

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22592244

研究課題名（和文）

新規アポトーシス制御因子 GRIM-19 の発現制御機構の解析

研究課題名（英文）

Analysis of regulatory mechanisms of expression of apoptosis inducing factor GRIM-19

研究代表者

森 一将 (MORI KAZUMASA)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：80372902

## 研究成果の概要（和文）：

GRIM-19 (the Genes-associated with Retinoid-Interferon induced Mortality)は、インターフェロン  $\beta$  (IFN- $\beta$ )とレチノイン酸(RA)の共刺激により誘導される分子量 19 kDa のアポトーシス実行因子である。GRIM-19は、EGFなどの成長因子のシグナル伝達に関与する転写因子 STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)と結合し、STAT3依存性の遺伝子発現を抑制することにより癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する。

口腔癌における GRIM-19 の発現、ならびにその機能的役割については不明な点が多いことから本研究課題では口腔扁平上皮癌における GRIM-19 の発現制御について検討を行い、以下の知見が得られた。①口腔扁平上皮癌細胞株における GRIM-19 のタンパク質発現をウエスタンブロット法にて検討した結果、IFN- $\beta$  および RA の共刺激により Ca9-22 細胞では GRIM-19 の発現が誘導されたが、HSC-2 細胞ではその発現誘導は認められなかった。② GRIM-19 の mRNA をリアルタイム PCR にて検討した結果、どちらの細胞においても構成的な GRIM-19 の mRNA 発現が認められた。しかしこの構成的な mRNA 発現は IFN- $\beta$ 、RA の共刺激により、いずれの細胞においても発現増強は認められなかった。③ 一方、IFN- $\beta$  誘導性遺伝子である CXCL11、TRAIL の発現はいずれの細胞株でも認められたことから、IFN- $\beta$  のシグナル伝達経路の異常でないことが示唆された。これらの結果から、口腔扁平上皮癌細胞において GRIM-19 の発現制御が遺伝子の転写レベルでなく、翻訳レベル、あるいは翻訳後レベルで制御されている可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

GRIM-19 (gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19) codes for a 16 kDa protein which was originally isolated as a growth suppressive gene product in the interferon-beta (IFN- $\beta$ )- and retinoic acid (RA)-induced cell death pathway. GRIM-19 has been shown to suppress tumor cell growth and induce apoptosis by interacting with an oncogenic transcription factor STAT3 and thereby inhibiting the STAT3-regulated gene expression. The present study was undertaken to clarify the expression and functional

role of GRIM-19 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and the following results were obtained. 1) When expression of GRIM-19 was assessed in OSCC cell lines by Western blotting, co-stimulation with IFN- $\beta$  and RA induced a prominent GRIM-19 protein expression in Ca9-22 cells. However, an only marginal expression of GRIM-19 was observed in cell lysate from HSC-2 cells stimulated with IFN- $\beta$  and RA. 2). Although a constitutive GRIM-19 mRNA expression was detected in both HSC-2 and Ca9-22 cells, IFN- $\beta$  and RA had no inductive effect on the GRIM-19 mRNA expression in both cells. 3). IFN- $\beta$  induced expression of CXCL11 and TRAIL mRNAs in both cells, suggesting that IFN- $\beta$  signaling pathway are intact in these cells. Taken together these results suggested that the expression of GRIM-19 in OSCC cells is regulated at translational or post-translational level but not transcriptional level.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系・歯科放射線学

キーワード：口腔扁平上皮癌，アポトーシス，GRIM-19，STAT3，IFN

#### 1. 研究開始当初の背景

GRIM-19 (the Genes-associated with Retinoid-Interferon induced Mortality)は、インターフェロン  $\beta$  (IFN- $\beta$ )とレチノイン酸(RA)の共刺激により誘導される分子量 19 kDaのアポトーシス実行因子である。GRIM-19は、EGFなどの成長因子のシグナル伝達に関与する転写因子 STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)と結合し、STAT3依存性の遺伝子発現を抑制することにより癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する。これまでに、口腔扁平上皮癌におけるGRIM-19の発現ならびにその機能的役割については明らかにされていなかったことから口腔扁平上皮癌細胞株におけるGRIM-19の発現について検討を行ったところ、

GRIM-19の発現が認められない細胞株を見いだした。他の固形癌におけるGRIM-19の発現制御機構についても不明な点が多いことから、口腔癌細胞におけるGRIM-19の発現制御について解析を行うこととした。

#### 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌細胞におけるGRIM-19の発現を解析した結果、HSC-2細胞では恒常的なGRIM-19の発現が認められず、IFN- $\beta$ とRAの共刺激によってもGRIM-19の発現が誘導されなかった。本研究課題は、IFN- $\beta$ とRAの共刺激によりHSC-2細胞ではなぜGRIM-19が発現誘導されないのかその分子機構を明らかにすることを目的とする。そのためまずIFN- $\beta$ およびRA刺激による正常なGRIM-19

