

## 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 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791982

研究課題名（和文） 口腔癌・癌幹細胞における FGF 結合蛋白 HBp17 の役割と分子標的治療への応用

研究課題名（英文） The role of FGF binding protein HBp17 in cancer stem cells of oral cancer and application for the molecular target therapy.

研究代表者

新谷 智章 (SHINTANI TOMOAKI)

広島大学・病院・助教

研究者番号：90403518

研究成果の概要（和文）：

活性型ビタミン D3 (VD3) が口腔癌細胞における HBp17 に与える影響について検討を行った。

VD3 添加により、HBp17 発現は抑制された。I $\kappa$ B- $\alpha$ においては発現が増加しており、リン酸化が減少していた。レポーターアッセイでは、HBp17 プロモーター配列を導入した細胞では VD3 によりレポーター活性が低下した。免疫染色により、VD3 添加の HBp17 蛋白は、核への局在が減少していた。VD3 は NF- $\kappa$ B 活性阻害を介して、HBp17 発現抑制に関与している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

By assuming the expression of HBp17 in an oral cancer cell line, we treated them with 1 $\alpha$ , 25(OH) $_2$ D $_3$  (VD3). We investigated the expression of HBp17, FGF-2 and NF- $\kappa$ B molecules. Reporter assays were done for proof of down-regulation of these molecules.

The HBp17 expression was down-regulated with VD3. There are no changes in NF- $\kappa$ B expression (p65 or p50). However the expression of I $\kappa$ B- $\alpha$  was increased and its phosphorylation was decreased. Investigation on the HBp17 promoter activity by luciferase reporter assays showed the down-regulation of this molecule by VD3. We found that HBp17 expression in nuclear decreased by VD3 treatment with immunofluorescence cytochemistry. We concluded that VD3 down-regulated HBp17 expression by inhibiting DNA binding of NF- $\kappa$ B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：増殖因子、ビタミン D3

## 1. 研究開始当初の背景

HBp17/FGFBP は、A431 細胞の培養上清より FGF-2 とともに分離・精製された、17kDa のヘパリン親和性分泌蛋白である。上皮細胞で特異的に発現され、FGF-1、-2 と可逆的に結合することから、標的細胞での FGFs の遊離・活性化に深く関与していると考えられる。これまでに、われわれは HBp17/FGFBP が扁平上皮癌細胞の増殖に深く関与していることを報告してきた。

一方、活性型ビタミン D3 は癌や炎症反応を低減させる効果が報告されている。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) における、HBp17/FGFBP と活性型ビタミン D3 の関係についてはこれまで報告されていない。そこで、活性型ビタミン D3 が OSCC における HBp17/FGFBP に与える影響について検討を行ったので報告する。

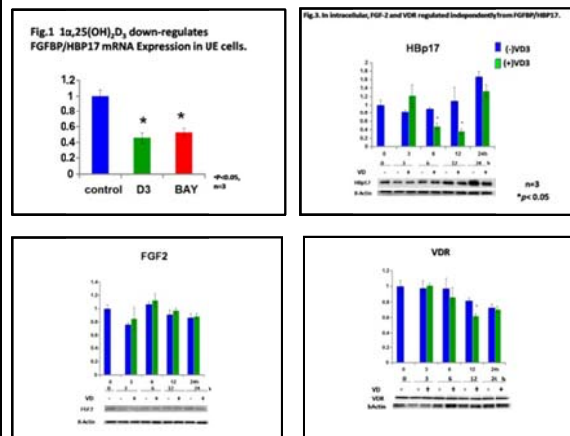
## 3. 研究の方法

無血清培養系で、OSCC 細胞株 UE 細胞に活性型ビタミン D3 およびを添加し、24 時間後に HBp17/FGFBP、FGF-2 および NF- $\kappa$ B 関連分子群の遺伝子および蛋白の発現を定量 PCR 法およびウエスタンブロット法にて検討した。HBp17/FGFBP 遺伝子プロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組

み込み、活性型ビタミン D3 による発現制御についてレポーターアッセイを行った。また、HBp17/FGFBP 抗体にて蛍光免疫染色を行い、活性型ビタミン D3 が細胞内の HBp17/FGFBP の局在に与える影響を検討した。

