

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11689

研究課題名(和文) 金属結合タンパク質の発現制御による舌癌治療基盤の構築

研究課題名(英文) Foundation of medical treatment for tongue cancer by the regulation of metal-binding protein

研究代表者

十川 紀夫 (Sogawa, Norio)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30236153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：舌癌の治療基盤を構築するため、扁平上皮に特異的に発現する細胞内亜鉛調節タンパク質MT-4を制御することによる癌細胞増殖への影響を検討するとともに、MT-4の誘導因子と細胞内相互作用因子を探索した。

その結果、亜鉛感受性とMT-4遺伝子導入による細胞増殖抑制との間に関連性が認められ、亜鉛感受性細胞では、MT-4発現増加により細胞増殖が抑制されることが明らかになった。また、MT-4はグルココルチコイドにより発現誘導されること、およびMT-4自体が何らかのタンパク質発現誘導に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の推進により、細胞内亜鉛濃度の維持・調節に重要なMT、特にMT-4の発現を制御することで亜鉛感受性扁平上皮癌細胞の増殖制御が可能であることが明らかになった。これは、細胞内亜鉛濃度調節タンパク質のアイソフォーム別機能とそれらの発現調節という新たな視点から、扁平上皮癌の新規治療法の基盤を構築する上で、重要な知見であると考えられる。特に、治療対象とする口腔扁平上皮癌は、歯科・口腔外科領域において非常に重要な疾患であり、また、外部からの治療アプローチが可能であるという特性も備えていることから、遺伝子導入など新たな機序による抗悪性腫瘍薬開発に繋がる可能性を示す研究結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to construct a foundation of medical treatment for tongue cancer, it was investigated the influence of the regulation of MT-4 expression on cancer cell growth, an intracellular zinc ion regulating protein expressed specifically in squamous epithelium. Moreover, it was explored the inducers of MT-4 gene expression and intracellular interacted factor with MT-4 protein.

As the results, it was revealed that the zinc sensitivity was associated with cell proliferation of cancer, and zinc sensitive cancer cells decreased the cell proliferation by MT-4 gene introduction. Moreover, it was suggested that MT-4 gene expression was induced by glucocorticoids and MT-4 was related with gene expression by itself.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：metallothionein 舌癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は DNA 合成酵素やマトリックスメタロプロテアーゼなど、70 種類以上の金属酵素の活性中心をなしており、タンパク質構造の維持および酵素活性の制御や、細胞の代謝などにおいて非常に重要な金属である。さらに、転写因子等の DNA 結合タンパク質は、亜鉛イオン結合性のモチーフを介して DNA に結合していると考えられており、亜鉛の欠乏は DNA の複写などにも影響を与える。このため、亜鉛は発癌を始めとして、癌の増殖および転移に関与している可能性が示唆されているが、癌細胞内における亜鉛動態については不明確な部分が多い。

一方、メタロチオネイン(MT)は、約 60 個のアミノ酸からなる低分子量の金属結合タンパク質であり、特徴的に分子内にシステイン残基を多く有することから、システインのチオール基を介して亜鉛と結合し、生体亜鉛濃度の恒常性維持と調節に関わっていると考えられている。

これまで、MTには4つのアイソフォーム(MT-1, MT-2, MT-3, MT-4)が報告されており、近年、癌の生態との関連において、これら MT アイソフォームに着目した研究が報告され始めた。

ところで、正常細胞と舌癌細胞における MT 発現を比較したこれまでの報告から、MT-4 は発癌あるいは増殖に、MT-1 および MT-3 は発癌および転移に関与している可能性が示唆される。しかし、これらの報告は変化を解析したにすぎず、報告された変化(MT-1, MT-3, MT-4)が癌化や増殖、転移の原因なのか結果なのかを含め、作用機序などの詳細は未だ明らかになっていない。

申請者らは最近、MT-4 のプロモーター領域を詳細に解析し、MT-4 が癌抑制遺伝子 p53 により誘導されることを見出した(未発表)。これは舌癌細胞で MT-4 が減少するとの知見と一致し、さらに p53 シグナルの下流に MT-4 を介した作用機構が存在すること、すなわち、MT-4 が発癌の抑制に関わっている可能性を示す。しかし、MT が発癌過程に関わるとの報告はこれまでに無く、また、MT-4 が生体内で連関するタンパク質に関する情報も報告されていない。

2. 研究の目的

亜鉛の細胞内動態が癌の発症(発癌)、増殖および転移に関与している可能性が示唆されている。しかし、その詳細は明らかではない。一方、メタロチオネイン(MT)は、生体内で亜鉛などの金属イオンと結合しており、生体亜鉛濃度の恒常性維持と調節に重要な金属結合タンパク質である。申請者らは、MT のアイソフォーム(MT-4)が癌抑制遺伝子 p53 で誘導されることを見出したが、これは MT-4 が p53 シグナルの 1 つである可能性を示唆し、直接的、間接的に癌の発症、増殖、転移に関与する可能性を示す。したがって、本研究は細胞内亜鉛濃度の維持・調節に重要な MT の発現、特に MT-4 を制御することによる舌癌の発症および増殖への影響を検討し、MT 発現制御による舌癌治療への応用基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

-1 ヒト扁平上皮癌細胞増殖に対するヒト MT-4 遺伝子導入の影響

実験には、3種のヒト舌癌由来細胞(HSC-2, HSC-3, HSC-4)、およびヒト歯肉癌由来細胞(Ca9-22)を用いた。扁平上皮癌細胞(2×10^4 cells/well/0.5mL medium [D-MEM, 10%FCS])を24wellプレートに播種した。播種翌日、pcDNA3 にヒト MT-4 翻訳領域 cDNA を挿入して作成した MT-4 発現ベクターをリポフェクション法(FuGENE6 Transfection Reagent, プロメガ株式会社)を用いて遺伝子導入した。対照群には pcDNA3 ベクターを導入した。細胞増殖は遺伝子導入72時間後に MTT 法(Cell counting Kit-8, 同仁化学研究所)で評価した。

-2 ヒト扁平上皮癌細胞増殖に対する亜鉛の影響

実験には、3種のヒト舌癌由来細胞(HSC-2, HSC-3, HSC-4)、およびヒト歯肉癌由来細胞(Ca9-22)を用いた。扁平上皮癌細胞(2×10^4 cells/well/0.5mL medium [D-MEM, 10%FCS])を24wellプレートに播種した。播種2日後(MT-4 遺伝子を導入する場合は、導入24時間後)に、塩化亜鉛(最終濃度 100 μ M)を添加した。細胞増殖は塩化亜鉛添加48時間後に MTT 法(Cell counting Kit-8, 同仁化学研究所)で評価した。

グルココルチコイドによる MT-4 遺伝子発現誘導

ヒト MT-4 プロモーター領域 1.5Kb を精査したところ、2つのグルココルチコイド応答領域(GRE)の存在が示唆されたため、ヒト MT-4 プロモーター領域 1.5Kb をレポーター遺伝子ベクターのマルチクローニングサイトに組み込み、グルココルチコイドによる MT-4 遺伝子発現誘導をレポーターアッセイで検討した。また、上流 GRE を欠失したコンストラクトを作成し、上流 GRE の影響を検討した。

MT-4 と相互作用する因子の解明

MT-4 と相互作用する因子は、DNA 結合タンパク質にヒト MT-4 翻訳領域 cDNA を結合して作成した融合プラスミドを用い、lacZ 遺伝子の転写活性を指標とした酵母 Two-hybrid 法を用いて検討した。

4. 研究成果

ヒト扁平上皮癌細胞増殖に対するヒト MT-4 遺伝子導入および亜鉛の影響

ヒト歯肉癌由来細胞(Ca9-22)は,MT-4 遺伝子導入により細胞増殖が抑制された。しかし,ヒト舌癌由来細胞(HSC-2, HSC-3, HSC-4)では,いずれの細胞においても MT-4 遺伝子導入による細胞増殖への影響は認められなかった。

一方, Ca9-22 では塩化亜鉛添加により細胞増殖が抑制されたが, HSC-2, HSC-3, HSC-4 において,塩化亜鉛添加による細胞増殖の影響は認められなかった。

亜鉛感受性を有する細胞では,MT-4 遺伝子導入により細胞増殖が抑制されたが,亜鉛感受性を有しない細胞では,MT-4 遺伝子を導入しても,細胞増殖に影響は認められなかった。今回の結果は,由来が異なるこれら 2 種の癌細胞において,亜鉛トランスポーターなど細胞内亜鉛シグナル調節機構に違いがあることを示していると考えられた。

グルココルチコイドによる MT-4 遺伝子発現誘導

上流 GRE と下流 GRE を共に含むプロモーター領域 1.5Kb では,コルチコステロン(CORT)あるいはデキサメタゾン(DEX)添加によりルシフェラーゼ活性は増加した。しかし,下流 GRE を含む 0.8Kb フラグメントでは,CORT あるいは DEX によるルシフェラーゼ活性の増加は認められず,同様に下流 GRE を含む 1.1Kb フラグメントでも,CORT によるルシフェラーゼ活性の増加は認められなかった。さらに,上流 GRE 相当部を削除した改変 1.5Kb フラグメントによっても,CORT によるルシフェラーゼ活性の増加は認められなかった。一方,0.8Kb フラグメントにおける CORT 無添加のルシフェラーゼ活性は 1.5Kb フラグメントと比べ増加したが,1.1Kb フラグメントでは同等であり,上流 GRE 相当部を削除した改変 1.5Kb フラグメントでは,逆に 1.5Kb フラグメントと比べ減少した。

以上の結果より,グルココルチコイド応答に上流 GRE が必要であること,および,今回削除した上流 GRE 相当部に自発的な MT-4 プロモーター活性が,0.8Kb と 1.1Kb フラグメント間にサイレンサー領域の存在が示唆された。

MT-4 と相互作用する因子の解明

酵母 Two-hybrid 法での検討により MT-4 自身による偽陽性反応が認められた。このことは,MT-4 が転写因として作用しているのか,転写因子の応答を促進するのかについては不明であるが,MT-4 が何らかの遺伝子の転写を促進する可能性を示していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sogawa Chiharu, Eguchi Takanori, Okusha Yuka, Ono Kisho, Ohyama Kazumi, Iizuka Motoharu, Kawasaki Ryu, Hamada Yusaku, Takigawa Masaharu, Sogawa Norio, Okamoto Kuniaki, Kozaki Ken-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 A reporter system evaluates tumorigenesis, metastasis, -catenin/MMP regulation, and druggability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2018.0348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chiharu Sogawa, Takanori Eguchi, Yuka Okusha, Keisuke Nakano, Yuri Namba, Kazumi Ohyama, Norio Sogawa, Ken-ichi Kozaki, Kuniaki Okamoto
2. 発表標題 Establishment of high metastatic evolved clone of adenocarcinoma cells with Mmp9 promoter-driven fluorescence reporter
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiharu Sogawa, Takanori Eguchi, Yuka Okusha, Kazumi Ohyama, Kisho Ono, Norio Sogawa, Kuniaki Okamoto
2. 発表標題 Drug repositioning using three-dimensional, MMP9 promoter activity-based anticancer drug screening
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村泰弘, 十川千春, 宮崎育子, 浅沼幹人, 十川紀夫
2. 発表標題 グルココルチコイドによる金属結合蛋白質metallothionein-4の誘導
3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今村泰弘, 十川千春, 荒 敏昭, 十川紀夫
2. 発表標題 Metallothionein-4のグルココルチコイド応答領域
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 十川紀夫, 十川千春, 宮崎育子, 浅沼幹人, 今村泰弘
2. 発表標題 グルココルチコイドによるMT-IVの発現制御
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 泰弘 (Imamura Yasuhiro) (00339136)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	
研究分担者	十川 千春 (Sogawa Chiharu) (10253022)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	落合 隆永 (Ochiai Takanaga) (20410417)	朝日大学・歯学部・准教授 (33703)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮崎 育子 (Miyazaki Ikuko) (40335633)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究 分 担 者	荒 敏昭 (Ara Toshiaki) (90387423)	松本歯科大学・歯学部・准教授 (33602)	