

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390523

研究課題名 (和文) テーラーメイド口腔癌治療を目指した基礎的および臨床的研究

研究課題名 (英文) The basic and clinical study for the personalized oral cancer therapy

研究代表者

福田 正勝 (FUKUDA MASAKATSU)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：10311614

研究成果の概要 (和文)：口腔癌の中心的原因のひとつである *p53* 遺伝子変異は、30～50%の症例において認められている。また、核内転写因子 NF- $\kappa$ B はアポトーシスを抑制する作用をもち、癌化に深く関与することが知られているが、最近になって NF- $\kappa$ B の機能は *p53* 遺伝子によって調節されていることが解った。さらに *p53* の co-factor として知られる ING ファミリーが *p53* 依存性アポトーシス誘導に重要な働きをしていることが明らかとなった。本研究において *p53* 癌抑制遺伝子の明らかな変異が認められた口腔癌の組織サンプルにおいて、*p33*<sup>ING1b</sup> 発現の消失傾向を認め、反対に同サンプルにおいて NF- $\kappa$ B 発現の増大傾向を認めた。なお、頭頸部悪性腫瘍細胞株 (HSC-3, KB 細胞) においても同様の傾向が確認された。さらに *p53* 正常株である KB 細胞に対して *p33*<sup>ING1b</sup> 遺伝子の形質導入を行い、抗癌剤 (タキソール) を時間と濃度を変えて作用させた際の細胞の増殖阻害効果を検索した。その結果、タキソールの作用により明らかに細胞死に陥ったことを確認した。

研究成果の概要 (英文)：Human oral squamous cell carcinoma (HOSCC) is the most common malignant tumor in the oral cavity, and that frequent alteration of *p53* tumor suppressor gene is associated with the development of HOSCC, especially in 30% to 50% of that. The *p33*<sup>ING1b</sup> has a close relationship with *p53* and that neither *p53* nor *p33*<sup>ING1b</sup> alone can cause cell growth inhibition, which prompted us to investigate their potential role in oral carcinogenesis. Furthermore, Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) has key roles in inflammation, immune response, tumorigenesis and protection against apoptosis. It has recently been reported that the function of NF- $\kappa$ B is regulated by *p53*. In this study, to determine whether the *p33*<sup>ING1b</sup> isoform plays a role in chemosensitivity of HOSCC, we investigated the effect of *p33*<sup>ING1b</sup> overexpression on taxol-induced apoptosis and the activation of caspases in HOSCC cells. Previous experimental evidences indicated that *p33*<sup>ING1b</sup> functionally cooperates with *p53* in controlling cell growth, senescence and apoptosis. The *p33*<sup>ING1b</sup> may cooperate with *p53* in taxol-induced apoptosis of the HOSCC. To test this hypothesis, the HOSCC

cell lines, contained wild-type p53 and mutant p53, were employed to examine the enhancement of apoptosis by p33<sup>ING1b</sup> overexpression and its mechanism. We found that overexpression of exogenous p33<sup>ING1b</sup> in wild-type p53 cell line can dramatically promote taxol-induced apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：頭頸部悪性腫瘍，遺伝子変異，NF-κB，p53/ING，アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

ras 遺伝子の点突然変異の発見をきっかけに，分子生物学的手法が癌研究においても駆使され，今や癌は遺伝子変異に基づくものとして認識されるに至っている．口腔癌も例外ではなく，その中心的存在のひとつである p53 遺伝子変異は，30～50%の症例において認められている．われわれの研究からも口腔癌原発巣において3分の1の例で p53 遺伝子変異を認めている (Oral Oncol. IV, 1995, J. Pathol. 178, 1996, 日本癌学会, 2004)．転写因子 NF-κB はアポトーシスを抑制する作用をもち，癌化に深く関与することが知られているが，最近になって NF-κB の機能は p53 遺伝子によって調節されていることが解った (日本癌学会, 2005)．さらに p53 の co-factor として知られる ING ファミリーが p53 依存性アポトーシス誘導に重要な働きをしていることが明らかとなった (日本癌学会, 2006)．

