

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23792349
研究課題名（和文）	熱ショック転写因子制御による口腔扁平上皮癌に対する分子標的療法の開発
研究課題名（英文）	Development of the molecular target medicine for oral squamous cell carcinoma by the heat shock transcription factor control
研究代表者	
	堀永 大樹 (HORINAGA DAIJU)
	山口大学・医学部附属病院・助教
	研究者番号： 30379987

研究成果の概要（和文）：口腔癌細胞を用いた、CDDP 単独、温熱療法単独、熱ショック転写因子の knockdown による抗腫瘍効果を *in vitro* にて効果判定した。CDDP+HS、HS+KD では相加効果を認めるも、CDDP+KD では有意に効果の増強を認めなかったが、CDDP+HS+KD の 3 者併用群では有意に相乗効果を認めた。また、3 種類の癌細胞株において HSF1 を knockdown することで遺伝子発現量の低下を来す共通する遺伝子のノックダウンを行った。結果は、HSF1 ほどの細胞増殖抑制効果はないものの、コンビネーションによるノックダウンでは、双方の細胞増殖抑制効果が増強された。

研究成果の概要（英文）：I performed effect measurement of an antitumor effect by knockdown in *in vitro* in CDDP alone using the oral cancer cell, thermotherapy alone, a heat shock transcription factor. I did not significantly accept the reinforcement of the effect in CDDP+KD though I accepted an addition effect in CDDP+HS, HS+KD, but significantly recognized synergy in the tripartite combination group of CDDP+HS+KD. In addition, I knocked down the common gene which caused a drop of the gene expression because knockdown did HSF1 in three kinds of cancer cells strain. Although there was not it, as for the result, as for the cytostasis effect like HSF1, both cytostasis effects were reinforced by the knockdown by the combination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：HSF1

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療において生存率の向上と同時に、顎口腔機能の回復・温存や顎顔面領域における審美性の保持は患者の QOL 向上に非常に重要である。機能温存療法としては、放射線療法 (RALS) や放射線併用化学療法などがあげられるが、一旦、放射線を相当量浴びてしまったり、放射線抵抗性が強い腫瘍に関しては、さらに根治線量を用いた放射線療

法を行うことはできない。このような症例以外にも、再発症例・進展症例など手術不適応症例に関しても、化学療法が重要な役割を担う。

従来の抗癌剤は、主に細胞の細胞分裂・細胞周期・DNA 合成・RNA 合成・微小管合成・タンパク質合成などに作用し、その機能を阻害することにより、抗腫瘍効果を発揮する。しかしながら、従来の抗癌剤では抗腫瘍効果

と同時に、正常な細胞への広範な細胞毒性も生じ、患者によっては重篤な副作用のため化学療法を止む無く中断・中止するケースも少なくない。そこで、放射線治療の線量不足を補うためや化学療法の dose down を余儀なくされた症例などに、代替治療として温熱療法が用いられる。

一般に細胞は、42°C以下ではどれだけ加温してもほとんど死滅しないが、43°C以上で加温すると死滅する。温熱療法は悪性腫瘍が正常細胞より温熱感受性が高いことを利用する。正常細胞は 43°Cに加熱しても血管が拡張し、血流が速くなり加温した熱は血流で放散され、40°C、41°Cと低くなり、正常細胞は生存する。これに対し癌組織では、血管新生で多数でてきた新生血管は脆弱で加温されても拡張しないので、血流も増加せず熱がこもり、癌細胞は死滅する。

温熱療法を分子レベルでみると、温熱に対する細胞の生体応答の分子機構については不明な点が多く、温熱による細胞死の根本的な原因については再考の余地があると考えられている。多くの報告では温熱による細胞死の主因はタンパク質変性であると考えられてきた。その論拠としては、熱ショック蛋白質(HSP)が温熱によって変性したタンパク質を修復しなければ細胞は温熱感受性になったり、温熱耐性を獲得できなかつたりすること、温熱は中心体タンパク質の変性による有糸分裂やDNAの複製、転写、翻訳、修復などの核基質依存機能を阻害することがあげられる。

個体レベルでみると、当初、HSPは温熱の耐性獲得や抗癌剤の効果を低減させるなど、癌治療効果を低くするものとして知られてきた。最近、ハイパーサーミア治療で誘導されるHSPが間接的に患者自身の免疫能を高め、癌治療効果を高めることが報告されている(伊藤, 日医放会誌. 1994)。