遺伝子発現がどのように制御されているのか GRIM-19 の発現が認められる Ca9-22 細胞を用いて解析し、さらに HSC-2 細胞において IFN- $\beta$  および RA 刺激による GRIM-19 遺伝子発現がどのようなメカニズムにより誘導されないのかについて検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 および Ca9-22 細胞は、10% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地にて培養した。細胞は、IFN $\beta$  (500 U/ml) および RA (1 mM) にて所定時間培養し、実験に供試した。

#### (2) タンパク質発現解析

細胞を所定の時間培養後、whole cell lysate を抽出し、SDS-PAGE にて分離、PVDF 膜にトランスファー後、抗 GRIM-19 抗体、抗 STAT3 抗体を用いてウェスタンブロット法により検討した。

#### (3) 遺伝子発現解析

HSC-2 および Ca9-22 細胞を IFN- $\beta$  および RA にて所定時間刺激し、total RNA を調製した。抽出した RNA から cDNA を合成し、GRIM-19 に対する Universal Probe (Roche) を用いてリアルタイム PCR を行い、mRNA の発現を検討した。各細胞間の GRIM-19 mRNA の発現量を比較検討するため数種のハウスキーピング遺伝子 (beta-actin, GAPDH, HPRT, b2-microglobuli) の発現量をリアルタイム PCR にて測定後、GRIM-19 mRNA の相対的発現量を求めた。

#### (4) レンチウイルスベクター

口腔癌細胞における GRIM-19 の機能的役割を検討するためレンチウイルス発現系を構築した。ウイルスベクターの構築には Gateway システムを用い、GRIM-19 cDNA を destination vector にクローニング後、ウイルスパッケージングミックスとともに 293FT 細胞に遺伝子導入し、組み換えレンチウイルスを得た。また、コントロール

として GFP 発現レンチウイルスも作製した。なお本実験は明海大学歯学部遺伝子組換え実験安全委員会での承認を受けている(承認番号 0075)

### 4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞における GRIM-19 のタンパク質レベルをウェスタンブロット法にて検討した結果、Ca9-22 細胞では IFN- $\beta$ 、RA の共刺激で GRIM-19 の発現が誘導されたが HSC-2 細胞では GRIM-19 の発現は誘導されなかった。

(2) そこで遺伝子発現に違いがあるのか、GRIM-19 の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した結果、どちらの細胞においても構成的な GRIM-19 の発現は認められた。しかしこの構成的な mRNA 発現は IFN- $\beta$ 、RA の共刺激によっても Ca9-22、HSC-2 いずれの細胞においても発現増強は認められなかった。

(3) この GRIM-19 の mRNA 発現における IFN- $\beta$  に対する不応答性が IFN- $\beta$  のシグナル伝達経路の異常によるものなのかを検討するため、IFN- $\beta$  誘導性遺伝子である CXCL11、TRAIL の発現についてリアルタイム PCR にて解析した。

その結果、Ca9-22、HSC-2 両細胞ともに CXCL11、TRAIL mRNA の発現誘導は認められたことから、IFN- $\beta$  のシグナル伝達経路の異常ではないことが示唆された。

(4) HSC-2 細胞に GRIM-19 組換えレンチウイルスを感染させ、GRIM-19 を強制発現させたところ、構成的な STAT3 のチロシン (Tyr 705) のリン酸化が抑制された。このことから野生型 GRIM-19 は HSC-2 細胞の STAT3 依存性遺伝子発現を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果から、GRIM-19 のタンパク質発現が認められる Ca9-22 細胞では IFN- $\beta$ 、RA の共刺激で遺伝子発現は認められず、

GRIM-19 の発現制御が遺伝子の転写レベルでなく、翻訳レベル、あるいは翻訳後レベルで制御されている可能性が示唆された。

一方、HSC-2 細胞では Ca9-22 細胞とほぼ同程度の構成的な GRIM-19 mRNA 発現が認められているにも関わらずタンパク質発現が認められていないことから、GRIM-19 タンパク質の分解系が発現異常に関わっている可能性が示唆された。

## 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 1 件)

Kazumasa Mori et al : Infiltration of M2 Tumor-Associated Macrophages in Oral Squamous Cell Carcinoma Correlates with Tumor Malignancy *Cancers* 3 3726-3739 2011

doi:10.3390/cancers3043726

[学会発表] (計 1 件)

森 一将 他 : 口腔領域の腫瘍および上皮性異形成における M2 マクロファージの発現動態 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2011. 11. 22 大阪市

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

森 一将 (MORI KAZUMASA )

明海大学・歯学部・講師

研究者番号 : 80372902

### (2) 研究分担者

大森喜弘 (OHMORI YOSHIHIRO )

明海大学・歯学部・教授

研究者番号 : 50194311

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :