

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592329

研究課題名 (和文) 口腔扁平上皮癌における治療標的分子の解析

研究課題名 (英文) Analysis of molecular target for oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

松岡 裕大 (MATSUOKA YUDAI)

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号：50448148

研究成果の概要 (和文)：

口腔癌を含めた癌治療の臨床では、癌細胞増殖、浸潤、および転移の各々のステップでの制御が焦点の一つとなっている。その中でも副作用が少なく癌細胞をそれぞれのステップで抑制する物質、すなわち分子標的治療薬の開発に力が注がれている。近年、癌細胞の増殖・浸潤・転移において活性化した低分子量 GTP 結合蛋白質の Rho ファミリーの一つである Rac の関与が注目されている。そこで我々は特に口腔扁平上皮癌細胞において活性化した低分子量 GTP 結合蛋白 Rac に焦点を絞り研究を進めている。今までに我々は口腔扁平上皮癌細胞において Rac を過剰発現し、活性化すると癌浸潤能が増すことを確認している。そこで本研究では口腔扁平上皮癌細胞の Rac 活性を特異的に抑制することにより癌細胞がいかなる影響を受けるかを検討した。

研究成果の概要 (英文)：

Among Rho family members, Rac has been implicated in the regulation of cell survival and apoptosis. However, the mechanisms underlying this process have not been fully elucidated. Here, we report that inhibition of Rac by a Rac-specific small molecule inhibitor, NSC23766, or transfection of dominant negative Rac (Rac-DN) elicits apoptosis in highly malignant oral squamous carcinoma cells (OSC-19 cells). Upon suppression of Rac, we observed up-regulation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and condensation of nuclei, leading to caspase-dependent apoptosis. Pretreatment with a JNK-specific inhibitor, SP600125, decreased the effect of Rac inhibition on apoptosis, indicating that activation of JNK strongly correlates with apoptosis. Protein phosphatase 5 (PP5) has recently been reported as a downstream effector of Rac signaling. Stimulation of PP5 rescued apoptosis caused by Rac inhibition by dephosphorylating JNK. These results demonstrate that inhibition of Rac activity leads to the suppression of PP5 activity, which results in extensive activation of JNK and caspase-dependent apoptosis. Taken together, Rac inhibition may represent a novel therapeutic approach for oral squamous carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

現在、口腔癌を含めた癌治療の臨床では、癌細胞増殖、浸潤、および転移の各々のステップでの制御が焦点の一つとなっている。その中でも副作用が少なく癌細胞をそれぞれのステップで抑制する物質、すなわち分子標的治療薬の開発に力が注がれている。

近年、癌細胞の増殖・浸潤・転移において活性化した低分子量 GTP 結合蛋白質の Rhoファミリーの一つである Rac の関与が注目されている。しかしながら癌細胞にいかなる影響を及ぼし、増殖・浸潤・転移に関わっているかは現在のところ不明であり解析が待たれている。

2. 研究の目的

我々は特に口腔扁平上皮癌細胞において活性化した低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac に焦点を絞って研究を進めている。今までに我々は口腔扁平上皮癌細胞において Rac を過剰発現し、活性化すると癌浸潤能が増すことを確認している。そこで本研究では口腔扁平上皮癌細胞の Rac 活性を特異的に抑制することにより癌細胞がいかなる影響を受けるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac 阻害による細胞形態変化の観察

実験には口腔粘膜由来のヒト扁平上皮癌細胞で、Y-K 分類 4C 型の浸潤像を示す細胞株 OSC-19 細胞、および口唇より採取したヒト線維芽細胞を用いた。各々の細胞に Rac の特異的な阻害剤である NSC23766 を作用し、細胞形態変化を観察した。

(2) 遺伝子導入と低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac の発現と活性測定

OSC-19 細胞へ低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac の 17 番目の Thr (スレオニン) を Asn (アスパラギン酸) に置き換えた dominant

negative 遺伝子 N17Rac1 (Rac-DN) を導入した。また各々の細胞の低分子 GTP 結合蛋白質 Rac の定性的発現を Western blotting、その活性を pull down assay にて測定した。

