

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592016

研究課題名 (和文) ヒト乳頭腫ウイルス遺伝子を標的とした頭頸部癌に対する遺伝子治療

研究課題名 (英文) Gene therapy targeting HPV oncogenes against head and neck cancer

研究代表者

大月 直樹 (OTSUKI NAOKI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40343264

研究成果の概要 (和文)：) HPV 陽性扁平上皮癌の培養細胞株に E6 および E7 に対する siRNA を導入することにより、E6 および E7 の発現が抑制され、p53 および Rb の発現が mRNA レベル、タンパクレベルでともに増強し、結果として細胞の増殖は抑制され、アポトーシスが誘導されることが in vitro で確認された。現在 in vivo での実験を行い、解析中である。

研究成果の概要 (英文)： Introduction of HPV16 E6/E7 siRNA might be a potentially potent and specific approach, to inhibit proliferation and induce apoptosis of HNSCC containing HPV16 cell lines. For clinical we are currently preparing to test the effects of HPV16 E6/E7 siRNA on xenograft of HNSCC containing HPV16 cell lines

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部がん、遺伝子治療、ヒト乳頭腫ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんの発癌原因として喫煙・アルコールの関与が知られているが、近年ヒト乳頭腫ウイルス (以下 HPV) が発癌に関与することが報告されている。本研究では、頭頸部扁平上皮癌の集学的治療の開発をめざして、HPV およびその関連遺伝子に関する分子生物学的研究を計画した。

## 2. 研究の目的

- (1) 頭頸部扁平上皮癌の発生、進行における HPV およびその関連遺伝子の関与を明らかにする。
- (2) 臨床応用まで視野に入れた HPV を標的とした遺伝子治療の開発

## 3. 研究の方法

- (1) HPV 陽性扁平上皮癌の培養細胞株 (SCC-47) に HPV の癌遺伝子である E6 および E7 に対する siRNA を導入し、癌抑制遺伝子

(p53 および Rb) の発現を検討した。  
 (2) HPV 陽性扁平上皮癌の培養細胞株に E6 および E7 に対する siRNA を導入することにより、細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導が得られるかを in vitro で検討した。  
 (3) HPV 陽性扁平上皮癌の培養細胞株を移植したヌードマウスに E6 および E7 に対する siRNA を導入し、腫瘍増殖抑制効果が見られるか検討した。(現在も実験継続中)

#### 4. 研究成果

(1) HPV 陽性扁平上皮癌の培養細胞株に HPV の癌遺伝子である E6 および E7 に対する siRNA をそれぞれ導入することにより、E6 および E7 の発現が抑制され、p53 および Rb の発現が mRNA レベル、タンパクレベルでともに増強することが確認された。(図 1、2)

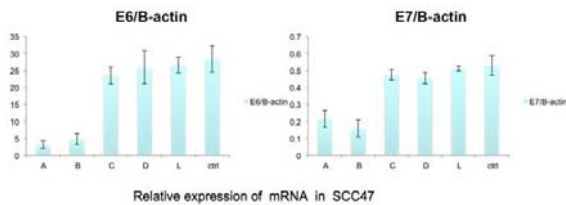


図 1 siRNA 導入による E6, E7 mRNA 発現抑制  
 A, B: E6, E7targetting siRNA  
 C, D: Scramble siRNA

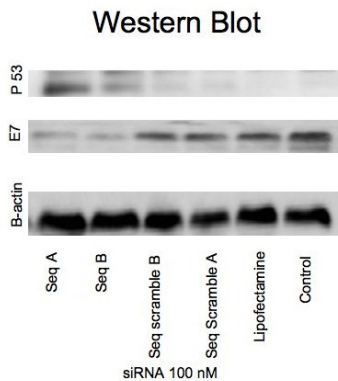


図 2 siRNA 導入による E7 protein の発現抑制と p53 の発現増強  
 Seq A, B: E6, E7targetting siRNA

(2) In vitro の実験において、E6 および E7 に対する siRNA を導入することにより、p53 および Rb の発現が増強し、結果として細胞の増殖は抑制され、アポトーシスが誘導されることが確認された。(図 3、4、5)

#### SCC 47 after transfection SiRNA 72 h

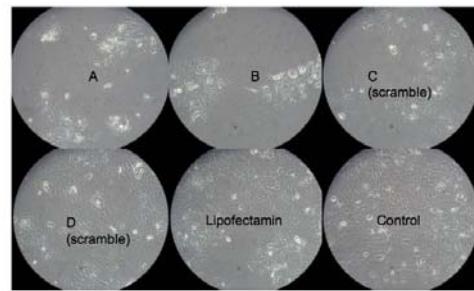


図 3 siRNA 導入による細胞増殖抑制  
 A, B: E6, E7targetting siRNA  
 C, D: Scramble siRNA

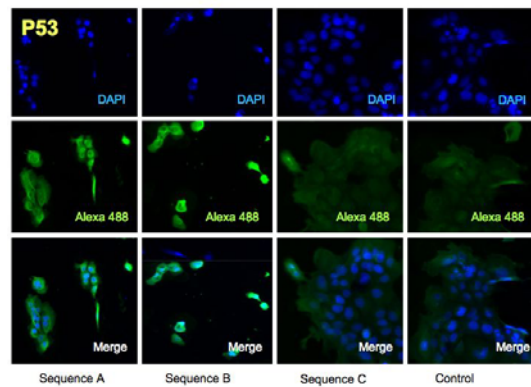


図 4 siRNA 導入による p53 発現

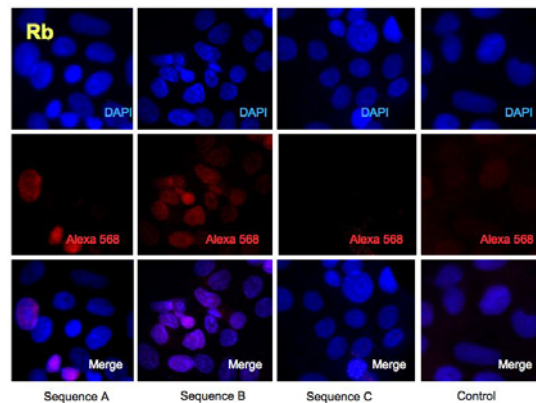


図 5 siRNA 導入による Rb 発現

(3) E6 および E7 に対する siRNA を同時に導入することにより抑制効果が増強されることが確認された。(図 6、7)

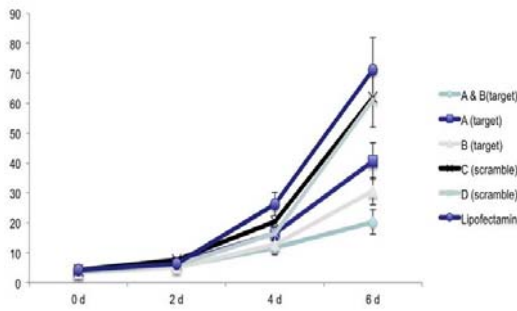


図6 E6/E7 siRNA 導入による細胞増殖抑制  
A, B: E6, E7targetting siRNA  
C, D: Scramble siRNA

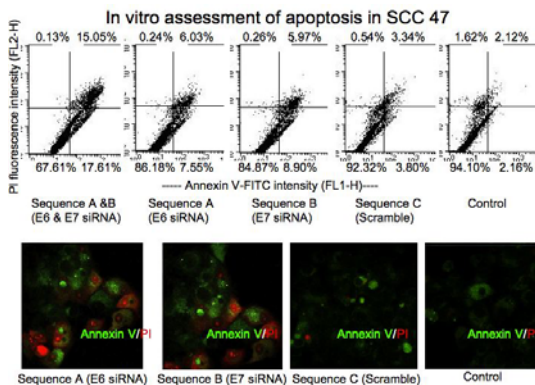


図7 E6/E7 siRNA 導入によるアポトーシスの誘導

(4) In vivo での実験は継続中であり、現在解析中である。

なお、以上の実験成果は AA0-HNS (San Francisco) において発表する予定である。

## 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 6 件)

- ① 大月直樹、丹生健一、頭頸部癌、遺伝子診断・治療の現況、癌と化学療法、査読無、35 巻、2008、1126-1131
- ② 大月直樹、齋藤幹、丹生健一、喉頭癌に対する化学放射線療法の役割、頭頸部外科、査読無、19 巻、2009、5-11
- ③ 大月直樹、齋藤幹、中川貴博、丹生健一、早期声門癌における放射線治療による制御不良例の検討、喉頭、査読有、21 巻、2009、16-20
- ④ 森本浩一、大月直樹、土井清司、齋藤幹、丹生健一、眼瞼脂腺癌リンパ節転移に対する治療法についての検討、耳鼻咽喉科・頭頸部外科、査読有、82 巻、2010、995-997
- ⑤ 山本沙織、森本浩一、齋藤幹、大月直樹、丹生健一、喉頭に発生した尋常性疣贅の 2 例、喉頭、査読有、82 巻、2010、799-804
- ⑥ 大月直樹、齋藤幹、丹生健一、下咽頭癌化学放射線治療後の救済手術 重複癌に対する手術を中心に、日本気管食道学会会報、査読無、61 巻、2010、112-114

[学会発表] (計 8 件)

- ① N.Otsuki、Vocal Outcomes after total laryngectomy、7<sup>th</sup> International Conference on Head and Neck Cancer、2008/7/20、San Francisco
- ② 大月直樹、当科における下咽頭・食道重複癌症例の検討、第60回日本気管食道学会、2008/11/7、熊本
- ③ 大月直樹、下咽頭癌 (化学) 放射線治療後の救済手術 (シンポジウム)、第61回日本気管食道学会、2009/11/6、横浜
- ④ 山本沙織、大月直樹、声帯に発生した尋常性疣贅 (ウイルス性疣贅) の 2 例、第22回喉頭学会、2010/3/5、下関
- ⑤ N.Otsuki、Evaluation of Vocal Functions after Partial and Total Laryngectomy、4<sup>th</sup> World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies、2010/6/17、Seoul
- ⑥ 大月直樹、唾液腺癌遠隔転移例に対する化学用法の検討、第34回日本頭頸部癌学会、2010/6/10、東京
- ⑦ 大月直樹、喉頭・下咽頭進展を伴った甲状腺癌 3 例の検討、第43回日本甲状腺外科学会、2010/10/14、倉敷
- ⑧ 大月直樹、悪性気道狭窄の治療戦略 喉頭癌・下咽頭癌進行例に対する気道の取り扱い、第43回日本気管食道学会、2010/10/14、別府

- ⑨ 大月直樹、咽頭間隙・喉頭蓋前間隙に進展した甲状腺乳頭癌症例の臨床的検討、第21回頭頸部外科学会、2011/1/28、宇都宮

[図書] (計1件)

- ① 大月直樹 (分担)、中外医学社、EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 下咽頭がんに対する頸部郭清先行化学放射線治療のEBMとは?、2010、473-476

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大月 直樹 (OTSUKI NAOKI)  
神戸大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：4034264

### (2) 研究分担者

丹生 健一 (NIBU KENICHI)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号：20251283

### (3) 研究分担者

白川 利朗 (SHIRAKAWA TOSHIRO)  
神戸大学・医学部・准教授  
研究者番号：70335446

### (3) 連携研究者

該当なし