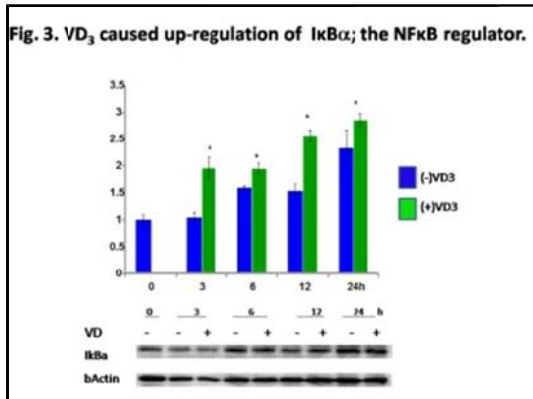
## 4. 研究成果

活性型ビタミン D3 添加および BAY(選択的 NF- $\kappa$ B 阻害薬)により、HBp17/FGFBP の遺伝子発現は抑制された(Fig. 1)。

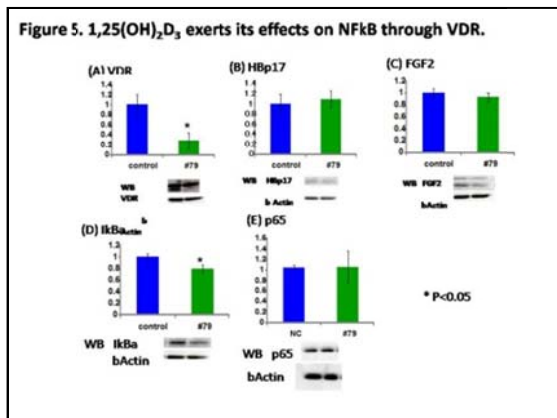


次に、D3 添加後の HBp17、FGF-2 および VDR それぞれの遺伝子発現と蛋白発現を経時的に観察した(Fig.2)。HBp17 の発現は遺伝子発現と蛋白発現ともに 12 時間以降で VD3 群は低下していた。VDR と FGF2 では両群で発現の差はみられなかった。NF- $\kappa$ B においては p65 RNA 発現は p50 RNA 発現ともに変化がみられなかった。I $\kappa$ B- $\alpha$ においては発現が RNA 発現、蛋白発現ともに増加して

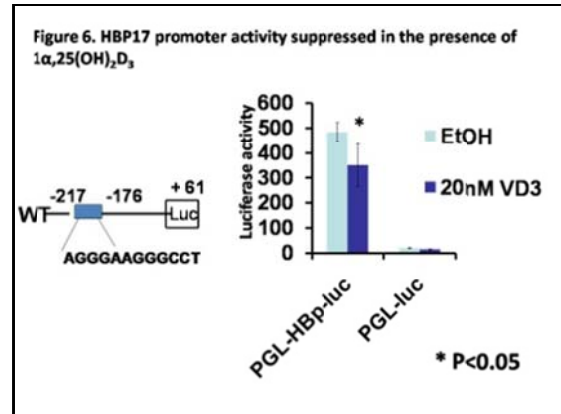
おり、リン酸化が減少していた(Fig. 3)。



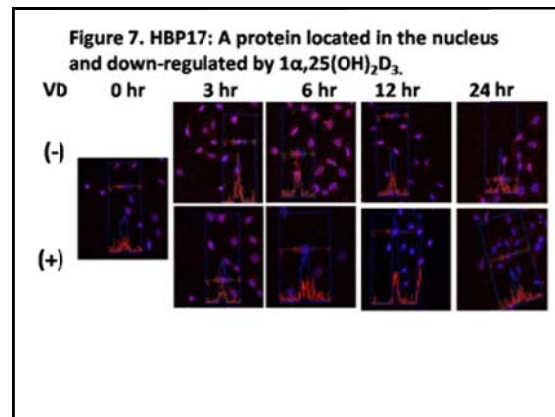
VDRi を遺伝子導入し、HBp17、FGF-2、VDR、p65 および IκB-α の遺伝子発現と蛋白発現の検討を行った。IκB-α の発現は、コントロールに比有意味に低下していた。FGF-2 と p65 は変化していなかった(Fig. 5)。



レポーターアッセイでは、HBp17/FGFBP 遺伝子プロモーター配列を遺伝子導入した UE 細胞ではビタミン D3 添加によりレポーター活性が約 30%低下した。



さらに蛍光免疫染色により、ビタミン D3 添加群の HBp17/FGFBP 蛋白は、核への局在が減少していた。



## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 智章 (TOMOAKI SHINTANI)

広島大学・病院・助教

研究者番号：90403518

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：