

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 3 月 3 1 日現在

機関番号：17102  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659880  
 研究課題名（和文） PET トレーサを応用した標的蛋白発現トリガー／安定化リガンドによる  
 癌治療法の開発  
 研究課題名（英文） Study for therapeutic strategy using the target protein expression  
 system based on protein stabilization/destabilization in the cancer  
 tracing mechanism  
 研究代表者  
 坂井 英隆（SAKAI HIDETAKA）  
 九州大学・歯研究院・教授  
 研究者番号：80136499

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、PET トレーサにより標的蛋白発現トリガー/安定化リガンドを腫瘍組織まで誘導し、標的癌細胞で選択的遺伝子/蛋白発現や発現させた不安定化蛋白を標的癌細胞内で安定化させることより、腫瘍細胞により特異的な効果をもたらす治療法の礎となる基礎的実験を試みた。扁平上皮癌細胞の遺伝子発現系の変化に加え、外部からの刺激による変化でも STAT 系シグナルの変動が見られ、また薬剤抵抗性に STAT 系シグナルの関与が示唆された。選択的調節発現系の設計には、STAT 系シグナルの制御が重要と思われた。

## 研究成果の概要（英文）：

We studied regulations of gene/protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells stimulated by exogenous factors and drug-resistance of the OSCC cells in order to develop the anti-cancer therapeutic strategy using the target protein expression system based on protein stabilization/destabilization in the cancer tracing mechanism. The OSCC cells downregulated the keratinocyte differentiation-related genes and upregulated the expression of SERPINB3/4 (SCCA1/2), well-known SCC markers, following treatment with IL-22. These results indicate that IL-22 and IL-6 differentially activate the STAT-signaling pathway depending on the type of OSCC. When the OSCC cells with resistance to the V-ATPase inhibitor were treated with combination with SAHA, these cells indicated the change in STAT signaling pathway and became more susceptible to the V-ATPase inhibitor. Together these findings suggest V-ATPase could be an attractive target against OSCCs. In addition, combination with other reagents such as SAHA could help V-ATPase inhibitors to induce apoptosis in the V-ATPase inhibitor-resistant OSCC cells via change in STAT-signal pathway. Together, the regulation of STAT-signaling pathway may be a pivotal target for development of the tumor specific expression system. The accumulation of these data could lead to the development of new perspectives on this disease, and potentially new therapies with few side effects, thereby improving the treatment of patients with OSCC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：腫瘍治療、PET トレーサ、遺伝子／蛋白調節

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療では、癌組織を標的化して癌組織にのみ抗癌剤を投与したり、治療遺伝子を発現できれば、その治療効果と正常細胞への副作用回避が期待される。

遺伝子治療は、1990年に米国で臨床研究が開始され、治療効果の認められる疾患も散見するが、未だ患部への遺伝子導入効率の低さや目的遺伝子の特異的発現効率が問題とされる。

目的遺伝子を標的組織にのみ発現させるには、次のような工夫が求められる。

- 1) 標的組織特異的にベクターを導入
- 2) 標的組織内でベクターを増幅
- 3) 標的組織特異的プロモーターの利用 など

1)に関しては、遺伝子治療では、アデノウイルスベクターがよく検討されているが、標的組織にだけ感染させることが求められるため、このベクターの利点である広い感染域を制限する必要がある。現在、ウイルス表面のファイバー改変で感染域が制限されてきたが、さらに感染組織特異性に関する追求が求められる。

2)に関してはレンチウイルス等の使用が検討されているが、未だ病原性の問題が残る。

3)は、昨今、コンディショナルノックアウトマウス作製法の改良により標的組織内発現が厳密に行われてきた。これを参考にtet-on/off 発現調節系や、標的蛋白質と不安定化ドメインの融合蛋白質をリガンドの有無によって発現蛋白質の安定性を制御する蛋白質発現量制御システム(Banaszynski et al., Cell 2006)を応用し、標的因子の発現制御を試みることが可能と思われる。

さらに、がんの早期発見を可能にしたPET (positron emission tomography) 検査は、腫瘍細胞のブドウ糖代謝能が高いことから<sup>18</sup>F-フルオロデオキシグルコース(FDP)というトレーサの集積部位を検索する。このようなPET トレーサの腫瘍細胞集積性を利用して抗癌剤等を腫瘍細胞に運ばせる戦略も考えられる。

これらのシステムのキー因子である標的蛋白質発現トリガーや安定化リガンドをPET トレーサによって腫瘍部位に集積させることで、より効果的に腫瘍組織特異的標的蛋白質の発現を試みる事が出来る。

ただし、これらトレーサは脳、心臓、肝臓、唾液腺、腎臓、膀胱などの臓器には糖の生理的集積を

認めるため、予期せぬ副作用を齎す可能性も否めない。

## 2. 研究の目的

本研究では、PET トレーサにより標的蛋白質発現トリガー/安定化リガンドを腫瘍組織まで誘導させ、標的癌細胞での導入遺伝子の選択的発現や発現した不安定化蛋白質の安定化を図ることで、腫瘍細胞のみにより特異的な効果をもたらす治療法の礎となる基礎的実験を試みる。

また、併せて様々な蛋白質や薬剤に対する癌細胞の形質や動態変化を捉え、標的発現因子や遺伝子候補を見出す。

## 3. 研究の方法

① mRNA発現調節系および不安定蛋白質発現量制御システムを備えた扁平上皮癌細胞/不死化角化細胞の樹立(いずれも発現蛋白質はGFP)

不安定蛋白質発現量制御システムでは、不安定化ドメインを標的蛋白質に融合させ、リガンドの結合により安定化させる。非存在下では標的蛋白質は速やかに分解される。本研究ではGFPを検索指標として標的蛋白質とする。

mRNA発現調節システムも同様にGFPを標的蛋白質とする。

② 癌組織周囲や癌細胞自身から発現されるサイトカインやその関連因子による癌細胞の形質や細胞動態への影響

標的蛋白質/遺伝子の発現や安定化制御を行なう上で、サイトカインやその関連因子により生じるシグナル系の影響を検討する。

③ 標的蛋白質/遺伝子発現による抗腫瘍効果

不安定蛋白質発現量制御システムの標的蛋白質/遺伝子候補の抗腫瘍効果を検討する。

扁平上皮癌由来培養細胞株およびそれらの細胞株を移植した担癌マウスを用いて標的遺伝子・蛋白質の発現調節による抗腫瘍効果を評価する。

- ④ 併せて抗腫瘍効果を有すると考えられる薬剤の単独/併用使用による抗腫瘍効果およびその機序に関する検索

これらの結果を検討して改善点の焙り出しと、目的蛋白のバックグラウンド発現抑制効果を考察し、今後の戦略の構想の礎とする。

#### 4. 研究成果

われわれは、口腔癌組織、特に扁平上皮癌を標的化して癌組織にのみに抗腫瘍性と関連する遺伝子・蛋白の発現調節を行うことによる癌治療開発を目指している。そのひとつの方法として、トレーサにより標的蛋白発現トリガー/安定化リガンドを腫瘍組織まで誘導させ、標的癌細胞における導入遺伝子の選択的発現や発現させた不安定化蛋白を標的腫瘍組織内で安定化させ、より特異的に抗腫瘍効果を発揮させることを考えている。本研究課題では、こうした手法による治療開発の為の礎を築くことを目的とした。

mRNA発現調節系および不安定蛋白質発現量制御を細胞内および組織内で確認するために、まずはGFPを発現蛋白として検索した。不安定蛋白質として発現させたGFPのmRNA発現量は導入細胞株間で差が生じ、また産生された蛋白の安定化についても株間差が見られた。治療現場では、一過性発現を踏まえた発現制御が求められるため、種々の腫瘍細胞に応じたプロモーターの改変、リガンド添加量やタイミングを含めた検索を進めることが今後必要になると思われる。

口腔扁平上皮癌細胞のみならず、癌細胞の形質や細胞動態は、癌組織周囲や癌細胞自身から発現されるサイトカインやその関連因子によって影響を受ける。そこで、炎症性細胞で発現し、その受容体は主に上皮系細胞で発現しているIL-22の口腔扁平上皮癌に対する影響を検索した。このシグナル伝達系にSTAT3の発現やリン酸化が関わることが明らかとなり、また扁平上皮癌腫瘍マーカーとして臨床的に用いられるSCCA1/2 (SERPINB3/4)の発現にも影響した。このSTATシグナル伝達系は、IL-6等の炎症性サイトカインのSTATシグナル伝達系とも重なっており、腫瘍組織内で選択的発現制御を検討する上で考慮すべき重要な経路と思われる。

また、このシステムに組み入れて抗腫瘍効果をもたらす因子候補として検討している標的蛋白、

標的遺伝子siRNAおよび薬剤などについて検討した。

扁平上皮癌細胞に対する標的遺伝子・蛋白の発現による抗腫瘍効果の評価を目的にin vitroとin vivo実験を行なった。標的蛋白には、上皮細胞の分化や細胞死に関わり、癌化に伴い消失の認められた蛋白群を候補とし、標的蛋白候補の一部を欠失させた遺伝子発現ベクターを作成した。扁平上皮癌細胞株に発現ベクターを導入したところ、MTS assayやTUNEL法にて標的蛋白の発現による癌細胞の細胞生存率の減少、アポトーシス誘導が確認された。同様に担癌マウスを用いて、これらによる癌細胞への細胞死誘導や腫瘍組織の大きさの低下を確認した。

SCCA1/2は腫瘍マーカーとして臨床的に用いられ、セリンプロテアーゼ阻害因子SERPINB3/4とも呼ばれ、種々の外部刺激によるアポトーシス抑制に関与する。これに対して結合部位の異なる数種のsiRNAを用いて扁平上皮癌細胞株に対する影響を検索した。扁平上皮癌細胞株へのSCCA1/2 (SERPINB3/4) siRNA導入にて、いずれもSCCA1/2 (SERPINB3/4)のmRNA量を明らかに減じさせた。しかし、siRNAの結合部位によって細胞形態変化やアポトーシス誘導に差が見られた。そのような差が生じさせた発生機序に関する詳細な検索も求められる。

さらに、薬剤抵抗性を呈する扁平上皮癌細胞株 SQUU-B にその薬剤を添加して、pro-/anti-apoptosis genesの発現変化を検索すると、anti-apoptosis gene Bcl-2の発現上昇が見られた。他の薬剤を追加してcombination therapyを試行した処、SQUU-Bの薬剤抵抗性は減弱し、そこにはリン酸化STAT3の変化によるBcl-2の発現抑制が関わることが解明した。これらのことより、標的遺伝子・蛋白の調節発現系には癌細胞における恒常的活性化STAT3のみならず、一過性発現の影響も考慮すべきと思われる。これは、IL-22やIL-6他のSTATシグナル系の検索結果からも、次期研究展開ではこのシグナル系を如何に制御するかは重要な課題となろう。

これらの結果から焙り出された問題点や改善点を次期戦略構想の礎として有用と思われる。“post-FDPトレーサ”としてがん組織の代謝機能や特異的環境(“血管新生”、“低酸素状態”や“酸性環境”)に应答する様々な化合物の開発が精力的に進められているので、がん組織の環境特異性に応じて将来的には多様なトレーサから選択するこ

とが出来るように、上記検索から得られた問題点や改善点を踏まえてさらに研究を展開していく。

#### 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 8 件)

- (1) Uchimaru M., Sakai T., Moroi R., Shiota S., Shibata Y., Deguchi M., Sakai H., Yamashita Y. and Terada Y.

Antimicrobial and antifungal effects of tissue conditioners containing a photocatalyst.

Dent Mater J. 30(5): 691-9 (2011).

DOI: 10.4012/dmj.2010-203

- (2) Kukita A., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Li Y.J., Yoshida H., Miyamoto H., Gay S., Pessler F. and Shobuike T.

The transcription factor FBI-1/OCZF/LRF is expressed in osteoclasts and regulates RANKL-induced osteoclast formation in vitro and in vivo.

Arthritis Rheum. 63(9): 2744-54 (2011).

DOI: 10.1002/art.30455.

- (3) 藤原弘明、小林家吉、清島 保、永田健吾、和田裕子、大隈由紀子、塩塚真帆、木原槿子、坂井英隆

左側上顎に発生した石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の1例

診断病理、28(2) 117-121 (2011)

- (4) Naher L., Kiyoshima T., Kobayashi I., Wada H., Nagata K., Fujiwara H., Ookuma Y.F., Ozeki S., Nakamura S., and Sakai H.

STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma.

Int. J. Oncol. 41(5): 1577-86 (2012).

DOI: 10.3892/ijo.2012.1594.

- (5) Kiyoshima T., Nagata K., Wada H., Fujiwara H., Shiotsuka M., Kihara M., Hasegawa K.,

Someya H., and Sakai H.

Immunohistochemical Expression of Thymosin  $\beta$ 4 in Ameloblastomas and Odontomas.

Histol. Histopathol. 28(6): 775-86 (2013).

- (6) Kakehashi H., Kawano S., Kiyoshima T., Shimizu M., Moriyama M., Matsubara R., Kiyosue T., Goto Y., Shiratsuchi H., Nakamura S.

Parotid gland myoepithelioma with remarkable cystic formation: A case report.

J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol. 25(2): 183-8 (2013).

DOI: 10.1016/j.ajoms.2012.05.018

- (7) 見立英史、大部一成、吉賀大午、川野真太郎、河津俊幸、清島 保、豊嶋健史、北村亮二、中村誠司

下顎歯肉に見られた腺扁平上皮癌の1例

日本口腔腫瘍学会誌、24(2) 55-61 (2012).

DOI: 10.5843/jsot.24.55

- (8) 道免和文、田中博文、春野政虎、藤原弘明、小林家吉、清島 保、下田慎治、坂井英隆

原発性肝扁平上皮癌の1剖検例

肝臓、53(3) 183-190 (2012).

DOI: 10.2957/kanzo.53.183

[学会発表] (計 8 件)

- ① 和田裕子、塩塚真帆、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、坂井英隆

歯胚形成過程における Thymosin $\beta$ -10 の役割 ～Thymosin $\beta$ -4 との比較検討～

第100回日本病理学会総会

2011/4/28-30, パシフィコ横浜・会議センター (神奈川)

- ② 小林家吉、清島 保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆

Thymosin beta 4 のノックダウンによる歯原性細胞の変化について

第100回日本病理学会総会

2011/4/28-30, パシフィコ横浜・会議センター  
(神奈川)

- ③ 和田 裕子、清島 保、小林 家吉、藤原弘明、坂井 英隆

Soft tissue tumour of the lower lip

第22回日本臨床口腔病理学会、第5回アジア口腔病理学会

2011/8/23-25, 福岡歯科大学主催

九州大学(福岡)

- ④ 古庄 克宏、和田 裕子、清島 保、小林家吉、永田 健吾、藤原 弘明、塩塚 真帆、坂井 英隆

癌治療用アポトーシス誘導ベクターの作成と導入の試み

第53回歯科基礎医学会学術大会・総会

2011/9/30-10/1, 長良川国際会議場(岐阜)

- ⑤ 和田裕子、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、塩塚真帆、坂井英隆

Netrin-1 結合部位欠失 DCC 遺伝子導入による癌細胞のアポトーシス誘導

第101回日本病理学会総会

2012/4/26-28, 京王プラザホテル(東京)

- ⑥ 和田裕子、清島保、藤原弘明、坂井英隆

DCC 蛋白細胞内ドメインによるアポトーシス誘導機構の解析

第23回日本臨床口腔病理学会総会

2012/8/29-31, 東京医科歯科大学(東京)

- ⑦ 清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆

エナメル上皮腫における Thymosin  $\beta$ 4 の発現とその役割について

第54回歯科基礎医学会学術大会・総会

2012/9/14-16, 奥羽大学(福島)

- ⑧ 吉田寿人、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆

V-ATPase 阻害剤 Concanamycin A による口腔扁平上皮の細胞死誘導について

第54回歯科基礎医学会学術大会・総会

2012/9/14-16, 奥羽大学(福島)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂井 英隆 (SAKAI HIDETAKA)

九州大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80136499

### (2) 研究分担者

清島 保 (KIYOSHIMA TAMOTSU)

九州大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：20264054

永田 健吾 (NAGATA KENGO)

九州大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90189134

和田 裕子 (WADA HIROKO)

九州大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70380706

小林 家吉 (KOBAYASHI IEYOSHI)

九州大学・大学院歯学研究科・准教授

(平成24年3月退職にて辞退)

研究者番号：40243951

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし