

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390548
 研究課題名 (和文) 口腔扁平上皮癌に対する個別化制限増殖型遺伝子治療法を目指した基礎的研究とその応用
 研究課題名 (英文) Study of tumor-specific oncolysis and anti-tumor efficacy for oral squamous cell carcinoma using vectors with selective replication.
 研究代表者
 大関 悟 (OZEKI SATORU)
 福岡歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：80117077

研究成果の概要：

本研究では、癌の遺伝子治療の向上を図るために標的分子候補の発現機構に基づいた標的細胞内特異的な導入遺伝子の発現や複製を目指し、口腔扁平上皮癌を対象に標的分子候補の発現機構、機能解析およびその周囲組織からの影響を検討した。まずは、腫瘍組織間で差別的発現を認めた SCCA、S100A7 や HP 1 などを標的候補因子とし、炎症性サイトカインシグナル機構および転写制御への影響の解明も行った。これら結果を踏まえて、口腔扁平上皮癌の個別化遺伝子治療開発の起点を築く。

交付額

(金額単位：20,020,000 円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2006 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学 (7406)

キーワード：口腔扁平上皮癌 標的分子 S100 蛋白 SCCA 個別化治療法

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍には病理組織学的に類似する腫瘍であっても、様々な抗癌剤の有効性や腫瘍の転移能等を呈することは多くの臨床医が経験する処である。そこで、患者個人の遺伝的体質に加え、腫瘍の後天的な遺伝子変異、発現異常等の個々の腫瘍の特性を反映させた癌の個別化治療戦略が必要となる。

癌遺伝子治療は、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視された。問題改善には、ベクター自体の改

良が求められ、標的の癌細胞への導入効率、導入遺伝子の選択的発現効率やベクター自体の癌特異的増幅効率を上昇させる工夫が重要となる。そこで、腫瘍特異性プロモーターや標的因子の機能解析を通して、ベクターの腫瘍特異的制限増幅や癌抑制遺伝子や自殺遺伝子などの治療用遺伝子を腫瘍特異性プロモーターで選択的に発現させる戦略が考えられる。これらの研鑽を重ねることは、正常細胞への影響の回避にも大いに期待できる。

そこで、我々が口腔領域で高頻度に出くわ

す扁平上皮癌を対象として検索することにした。九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座で樹立（研究代表者が樹立に関与）した細胞株 MISK81-5 から sMISK への aggressive な形質の変化過程に関与する分子機構の解明と標的分子候補の同定を目的に Suppression subtractive Hybridization にて差別的に発現している遺伝子群を検出、同定し、その遺伝子群を今回の標的分子候補と考え、これらの遺伝子発現機構解析による腫瘍特異的 cis-elements の同定を手始めに個々の腫瘍形質に応じた腫瘍特異的プロモーターの設計と腫瘍特異的 cis-elements のライブラリー化の礎への展開を図った。

2. 研究の目的

癌の遺伝子治療の向上を図るためには、癌組織特異的を有する標的分子の検出・同定やベクター自身に以下に示すような工夫が求められる。

- ① 標的細胞への指向性
- ② 細胞への導入効率の上昇
- ③ 導入遺伝子の特異的発現レベルの上昇
- ④ 長期間内の機能維持
- ⑤ 治療後の機能停止

また、ベクター本来の高い安全性やその他の性状を検討し、正常細胞への影響をできる限り回避することが重要となる。本研究では、標的分子候補の発現機構に基づいた標的細胞内特異的な導入遺伝子の発現レベルの上昇を図り、また過去のデータから予測される Epstein-Barr ウイルス (EBV) の口腔癌における抗腫瘍性に基づいて、以下の3点の実験を行ない、口腔扁平上皮癌の個別化遺伝子治療開発の起点とすることにした。

- (1) 口腔扁平上皮癌における標的分子の遺伝子発現機構の解析
- (2) 口腔扁平上皮癌における標的分子の機能解析
- (3) 口腔原発扁平上皮癌(口腔癌)遺伝子治療のベクターとして、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 型ベクターの開発（非ウイルスベクターの改良）

3. 研究の方法

上述の MISK81-5 とこの腫瘍組織から再クローニングされ、強い造腫瘍能を示す sMISK との間で Suppression subtractive Hybridization にて差別的発現を認めた遺伝子群には、Squamous cell carcinoma antigen (SCCA)、S100A7 や heterochromatin protein 1 (HP1) 等が検出、同定された。これらを本研究では、標的分子として取り扱った。

S100 ファミリーは類似構造を持つ多数の

蛋白からなるが、各々は組織特異性を有する。標的とした S100A7 蛋白は扁平上皮癌組織特異性を示す。また、S100 蛋白ファミリーの癌細胞の形質への関与が注目され、近年 S100A7 についても癌の形質への影響に関する研究がなされ出した。

SCCA は扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして使用されている。ただし、isoform があり、その機能機構の相違は詳細には解明されていない。

また、HP1 は、ヘテロクロマチン形成等へ関与することから癌細胞の形質に影響を及ぼすと考えられる。口腔扁平上皮癌における癌細胞の腫瘍形成における HP1 のエピジェネティック機能の影響に関する報告はほとんど見られていなかった。

さらに、癌組織には様々な遺伝子発現制御の異常が生じており、その異常は周囲の環境からの影響によって更に修飾される。近年、発癌や癌形質と炎症性サイトカインとの関係が注目される。また、先述の扁平上皮癌における S100A7 の発現機構においてもインターロイキン(IL)系の関与が見出され、そのシグナル機構および転写制御機構の解析を行った。

EBV の遺伝子発現様式は臓器によって異なるので、我々が捉えた口腔癌での EBV 遺伝子発現様式を基に治療用ベクターを設計することにある。感染初期発現蛋白の扁平上皮癌細胞内における機能解析は、口腔癌細胞内における EBV の複製能やアポトーシス誘発などの特性と副作用など明らかにする。

- (1) ①口腔扁平上皮癌細胞株において高発現を確認した S100A7 遺伝子プロモーターの転写活性機構の解析
②口腔扁平上皮癌細胞株における炎症性サイトカインシグナル経路の検索
- (2) ①口腔扁平上皮癌における SCCA の誘導細胞死に対する抵抗性への影響の検索
②HP1 α , β , γ の癌細胞形質への影響
- (3) Epstein-Barr ウイルス感染口腔原発扁平上皮癌の EBV 遺伝子発現様式による細胞形質への影響の検索

4. 研究成果

われわれは、頬粘膜原発扁平上皮癌の同一手術材料より腫瘍形成能の異なる細胞株を樹立した。その一つを MISK81-5 と名付け、

その細胞株のヌードマウス皮下移植では腫瘍形成が困難であった。しかし、移植1か月後に急速な腫瘍増大を認めた例があり、この腫瘍組織から再クローニングされた sMISK (survival MISK) は、強い造腫瘍能を示した。このように MISK81-5 から派生し、aggressive な形質をもつ sMISK へと変化した過程に生じた現象の把握ために Suppression subtractive Hybridization にて差別的に発現している遺伝子群を検出、同定した。

これらの中には (SCCA)、S100A7 や HP1 等が含まれていた。

(1) ① 口腔扁平上皮癌における S100A7 の遺伝子の転写活性機構の解析を試みた。

当教室で樹立した口腔扁平上皮癌組織由来の MISK81-5 と sMISK、他施設で樹立された口腔扁平上皮癌組織由来 HSC 系、胃癌組織由来 MKN 系、および角化細胞 HaCaT の各種細胞株を用いた。S100A7 遺伝子の発現を半定量 RT-PCR にて比較すると、扁平上皮癌細胞株で高発現が確認された。次いで HSC3 由来の genomic DNA から S100A7 遺伝子上流約 3.6kb をクローニングし、その塩基配列解析を行った。NCBI 登録の塩基配列との間で相違は認められなかった。この約 3.6kb DNA を基にし、様々な長さのプロモーターを有するレポータープラスミドを作成した。これらを用いた転写活性解析では、扁平上皮癌特異的に転写活性が上昇する領域が 3箇所認められた。また、その領域を部分欠失させると、転写活性の低下に差が見られた。さらに hetelogenous promoter (SV40 promoter) の上流に各領域を結合させると、転写活性が上昇した。これらの扁平上皮癌特異的な転写活性に影響させる領域をプローブとして Electrophoretic mobility shift assay を行うと、実験に用いた細胞種によって核蛋白-DNA 複合体の形成様式に相違が認められ、その中の 1つの複合体は扁平上皮癌細胞株にだけ観察された。

Figure 3

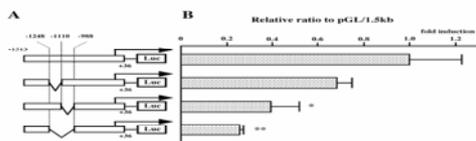
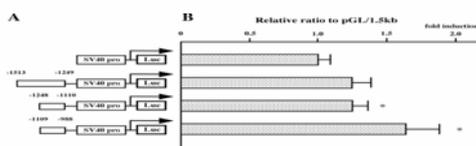


Figure 4



これらの結果より、S100A7 遺伝子発現において扁平上皮癌特異的な cis-element の存在を示唆する領域が認められ、その領域によって転写活性への影響が異なることが示唆された。

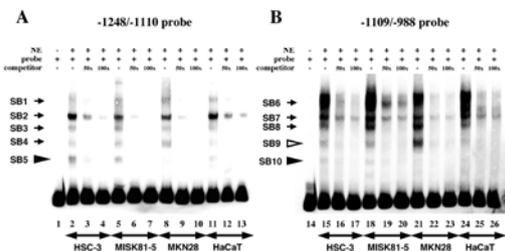
② 口腔扁平上皮癌細胞株における IL-22 のシグナル経路を比較検討した。IL-22 は IL-10 family に属するサイトカインとして近年見出された。しかし、その受容体の発現は特異的で、白血球では認められていないため、IL-22 は白血球間の情報伝達には機能せず、白血球から非白血球細胞への一方向のみの情報伝達で働く独特なサイトカインと考えられている。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 MISK81-5 における IL-10R2 および IL-22R1 の mRNA および蛋白発現を各々 RT-PCR および immunoblotting にて確認した。rIL-22 にて MISK81-5 を刺激すると、一過性に STAT3 のリン酸化を認め、刺激後 60 分には刺激前のレベルに戻った。免疫細胞化学染色にて rIL-22 刺激によるリン酸化 STAT3 の核内移動も確認された。また、rIL-22 により MAP キナーゼ (p38, ERK1/2 他) のリン酸化も誘導された。

しかし、IL-22 に対して反応しない口腔扁平上皮癌細胞株も認められた。

STAT3 結合部位 APRE 配列や他 CRE, ISRE 配列をもつ luciferase ベクターを口腔扁平上皮癌細胞株に遺伝子導入を行い、IL-22 他刺激による活性化を比較検討した。1の結果に準じた結果が得られ、活性化した因子の機能が証明された。しかし、追加して行った NF- κ B 活性化経路への反応は本実験誘導濃度

Figure 5



では認められなかった。

また、1の IL-22 による STAT 抑制因子である SOCS の発現変化を qRT-PCR にて検索し、誘導後 30 分に mRNA 発現の急増を確認した。

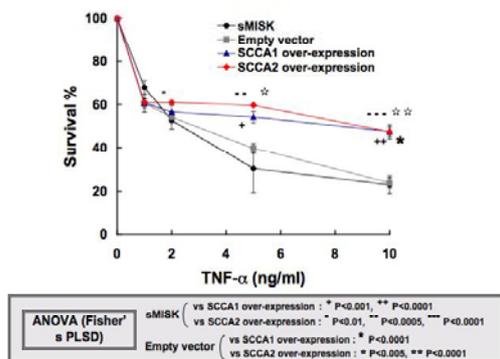
これらより、細胞増殖系の抑制と STAT 抑制因子の発現調節をより詳細に解明し、これを応用することによって目的とするベクター腫瘍特異的制限増幅や治療用遺伝子の選択的発現一助になると思われた。

(2) ① 扁平上皮癌特有に発現する血清マーカーとして Squamous cell carcinoma antigen (SCCA) は知られている。SCCA 遺伝子上には、塩基配列およびアミノ酸配列の相同性の高い SCCA1 と SCCA2 が前後に連なって存在しているが、それらは異なる機能を有するという。しかし、その詳細が不明な部分も多く残されている。そこで、口腔扁平上皮癌における SCCA の誘導細胞死に対する抵抗性

への影響を検索した。

口腔扁平上皮癌組織由来の MISK81-5、sMISK と他の口腔扁平上皮癌組織由来 HSC 系、胃癌組織由来 MKN 系、および角化細胞 HaCaT の各種細胞株を用い、SCCA1 および SCCA2 遺伝子の発現を半定量 RT-PCR にて比較すると、扁平上皮癌細胞株で高発現が確認された。しかし、その発現量は細胞株によって異なっていた。SCCA1 と SCCA2 の各遺伝子発現ベクターを sMISK に導入し、SCCA1 および 2 高発現細胞株を樹立した。それらに TNF- α による細胞死を誘導した際の細胞生存率を MTS assay で解析すると、SCCA1 および 2 遺伝子を導入した細胞ともに細胞生存率の上昇が見られた。

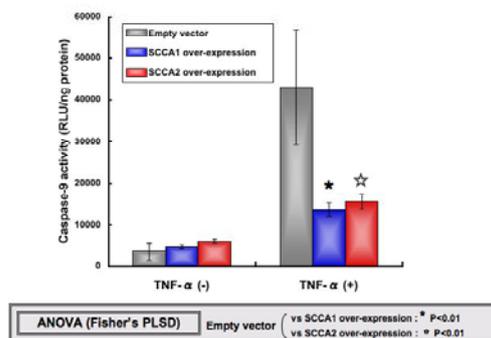
SCCA1、SCCA2 強制発現 sMISK の TNF- α 処理による生存率



さらに、シトクロム c の動態を免疫染色法と immunoblotting を用いて、またその下流に位置するカスパー 9 活性変化を検索した。TNF- α 未処理のコントロール群および遺伝子導入群ともにシトクロム c は細胞質内に顆粒状に観察された。TNF- α 処理したコントロール群ではシトクロム c の染色性が消失した。一方、SCCA1 および 2 遺伝子を導入した細胞ともに染色性が維持され、顆粒状の反応物の確認が出来た。Immunoblotting にて、TNF- α 処理したコントロール群では、シトクロム c のミトコンドリアから細胞質への放出が確認された。遺伝子導入群ではシトクロム c のミトコンドリア内局在が維持され、ミトコンドリアからの放出抑制が確認された。さらにカスパー 9 活性は、コントロール群では TNF- α 処理により上昇が見られたが、遺伝子導入群では共に活性上昇が抑制されていた。

これらの結果から、SCCA1 および 2 はミトコンドリアからのシトクロム c の放出抑制を介して口腔扁平上皮癌細胞株の TNF- α 誘導細胞死を抑制することが示唆された。

SCCA1、SCCA2 強制発現 sMISK の TNF- α 処理によるカスパー 9 の活性



②HP1 には α , β , γ があり、ヘテロクロマチン形成等への関与から癌細胞の形質に影響を及ぼすと考えられる。そこで、癌細胞の腫瘍形成における HP1 のエピジェネティック機能の解明を試みた。

HP1 mRNA の発現量の比較を行った処、HP1 γ mRNA 発現量は腫瘍細胞間にほとんど差が見られなかったが、HP1 α , β に関しては、細胞増殖能等が高い細胞株で低発現を認めた。細胞株による HP1 β の発現量のバラツキが大きかった。また、MISK81-5 と sMISK からクローニングした HP1 isoforms の塩基配列に変化は認められなかった。これらと他の結果を加味すると、HP1 α , β の発現量の変化が腫瘍細胞の形質に関与することが示され、HP1 γ の影響は少ないものと考えられた。

このように HP1 mRNA の発現量が、isoform による特徴がみられたことから、まず HP1 の N/C 末端に GFP を融合させた蛋白を扁平上皮癌細胞で発現させ、細胞内局在を観察した。いずれも核内へ移行し、DAPI 陽性域との重なりが観察され、GFP 融合によってヘテロクロマチンへの結合能の消失は認められなかった。

