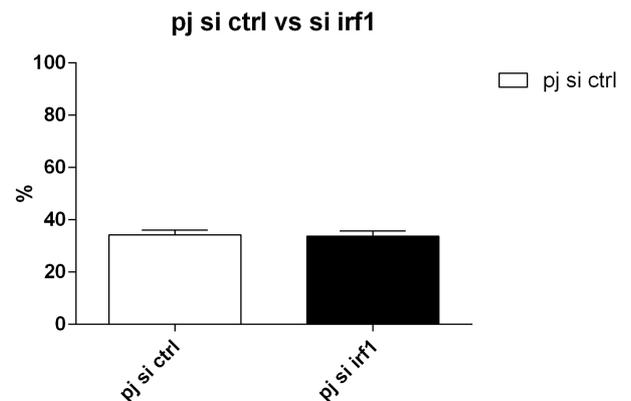
- (1) IRF 遺伝子群の頭頸部癌における遠隔転移の進展への関連について *in vitro* および *in vivo* で検討を行う。
- (2) 転移への関連がしめされた場合にはその機序の解明を行う。

3. 研究の方法

- (1) 頭頸部癌細胞株における IRF ファミリータンパク質 (IRF1, 2, 6, 8) の発現について、Western blot 法を用いて評価、および細胞株の持つ遠隔転移形成能との関連を検討した。
- (2) 遠隔転移巢形成能と関連が疑われる IRF 遺伝子が高発現している頭頸部癌細胞株を選抜し、small interfering RNA (siRNA) を用いて特定の IRF 遺伝子を knock down した頭頸部癌細胞株を作製した。
- (3) (2)と同様に、IRF ファミリー遺伝子の発現が低い頭頸部癌細胞株を選抜し、発現ベクターを用いて同タンパク質の強制発現細胞株を作製した。
- (4) IRF の発現抑制または強制発現により浸潤能および遊走能に変化を来たしうるか、invasion assay および wound healing assay を行い検討した。

4. 研究成果

- (1) 10 種類の頭頸部癌細胞の IRF1, 2, および 8 種類の頭頸部癌細胞の IRF6 のタンパク質発現を Western blot 法で評価した。このうち IRF1 および IRF2 遺伝子が高発現している細胞株である PJ34, Detroit562 を選抜し、siRNA を用いて IRF1 および IRF2 遺伝子の knock down を行った。Invasion assay および wound healing assay により浸潤能、遊走能を比較検討したが、いずれの細胞株においても発現抑制群はコントロール群と比して有意な差を認めなかった。PJ34 は IRF6 遺伝子高発現細胞株でもあるため、同様に siRNA を用いて IRF6 遺伝子の knock down を行い invasion assay および wound healing assay を行ったが、発現抑制株は野生株と比べて浸潤能、遊走能ともに有意な差を認めなかった (図 1)。



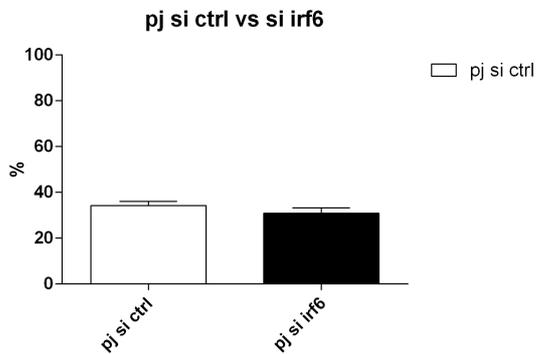


図 1. Wound healing assay による IRF1,IRF6 発現抑制時の遊走能の評価

(2) 続いて, IRF1, 6 タンパク発現低値である KCC-T871 を選抜し, プラスミドベクターを用いて IRF1, IRF6 の強制発現細胞株を作製し, 浸潤能, および遊走能を比較したが, 強制発現群とコントロール群で有意な差を認めなかった (図 2) .

Ctrl	86%
IRF1	81%
IRF6	85%

図 2. Wound healing assay による IRF1,IRF6 強制発現時の遊走能の評価

(3) IRF1 および 6 の増殖能における効果を検討するため, WST-8 assay を行った. このうち細胞株 Detroit562 の発現抑制群 (si IRF1, si IRF6) ではコントロール群 (si ctrl) と比して増殖能が上昇する傾向がみられた (図 3).

以上の結果から, IRF1 および IRF6 は頭頸部扁平上皮癌において浸潤能、遊走能には変化を認めないものの, 増殖の抑制に関与している可能性が示唆された.

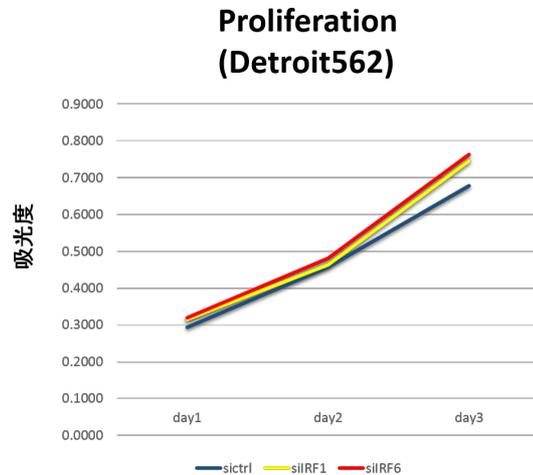


図 3. WST-8 assay による増殖能の評価

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(1件)

Hiroshi Hyakusoku, Daisuke Sano, Hideaki Takahashi, Takashi Hatano, Yasuhiro Isono, Shoko Shimada, Yusuke Ito, Jeffrey N. Myers, Nobuhiko Oridate. JunB promotes cell invasion, migration and distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma, J Exp Clin Cancer Res, 査読有, Vol 35, 2016, pp.1-12 doi: 10.1186/s13046-016-0284-4.

〔学会発表〕(6件)

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Oridate N: JunB promotes distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya Congress Center, Nagoya, October 8-10, 2015

百束紘, 佐野大佑, 高橋秀聡, 波多野孝, 磯野泰大, 荒井康裕, 折館伸彦: 頭頸部癌遠隔転移進展における AP-1 遺伝子群の関与についての検討. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 東京国際フォーラム, 東京, 2015 年 5 月 20-23 日

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Oridate N: AP-1 family promotes cell invasion and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma in vivo. 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Pacifico Yokohama, Yokohama, September 25-27, 2014

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Oridate N: The comprehensive profile with the upstream and key nodes analysis for regional and distant metastatic potential of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. 5th World Congress of IFHNOS, New York, USA, July 26 -30, 2014

佐野大佑, 高橋秀聡, 折館伸彦. 遺伝子カスケード解析による頭頸部癌マウスモデルにおける頸部リンパ節・遠隔転移能に対する検討. 第 38 回日本頭頸部癌学会, 東京ファッションタウンビル, 東京, 2014 年 6 月 12-13 日

佐野大佑, 百束紘, 高橋秀聡, 荒井康裕, 高橋優宏, 西村剛志, 折館伸彦. 遺伝子カスケード解析による同所性頭頸部癌モデルにおける頸部リンパ節転移能に対する検討. 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, ヒルトン福岡シーホーク, 福岡, 2014 年 5 月 14-17 日

〔図書〕(0 件)

〔産業財産権〕(0 件)

〔その他〕特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀聡 (TAKAHASHI, Hideaki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号: 50727196