(3) 核の組織化学的染色とアポトーシスの測定

スライドガラス上で OSC-19 細胞および線維芽細胞を培養し、Rac 活性を阻害した際の核の形態的变化を比較検討した。また Rac 活性阻害した OSC-19 細胞および線維芽細胞において細胞死検出 ELISA キットプラスを使用し、細胞内ヒストン結合 DNA のモノ-およびオリゴヌクレオソームレベルでの DNA 断片化を定量的に測定することでアポトーシスの程度を検討した。

(4) Western blotting による断片化カスパーゼ-3 の検出とカスパーゼ阻害によるアポトーシスへの影響の解析

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞の断片化カスパーゼ-3 の定性的発現を Western blotting にて検討した。またカスパーゼ特異的阻害剤である z-VAD-fmk を作用させ、Rac 阻害によるアポトーシスへの影響を検討した。

(5) Western blotting によるシグナル伝達の検出と JNK および p-38 阻害によるアポトーシスへの影響の解析

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞および線維芽細胞の c-Jun N-terminal リン酸化酵素 (JNK) および p-38 リン酸化酵素 (p-38) の定性的発現を Western blotting にて検討した。また JNK および p-38 特異的阻害剤である SP600125 および SB203580 にて JNK および p-38 を阻害し、Rac 阻害によるアポトーシスへの影響を検討した。

(6) JNK の活性測定

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞の JNK 活性を c-Jun fusion 蛋白を用い、免疫沈降法に

より測定した。

Ser/Thr Protein Phosphatase 5 (PP5) 活性化によるアポトーシスへの影響の解析

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞にアラキドン酸を作用し PP5 を活性化させ、Rac 阻害によるアポトーシスへの影響を検討した。

(7) Ser/Thr Protein Phosphatase の活性測定

Rac 活性阻害および PP5 活性促進した OSC-19 細胞の Ser/Thr Protein Phosphatase 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 低分子量 GTP 結合蛋白 Rac 阻害による細胞形態変化

OSC-19 細胞は、NSC23766 を作用させることで顕著な死細胞を認めた。しかしながら線維芽細胞では同様の変化は認められなかった。

(2) 低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の発現と活性測定

OSC-19 細胞は線維芽細胞よりも Rac 活性の亢進を認めた。また Rac-DN を導入した細胞および NSC23766 を作用させた細胞において Rac 活性の抑制が認められた。

(3) 核の組織化学的染色とアポトーシスの測定

OSC-19 細胞では Rac 活性阻害により断片化した核の染色像を示した。さらに Rac 活性阻害により、アポトーシスが認められた。また NSC23766 の濃度依存的にアポトーシスが上昇した。

(4) Western blotting による断片化カスパーゼ-3 の検出とカスパーゼ阻害によるアポトーシスへの影響

Rac 活性阻害によりアポトーシスを起こした OSC-19 細胞では断片化したカスパーゼ-3 が認められた。また z-VAD-fmk にてカスパーゼ活性が抑制されることでアポトーシス

が完全に抑制された。

(5) Western blotting によるシグナル伝達の解析と JNK および p-38 阻害によるアポトーシスへの影響

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞では JNK および p-38 の顕著なリン酸化が認められたが、線維芽細胞では p-38 のみリン酸化が認められた。また SP600125 ではカスパーゼ活性が抑制されアポトーシスが抑制されたが、SB203580 では抑制されなかった。

(6) JNK の活性測定

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞では顕著な JNK 活性を認めた。

(7) Ser/Thr Protein Phosphatase 5 (PP5) 活性化によるアポトーシスへの影響

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞ではアラキドン酸を作用させることで JNK およびカスパーゼ活性が抑制されアポトーシスが抑制された。

(8) Ser/Thr Protein Phosphatase の活性測定

Rac 活性阻害した OSC-19 細胞では Ser/Thr Protein Phosphatase の活性が抑制され、アラキドン酸にて促進した。

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6件)

1. Enomoto A, Nakahara H, Uchihashi T, Tsuji H, Hamada S: FDG-positive Warthin's tumor in a neck node mimicking metastasis in primary intraosseous left posterior mandibular cancer staging with PET/CT. J Oral Maxillofacial. Surg., 査読有、2011
2. 53. Nakano Y, Nakahara H, Isomura (Tanaka) E, Fukuda Y, Uchihashi T, Kogo M: Adenomatoid hyperplasia of salivary gland at the uvula: Case report. J. Osaka Univ.

Dent.Soc. 査読有 2011、55、111-114,

3. Ni L, Saeki M, Xu L, Nakahara H, Saijo M, Tanaka K, Kamisaki Y, : RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage. J Cell Biochem. 査読有、2009、106、920-928,

4. 49. Itsuki Y, Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, Terao Y, Kawabata S, Yatani H, Kamisaki Y, : Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. FEBS Letters 査読有 2008、267、58-63,

5. Matsuoka Y, Nakahara H, Nozaki S, Otani T, Kogo M: Inhibition of Rac Induces Hyper- Activation of c-Jun N-Terminal Kinase and Caspase-Dependent Apoptosis. Oral Science International 査読有 2008、5、52-62,

6. 松岡裕大、中原寛和、久島潔、大谷朋弘、能崎晋一、平岡慎一郎、永田雅英、相川友直、山本悦秀、古郷幹彦：線維芽細胞との混合培養下での口腔扁平上皮癌細胞の浸潤制御日口外誌 査読有 2008、54 44-49

[学会発表] (計8件)

1. 伊東優子、中原寛和、他：著明な骨形成を伴う線維形成型エナメル上皮腫：第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・平成 23 年 1 月 27 日・熊本(崇城大学市民ホール)

2. 栗本聖之、中原寛和、他：口腔乾燥症患者の乾燥症状の日内変動—口腔乾燥症患者に関する報告第一報—：第 55 回日本口腔科学会総会・平成 22 年 10 月 16 日から 18 日・千葉(幕張メッセ)

3. 濱田傑、森本泰成、小倉孝文、中原寛和、他：顎関節転移病巣から発見にいたった悪性黒色腫の一例：第 64 回日本口腔科学会学術集会・平成 22 年 6 月 24 日・25 日札幌(札幌

プリンスホテル)

4. 榎本明史、田中晋、山西整、岡本怜子、辻忠孝、中原寛和、他：三叉神経中脳路核ニューロンにおけるナトリウム電流の発達：第 64 回日本口腔科学会学術集会・平成 22 年 6 月 24 日・25 日札幌(札幌プリンスホテル)

5. 徳宮元富、中原寛和、松岡裕大、古郷幹彦：ヒト口腔扁平上皮癌の浸潤能への reptin 遺伝子の影響：第 64 回日本口腔科学会学術集会・平成 22 年 6 月 24 日・25 日札幌(札幌プリンスホテル)

6. 栗本聖之、中原寛和、他：オトガイ孔近傍に発生した顎骨中心性血管腫の一例：第 21 回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方会・平成 21 年 11 月 14 日・奈良(奈良県橿原文化会館)

7. 内橋俊大、中原寛和、他：下顎骨に発生した乳頭状角化エナメル上皮腫の一例：第 21 回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方会・平成 21 年 11 月 14 日・奈良(奈良県橿原文化会館)

8. 濱田傑、中原寛和、他：同種骨髄移植後に発生した口腔腫瘍 3 例：第 54 回(社)日本口腔外科学会総会・平成 21 年 10 月 10 日 11 日・札幌(札幌コンベンションセンター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 裕大 (MATSUOKA YUDAI)
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
研究者番号：50448148

(2) 研究分担者

中原 寛和 (NAKAHARA HIROKAZU)
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
研究者番号：70324796

古郷 幹彦 (KOGO MIKIHICO)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20205371