さらに過剰発現系、部分欠失蛋白発現系および発現抑制系を用いて HP1 isoform の変動による腫瘍細胞の形質変化への影響を検索した。過剰発現系では、増殖能、腫瘍形成能等に抑制的变化を見た。しかし、その変化は差別的発現をみた isoform の過剰発現させた場合であった。また、その isoform の部分欠失蛋白発現系では、増殖能、腫瘍形成能等に促進的变化をみた。

これらの所見から差別的発現をみた HP1 isoform が増殖能、腫瘍形成能へ影響を示すと考えられた。

(3)EBV は臓器によって遺伝子発現様式が異なるため、我々は口腔癌における EBV の生物学的特性を追求した処、興味有ることに EBV 陽性口腔癌症例は 80 か月間の追跡調査期間中に

一例も再発や死亡例を認めなかった。このことは、口腔癌にとってEBVは抗腫瘍効果を備えたウイルスと推測され、改変型EBVが口腔癌遺伝子治療用ベクターとして応用の可能性はないかという発想に至った。

また、EBVベクターの研究は、ほとんどリンパ球(B-cell)由来の腫瘍に対する治療を想定した*in vitro*の実験が主体である。EBV感染口腔癌細胞株を単離し、その細胞株のEBV遺伝子発現様式を検索した。

これらのEBV遺伝子発現様式は、上咽頭癌やホジキン病と類似し、II型に含まれるものだった。しかし、単離された細胞株はLMP-2Aや2Bを発現していなかった。

これらを用いてTUNEL陽性細胞数やcaspase 3遺伝子発現、active caspase 3陽性細胞等を検討したところ、EBV感染口腔癌細胞株は親株と比較して低値を示した。LMP-2Aの発現は、抗アポトーシスと関連していると言われているが、用いた細胞株にはLMP-2Aの発現は見られておらず、これらの機序については、今後も検討を要するものと思われる。

また、用いた細胞株にはCD21が発現しておらず、CD21を介さない感染経路が考えられていた。しかし、本研究中には解明できなかった。他施設でも同様に、胃癌ではあるが、癌細胞への感染経路の追究がなされているが、現在の処、解明に至っていないようである。

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7件)

Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF- α -induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in oral squamous cell carcinoma cell line.

Ken-ichiro Hashimoto, Tamotsu Kiyoshima, Kou Matsuo, Satoru Ozeki, Hidetaka Sakai
Tumor Biol., 26:165-172, 2005

Oral squamous cell carcinoma cells induce osteoclast differentiation by suppression of osteoprotegerin expression in osteoblasts.

Tada T, Jimi E, Okamoto M, Ozeki S, Okabe K.
Int J Cancer. 116(2): 253-262, 2005

Transcription promoter activity of the human S100A7 gene in oral squamous cell carcinoma cell lines.

Hideaki Fukuzawa, Tamotsu Kiyoshima, Ieyoshi Kobayashi, Satoru Ozeki, Hidetaka Sakai
Biochem. Biophys. Acta, 1759: 171-176, 2006

Involvement of Chemokine Receptor 4/Stromal Cell-derived Factor 1 System in Human Salivary Gland Carcinoma Motility.

Suzuki S, Maeda A, Miura M, Ozeki S.

Oral Science International. 3: 13-20, 2006

Sjören 症候群関連抗体が陽性であった頬粘膜小唾液腺由来 MALT リンパ腫の1例.

橋本憲一郎, 多田剛之, 福沢秀昭, 岡村和彦, 池邊哲朗, 大関悟.

日本口腔外科学会雑誌. 54: 493-497, 2008

Diffuse Large B-Cell Lymphoma Arising in the Submandibular Gland : A Case Report

Ken-ichiro Hashimoto, Tetsuro Ikebe, Satoru Ozeki

Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 20(1), 41-45, 2008

Dynamics of lymphatic vessels during nodal metastasis of oral malignant melanoma in mice.

Iwahashi T, Ohno J, Okamura K, Ozeki S, Taniguchi K.

Oral Med Pathol. 2008; 12: 47-52

[学会発表] (計12+2件)

SCCAはシトクロムc放出抑制により口腔扁平上皮癌細胞株のTNF- α 誘導細胞死を抑制する。

橋本 憲一郎, 清島 保, 松尾 拓, 小林 家吉, 坂井 英隆

第94回 日本病理学会総会 平成17年4月14-16日 横浜

口腔扁平上皮癌細胞株のSCCA発現による細胞死抑制経路の検討-SCCAがシトクロムc放出に与える影響

橋本憲一郎, 福沢秀昭, 大関悟.

第29回日本頭頸部癌学会総会, 2005年6月東京

扁平上皮癌におけるS100A7遺伝子の発現抑制

清島保, 小林家吉, 坂井英隆

第47回歯科基礎医学会総会 平成17年9月 仙台

S100A7の扁平上皮癌における発現調節機構の解析

福沢秀昭, 清島保, 橋本憲一郎, 前田顕之, 小林家吉, 坂井英隆, 大関悟

第50回日本口腔外科学会総会, 平成17年10月大阪

Analysis of S100A7 on regulation of expression mechanism of the gene in squamous cell carcinoma.

Fukuzawa H. , Ozeki S.

17th International Conference of Oral &

Maxillofacial Surgery, 2005Nov. 1st. (Vienna)

口腔扁平上皮癌細胞株におけるS100A7遺伝子プロモーターの転写活性機構の解析
清島保、小林家吉、坂井英隆
第95回日本病理学会総会、平成18年5月、東京

Transcriptional Regulation of S100A7 in Oral Squamous Cell Carcinoma

Tamotsu Kiyoshima, Ieyoshi Kobayashi, Keiko Takahashi and Hidetaka Sakai
The International Association for Dental Research (84th), June 28-July 1, 2006, Australia (Brisbane)

Involvement of chemokine Receptor 4/stromal cell-derived factor 1 System in human salivary gland carcinoma cell motility.

Sachiya Suzuki, Takeyuki Tada, Kenichiro Hashimoto, Satoru Ozeki.

The 47th Congress of the Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons. 21. Apr. 2006. (Seoul, Korea)

Squamous cell carcinoma antigens, SCCA1 and SCCA2, inhibit TNF-alpha-induced cell death by suppression of cytochrome c release from mitochondria.

Kenichiro Hashimoto, Tamotsu Kiyoshima, Ieyoshi Kobayashi, Hidetaka Sakai, Tetsuro Ikebe, Satoru Ozeki.

The 47th Congress of the Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons. 21. Apr. 2006. (Seoul, Korea)

A study on the mechanism of osteoclastic differentiation and bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells.

Takeyuki Tada, Eijirou Jimi, Koji Okabe, Tetsuro Ikebe, Satoru Ozeki.

The 47th Congress of the Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons. 21. Apr. 2006. (Seoul, Korea)

唾液腺腫瘍におけるケモカインレセプター-CXCR4の発現.

鈴木祐社, 前田顕之, 豊田正仰, 池邊哲郎, 大関悟.

第30回日本頭頸部癌学会, 2006.6.15. 大阪

Interleukin-22 (IL-22) Signal Transduction in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell line

清島保、坂井英隆

第85回九大病理研究 平成20年12月 福岡

<演題既申込分>

STAT3 signal transduction in squamous cell carcinoma stimulated by IL-22

L. NAHER, T. KIYOSHIMA, H. FUJIHARA, I. KOBAYASHI, K. NAGATA, K. FUKIWAKE, Y. OOKUMA, S. NAKAMURA, and H. SAKAI
the 87th IADR/AADR, 平成21年4月, USA

ヒト口腔上皮癌における IL-22 シグナル伝達経路

清島保、小林家吉、坂井英隆

第98回日本病理学会総会 平成21年5月1-3日 京都

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大関 悟(OZEKI SATORU)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号:80117077

(2)研究分担者

前田 顕之(MAEDA AKIYUKI)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号:70333242

内田 竜司(UCHIDA RYUJI)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号:00369042

橋本 憲一郎(HASHIMOTO KEN-ICHRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号:00412619

岡村 和彦(OKAMURA KAZUHIKO)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号:00224056

清島 保(KIYOSHIMA TAMOTSU)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号:20264054

(3)連携研究者

(なし)