

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10151

研究課題名(和文) 光遺伝学を利用した金属結合タンパク質の発現制御による口腔癌治療の基盤構築

研究課題名(英文) Basic construction for medical treatment of oral cancer by controlling of metal-binding protein expression utilizing optogenetics

研究代表者

十川 紀夫 (Sogawa, Norio)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：30236153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト舌癌由来細胞HSC-4では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、ヒト歯肉由来癌細胞Ca9-22にMT-4を遺伝子導入すると細胞増殖が抑制され、亜鉛トランスポーター(ZIP6, ZIP9, ZnT5)のmRNA発現が減少した。さらに、*in vivo*検討においてMT-4はマウス抜歯窩組織再生初期に一過性の有意な減少を示した。MT-4による亜鉛トランスポーター発現制御機構は未だ不明であるが、亜鉛トランスポーターは細胞内亜鉛の調節に必須の因子であることから、これらの発現低下による増殖関連酵素などの機能低下を介して、細胞増殖が抑制されていることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一連の研究推進により、細胞内亜鉛濃度の維持・調節に重要なMT、特にMT-4の遺伝子導入により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。この結果は、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、扁平上皮癌に対する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癌は、歯科・口腔外科領域において重要な疾患であり、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、遺伝子治療への応用など新たな手法による癌治療技法の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)：The influence of MT-4 gene transfection into HSC-4 cells derived from human tongue on the cell proliferation was not observed. On the other hand, the cell proliferation of Ca9-22 cells derived from human gingiva by gene transfection of MT-4 was suppressed. In MT-4 gene transfected cells, the mRNA expressions of zinc transporters, ZIP6, ZIP9 and ZnT5 were reduced. Moreover, MT-4 mRNA expression was transiently and significantly decreased at the beginning of tissue repair after tooth extraction in mice *in vivo* experiments.

The mechanisms underlying the regulation of zinc transporter gene expression have been unclear. However, it is considered that the Ca9-22 cell proliferation was suppressed through the functional depression of enzymes related to cell proliferation due to the decreased expression of zinc transporters, because the zinc transporters are the essential factors on regulating intracellular zinc concentration.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：metallothionein oral cancer gene therapy

## 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 の複製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、正常細胞と口腔癌細胞における 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。われわれは、これまでに MT-4 が癌抑制遺伝子 p53 により発現誘導される下流因子であること、亜鉛により増殖が抑制される亜鉛感受性ヒト歯肉由来扁平上皮癌細胞(Ca9-22 細胞)は MT-4 遺伝子導入により細胞増殖が抑制されるが、亜鉛非感受性細胞(ヒト舌由来扁平上皮癌細胞:HSC-2, HSC-3, HSC-4 細胞)は MT-4 遺伝子導入による細胞増殖への影響がない、などを見出し、細胞増殖における細胞内亜鉛と MT-4 との関連性を示唆する結果を得ている。しかし、MT-4 導入後の細胞内亜鉛調節因子(亜鉛トランスポーター)発現など、MT-4 が細胞増殖を抑制する機序などに関する情報はない。

### 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している。したがって、本研究では、細胞内亜鉛濃度の維持・調節に重要な MT の発現、特に MT-4 の遺伝子導入による口腔癌細胞増殖に対する影響を検討し、MT-4 発現制御による口腔癌遺伝子治療に向けての応用基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### MT-4 遺伝子導入後の口腔癌細胞における亜鉛トランスポーター mRNA 発現変動

実験には、ヒト舌由来扁平上皮癌細胞株(HSC-4)、およびヒト歯肉由来扁平上皮癌細胞株(Ca9-22)を用いた。扁平上皮癌細胞( $2 \times 10^4$  cells/well/0.5mL medium [D-MEM, 10%FCS])は 24well プレートに播種した。播種翌日、pcDNA3 に MT-4 翻訳領域 cDNA を挿入して作成したヒト MT-4 発現ベクターをリポフェクション法(FuGENE6 Transfection Reagent, プロメカ株式会社)を用いて遺伝子導入した。なお、対照群には pcDNA3 ベクターを導入した。亜鉛トランスポーター mRNA 発現(ZIP1, 2, 4, 6, 7, 9, 10 および ZnT5, 7, 9)は、遺伝子導入 3 日後に総 RNA を回収し、cDNA を作成(SuperScript IV VIL0 Master Mix, Thermo Fisher Scientific)後、Real-time PCR 法(SYBR Green PCR Master Mix and Mini thermal cycler, Bio-Rad)で定量した。

#### MT-4 遺伝子導入後の Ca9-22 細胞におけるアポトーシス誘導

実験には、ヒト歯肉由来扁平上皮癌細胞株(Ca9-22)を用いた。Ca9-22 細胞( $2 \times 10^4$  cells/well/0.5mL medium [D-MEM, 10%FCS])をチャンバースライド(Lab-Tek Chamber Slide, 8 ウェル, Thermo Fisher Scientific)に播種した。播種翌日、ヒト MT-4 発現ベクターをリポフェクション法にて遺伝子導入した。対照群には pcDNA3 ベクターを導入した。遺伝子導入 2 日後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、TACS® 2 TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit(Trevigen, Inc.)を用いてアポトーシス誘導細胞を検出、計数した。

#### 抜歯窩組織再生時における MT-4 mRNA 発現

実験には、雄性、28 日齢の 129SV マウス、および MT-1/-2 を欠損した MT 欠損マウスを用いた。ペントバルビタール(50mg/kg, ip)で麻酔したマウスを開口固定後、有鉤ピンセットを用いて上顎右側第一臼歯を抜歯した。抜歯 0, 3, 5, 7 日後に再生上皮を採取し、総 RNA を回収した。次いで cDNA を作成(SuperScript IV VIL0 Master Mix, Thermo Fisher Scientific)し、Real-time PCR 法(SYBR Green PCR Master Mix and Mini thermal cycler, Bio-Rad)にて定量した。

### 4. 研究成果

#### MT-4 遺伝子導入後の口腔癌細胞における亜鉛トランスポーター mRNA 発現変動

MT-4 遺伝子導入により細胞増殖が抑制されたヒト歯肉癌由来細胞(Ca9-22)では、ZIP6,

ZIP9, ZnT5 の mRNA 発現が有意に低下していた。

MT-4 による亜鉛トランスポーター発現制御機構は未だ検討していないが, ZIP6 と ZIP9 は共に細胞外からの亜鉛流入に, また, ZnT5 は亜鉛タンパク質への亜鉛供給に関与していることから, これら亜鉛トランスポーターの発現低下による増殖関連酵素などの機能低下を介して, 細胞増殖が抑制されていることが考えられる。

#### MT-4 遺伝子導入後の Ca9-22 細胞におけるアポトーシス誘導

顕微鏡下で視野内 1000 細胞あたりのアポトーシス誘導細胞数を計数したところ, MT-4 遺伝子導入により細胞増殖が抑制されたヒト歯肉癌由来細胞(Ca9-22)におけるアポトーシス誘導細胞数は, 対照群と比較して減少する傾向が認められたものの, その差は有意ではなかった。

この結果は, MT-4 は癌抑制遺伝子 p53 の下流因子であるが, MT-4 による Ca9-22 細胞の増殖抑制作用は, アポトーシス誘導による細胞死によるものではないことを示唆している。

#### 抜歯窩組織再生時における MT-4 mRNA 発現

MT-1 および MT-2 は細胞増殖に関与することが示唆されている。抜歯後の歯肉組織再生における MT-4 の関連をより明確にするため, 正常マウスだけでなく, MT-1/-2 を欠損したマウスも用いて検討した。正常マウスにおける抜歯窩組織再生時における MT-4 mRNA 発現は, 抜歯直後(0 日後)の抜歯窩周囲組織と比較して, 再生初期(抜歯 3 日後)に有意な減少が認められた。一方, MT 欠損マウスでは MT-4 mRNA 発現は抜歯後低位で推移し, 抜歯 3 日および 7 日後の mRNA 発現量は抜歯直後と比較し有意に減少していた。

われわれは, MT 欠損マウスにおける抜歯窩組織再生が正常マウスと比較して遅いことを見出しており, この知見と合わせて考えると, 細胞増殖が盛んな組織では MT-4 の発現が抑制される, あるいは, 逆に MT-4 発現が減少すると細胞増殖が始まる可能性を示しており, これは MT-4 の遺伝子導入により, アポトーシス死とは異なる機序により, 細胞増殖が抑制されるという, われわれの研究結果より示唆される現象を補助する知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口 宝, 十川千春, 今村泰弘, 嶋田勝光, 宮崎育子, 浅沼幹人, 村上 聡, 平岡行博, 十川紀夫
2. 発表標題 金属結合タンパク質メタロチオネイン遺伝子導入によるヒト歯肉由来扁平上皮癌細胞の 増殖抑制
3. 学会等名 第94回松本歯科大学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口 宝, 十川千春, 今村泰弘, 嶋田勝光, 村上 聡, 平岡行博, 十川紀夫
2. 発表標題 メタロチオネイン-4遺伝子導入による歯肉扁平上皮癌細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2023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)	広島工業大学・生命学部・教授   (35403)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮崎 育子  (Miyazaki Ikuko)  (40335633)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師    (15301)	
研究分担者	村上 聡  (Murakami Satoshi)  (70385219)	松本歯科大学・歯学部・教授    (33602)	
研究分担者	荒 敏昭  (Ara Toshiaki)  (90387423)	松本歯科大学・歯学部・教授    (33602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関