近年，p53 蛋白のリン酸化を通じた細胞の G1 停止やアポトーシスの機構が明らかにな

りつつある．DNA にダメージをもたらすような放射線，抗癌剤は野生型 p53 を有する癌細胞に対して p53 依存性アポトーシスを生じさせることが知られており，p53 遺伝子変異の有無が，個々の患者における放射線および化学療法の効果の違いを生み出す大きな因子であることが想定される．このことは 遺伝子変異のあり方が一様でない個々の癌にあわせた効果的療法の必然性を考えさせる．一方，我々の予備実験から，野生型 p53 蛋白の機能が抑制されているヒト乳頭腫ウイルス (HPV)18 型感染扁平上皮癌株 KB でもアクチノマイシン D によりアポトーシスが生ずることが認められ，HPV 由来の遺伝子が高率に同定される口腔扁平上皮癌に対する効果的化学療法の可能性が推測される．

### 2. 研究の目的

口腔癌の中心的原因のひとつである p53 遺伝子変異は，30～50%の症例において認められている．また，転写因子 NF-κB はアポトーシスを抑制する作用をもち，癌化に深く関与

することが知られているが、最近になって NF- $\kappa$ B の機能は p53 遺伝子によって調節されていることが解った。さらに p53 の co-factor として知られる ING ファミリーが p53 依存性 アポトーシス誘導に重要な働きをしていることが明らかとなった。ING ファミリーは、核移行シグナル等のモチーフを持つ核タンパク質で、様々な遺伝子の転写活性を制御し、その生理機能を発揮する。癌細胞において高率に ING の発現低下・消失が認められるが、遺伝子変異の頻度は低く、また多彩な生理機能を有し細胞増殖を負に制御する。そこで申請者らは、NF- $\kappa$ B のシグナル伝達制御を介した腫瘍の増殖・浸潤メカニズムの解析および p53/ING をターゲットとした頭頸部悪性腫瘍の治療戦略を提案し、その研究開発により頭頸部領域の悪性腫瘍に対する効果的な個人別、いわゆるテーラーメイド口腔癌治療の確立を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) p53/ING をターゲットとした頭頸部悪性腫瘍の増殖・浸潤メカニズムの解析と応用

多数の頭頸部扁平上皮癌組織を用いて以下の実験を行う。

・すべての試料において、ホルマリン固定パラフィン包埋材料を作製し、HE 染色標本にて病理診断を行う。さらに抗 p53 抗体および ING 抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い、その局在を確認する。これらの結果と個々の症例の臨床病態像との関連について統計学的な解析を行う。

・ヒト頭頸部扁平上皮癌のモデルとして樹立されたヒト頭頸部扁平上皮癌培養株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および KB を用い、in vitro の系で研究を行う。まず p53/ING の遺伝子レベルでの発現状況を RNA 抽出後、

RT-PCR 法にて確認し、Real time PCR 法により定量する。次に p53/ING の蛋白レベルでの発現状況を各腫瘍細胞より蛋白抽出・濃度測定後、Western blot 法により定量する。さらに ING の発現低下または消失が認められた腫瘍細胞株に対して ING 遺伝子のトランスフェクトを行い、ING を過剰発現させた状態で抗癌剤 (CDDP, PEP, 5-FU, MTX, パクリタキセル等) を時間と濃度を変えて作用させたときの腫瘍細胞の細胞増殖阻害効果を MTT 法および caspase3, 7, 8, 9 をターゲットとした Western blot 法により検討する。

・p53 蛋白発現の有無および ING 蛋白発現の有無と抗癌剤の効果について、その有効性を形態的、組織学的に検討する。

#### (2) 腫瘍抑制遺伝子 p53 の変異検索と NF- $\kappa$ B 活性の解析およびその抑制

多数の頭頸部扁平上皮癌組織を用いて以下の実験を行う。

・HE 染色標本にて確定診断されたすべての試料のホルマリン固定パラフィン包埋材料から薄切切片を作製し、腫瘍部分よりマイクロダイセクション法にて DNA を抽出する。Gene bank より、あらかじめ p53 遺伝子の全塩基配列を抽出しておく。p53 遺伝子変異の hot region と呼ばれる exon 5-8 についてプライマー塩基配列を設定、作成し、PCR-SSCP にて変異の有無をスクリーニングする (現有の SSCP ゲル電気泳動システム使用)。変異を認めた exon については、direct sequencing (本学所有) を行い、変異部位を特定する。さらに p53 の遺伝子変異した扁平上皮癌組織において抗 NF- $\kappa$ B 抗体による免

疫染色を行い、*p53* 遺伝子変異を起こしていない組織と染色態度を比較する。

・ヒト頭頸部扁平上皮癌培養株 HSC-2, -3, -4, Ca9-22 および KB から、それぞれ DNA を抽出し同様に PCR-SSCP にて *p53* 遺伝子変異の有無をスクリーニングする。変異を認めた exon については、direct sequencing を行い、変異部位を特定する。*p53* の遺伝子変異を示した細胞株に TNF- $\alpha$  を作用させた上で、プロテオエキストラクトキットを用いて蛋白抽出を行い、NF- $\kappa$ B の細胞質から核への移行動態を解析する。これにより実際に NF- $\kappa$ B の活性化が起こって細胞質から核に移行する事が証明できる。また核に移行した NF- $\kappa$ B 遺伝子の発現量が、増強しているか否か確かめるためにリアルタイム PCR 解析(今回申請)を行い、さらに DNA と結合した NF- $\kappa$ B が活性化して機能しているか否か証明するためにルシフェラーゼレポーターアッセイ(既存のアッセイシステム使用)を行う。

・このようにして TNF- $\alpha$  を作用させた時に NF- $\kappa$ B の活性化が証明された培養株に、シメチジンおよびアスピリンをそれぞれ濃度と時間を変えて作用させたときの NF- $\kappa$ B の活性動態を同様に解析する。さらにシメチジンおよびアスピリンの作用で NF- $\kappa$ B の活性阻害が起これば、アポトーシスが誘導されるため、DNA fragmentation assay および caspase の活性化測定により、アポトーシスの状態を確認する。

設備備品費で申請したリアルタイム PCR 解析システムは、ターゲット遺伝子が実際に局所で発現増強し機能している状態を薬剤刺

激後リアルタイムに蛍光の強度の違いにより測定する、高感度な測定器であり、本研究課題の遂行に必要である。

この基礎的研究に対しては、すでに組織されている明海大学歯学部倫理委員会の規定に従い、サンプルの提供者、その家族、その他関係者の人権および利益の保護に十分配慮した上で執り行う。

#### 4. 研究成果

(1) HE 染色標本にて病理確定診断を得た、トータル 40 例の頭頸部扁平上皮癌の生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて、抗 *p53* 抗体および抗 *p33ING1b* 抗体による免疫組織化学的検索を行い、その局在を確認するとともに、腫瘍部分より microdissection 法にて DNA を抽出し、*p53* 遺伝子変異の hot region (exon 5-8) について PCR-SSCP にて変異の有無をスクリーニングし、変異を認めた exon について direct sequencing にて変異部位を特定した。さらに *p53* の遺伝子変異した扁平上皮癌組織において抗 NF- $\kappa$ B 抗体による免疫染色を行った。これらの結果から *p53* 遺伝子の明らかな変異が認められたサンプルにおいて、*p33ING1b* 発現の消失傾向を認め、反対に同サンプルにおいて NF- $\kappa$ B 発現の増大傾向を認めた。

(2) 5 種類の頭頸部悪性腫瘍細胞株 (HSC-2, -3, -4, Ca9-22, KB 細胞) を用い、*p33ING1b* 遺伝子およびタンパク質の発現状況を検索したところ、いずれの細胞においても自発的な発現を認めた。さらに Real time RT-PCR (qRT-PCR) 法により *p33ING1b* 遺伝子の発現量の検索を行ったところ、HSC-3 細胞において最も低く、KB 細胞において最も高い発現量を示した。各細胞株について *p53* 遺伝子変異の検索を行ったところ、KB 細胞のみが *p53*

Wild Type であった。そこで HSC-3 および KB 細胞に TNF- $\alpha$  を作用させた上で、NF- $\kappa$ B 遺伝子の発現量が増強しているか否か確かめるために qRT-PCR 解析を行った。この結果、KB 細胞においては TNF- $\alpha$  刺激後 30 分で NF- $\kappa$ B 発現量のピークを迎え、その後徐々に減少した。ところが HSC-3 細胞においては著名な NF- $\kappa$ B 発現を認めたが、減少は認められなかった。

(3)p53 Wild Type であった KB 細胞に対して p33ING1b 遺伝子の形質導入を行い、Western blot 法にて確認した後、タキソールおよびシメチジンを時間と濃度を変えて作用させた際の KB 細胞および p33ING1b 導入 KB 細胞の増殖阻害効果を比較検討するために Western blot 法により Caspase の活性化を検索した。その結果、KB 細胞に比べ p33ING1b 導入 KB 細胞においてタキソール処理後 6 時間で濃度依存的に著名な Caspase-3, Caspase-7 および Caspase-8 の活性化によりアポトーシスに陥ったことを確認した。メチジン処理後 6 時間の細胞においては Caspase-9 の活性化のみが検出された。

#### 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)

- ① MASAKATSU FUKUDA, MASAHIRO EHARA, SEIJI SUZUKI, YOSHIHIRO OHMORI and HIDEAKI SAKASHITA: IL-23 promotes growth and proliferation in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. International Journal of Oncology, 査読有り, in press, 2010.
- ② FUKUDA Masakatsu, SAKASHITA Hideaki: Tumor suppressor p33<sup>ING1b</sup> enhances taxol-induced apoptosis in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. Hospital

Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery, 査読有り, 21. 2: 91-96, 2010.

- ③ FUKUDA Masakatsu, SAKASHITA Hideaki: Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Hospital Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery, 査読有り, 21. 2: 85-90, 2010.
- ④ Masakatsu Fukuda, Masahiro Ehara, Seiji Suzuki, Hideaki Sakashita : Interleukin-23 and its receptors expression in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. Molecular Medicine Reports, 査読有り, 3: 89-93, 2010.
- ⑤ Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama, Hideaki Sakashita: Cimetidine inhibits salivary gland tumor cell adhesion to neural cells and induces apoptosis by blocking NCAM expression. BMC Cancer, 査読有り, 8(1): 376, 2008.
- ⑥ Fukuda M., Hiroi M., Suzuki S., Ohmori Y. and Sakashita H. : Loss of CYLD might be associated with development of salivary gland tumors. Oncol. Rep., 査読有り, 19: 1421-1427, 2008.
- ⑦ 南 弘子・福田正勝・草間 薫・坂下英明 : 唾液腺悪性腫瘍の増殖・進展メカニズムに関する研究-cimetidine の及ぼす影響について-. 日本口腔科学会雑誌, 査読有り ; 第 56 巻第 3 号、p263-274, 2007.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 福田正勝, 奥 結香, 鈴木正二, 坂下英明 : 口腔扁平上皮癌における hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) の発現について. 第 54 回日本口腔外科学会学術総会 2009 年 10 月 9 日-11 日 : 札幌コンベンションセンター.
- ② Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama and Hideaki Sakashita: Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in squamous cell

- carcinoma of the oral cavity. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日：パシフィコ横浜
- ③ Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama and Hideaki Sakashita: Interleukin (IL)-23 promotes growth and proliferating activity of head and neck cancer. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日：名古屋国際会議場.
- ④ 福田正勝, 中野みゆき, 鈴木正二, 草間薫, 坂下英明: Interleukin (IL)-23 は口腔癌の成長および増殖活性を促進する. 第 53 回日本口腔外科学会学術総会 2008 年 10 月 20 日～21 日：アスティ徳島.
- ⑤ Masakatsu Fukuda, Yuka Oku, Seiji Suzuki, Kaoru Kusama and Hideaki Sakashita: CYLD regulates NF- $\kappa$ B and its related factors expression in salivary gland tumors. 89<sup>th</sup> AAOMS Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition in conjunction with the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons and the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Hawaii Convention Center; October 8 - 13, 2007; Honolulu, Hawaii.
- ⑥ Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama and Hideaki Sakashita: Cimetidine Inhibits Salivary Gland Tumor Cell Adhesion to Neural Cells and Induces Apoptosis by Blocking NCAM Expression. 第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3-5 日：パシフィコ横浜
- ⑦ 福田正勝, 奥結香, 鈴木正二, 草間薫, 坂下英明: CYLD は唾液腺腫瘍における NF- $\kappa$ B とその関連因子の発現を調節する. 第 52 回日本口腔外科学会学術総会 2007 年 9 月 29 日～30 日：名古屋国際会議場.
- ⑧ Masakatsu Fukuda, Seiji Suzuki, Kaoru

Kusama and Hideaki Sakashita: CYLD regulates NF- $\kappa$ B-related factors expression in salivary gland tumors. 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology (ICMI): July 9-July 12, 2007: Tokyo, Japan.

[図書] (計 0 件)  
[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福田 正勝 (FUKUDA MASAKATSU)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号：10311614

##### (2) 研究分担者

草間 薫 (KUSAMA KAORU)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号：20130479

坂下 英明 (SAKASHITA HIDEAKI)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号：10178551

##### (3) 連携研究者

(0)

研究者番号：