細胞が高温ストレスにさらされると、一群の熱ショック蛋白質群が誘導される。この応答は熱ショック応答と呼ばれ、熱ショック転写因子群(Heat shock transcription factor: HSF)によって制御される。哺乳動物細胞には4つのHSF(HSF1, HSF2, HSF3, HSF4)が存在する(Fujimoto et al., Mol. Biol. Cell 2009 in press)。熱ショック蛋白質群は、ストレスによる蛋白質の変性や凝集体形成を抑制する。研究代表者と共同研究している山口大学生化学教室は、HSF群がFGFやLIFなどのサイトカイン群を転写制御し、レンズや嗅神経細胞などの感覚器形成に必須であること(Fujimoto et al, EMBO J. 2004; Takaki et al, J. Biol. Chem. 2006)、HSF1はIL-6のクロマチンを制御して免疫炎症反応を調節していることを報告した(Inouye et al, J. Biol. Chem. 2004 & 2007;

Takii et al., J. Immunol. in press)。

また、HSF1が細胞死関連遺伝子 Tdag51を制御し、細胞死も誘導していることを明らかにした(Nakai et al., EMBO J. 2000; Hayashida et al., EMBO J. 2006)。

また、HSF2に関してはストレス下にある状態では三量体となり、HSF1とヘテロ三量体を形成し、HSE(heat shock element)に結合することが分かっている(Sistonen et al., Nature. 2010)。HSF4に関しては、結合領域の同定がされ、HSF1、HSF2ともに拮抗するように同領域への結合を認めている。HSF4はクロマチン制御をおこなうことで、発生過程や熱ショック応答における遺伝子発現制御に関与していることが示唆されている(Fujimoto et al, J. Biol. Chem. 2008)。これらのことから、癌細胞の発生、増殖やアポトーシスにHSF1だけでなくHSF2やHSF4が関与する可能性があるが、HSF群の活性化、HSP群の転写誘導などの活性制御機構については未解明の部分が多い。

本邦においては、口腔癌に対するHSF制御による抗腫瘍効果の報告はなく、今だそのメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで、今回われわれは、口腔癌とHSFとの関連を明らかにし、そこから得られるであろうHSFの抗腫瘍効果が、口腔癌に対するがん温熱療法化学療法の可能性を拡大させることが期待される。

2. 研究の目的

熱ショック応答は、進化の過程で保存された普遍的な生体防御機構である。この応答を制御するのが熱ショック転写因子HSFである。HSF1は、構成的ならびに誘導性の熱ショック蛋白質Hspの発現を制御することで、温熱ストレスをはじめとする様々なストレスに対する耐性獲得に働いている。最近の研究から、HSF1は細胞内蛋白質ネットワークを調整することにより腫瘍形成を制御しており、癌の発生や維持において重要な役割を演じていることが報告されている。そこで、口腔扁平上皮癌におけるHSF群の役割およびメカニズムを解明し、HSF群を制御することで得られる抗腫瘍効果を解析し、分子標的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

口腔癌細胞を用いた、CDDP単独、温熱療法単独、熱ショック転写因子のknockdownによる抗腫瘍効果をin vitroおよびin vivoで効果判定を行う。in vivoでは血管内皮細胞株およびマウス背部皮下法(DAS法)を用いた、CDDP単独、温熱療法単独、熱ショック転写因子knockdownによる抗腫瘍効果の評価を行う。それぞれの併用効果についても評価を

行う。熱ショック転写因子に関しては、**HSF1, HSF2, HSF4** それぞれでの効果判定およびコンビネーションでの効果の相違に関しても評価を行う。併せて、腫瘍細胞において **HSF1** により誘導・発現される **ATF3, p53** の検索を行い、抗腫瘍効果との比較検討を行う。効果判定、評価をもとに口腔癌担癌ヌードマウス腫瘍に対する **CDDP**、温熱療法、熱タンパク転写因子 **knockdown** の至適投与量の検討を行い、口腔癌に対する臨床応用が目的である。

4. 研究成果

近年、細胞内蛋白質の構造や濃度、局在、相互作用を一定に保つ蛋白質ホメオスタシス (図 1) の乱れが、神経変性疾患や老化、癌や発生異常と密接に関わっている (図 2) ことが広く認識されるようになった (Balch et al., Science 2008)。HSF1 は分子シャペロンの誘導を介してこの機構に非常に重要な役割を持っていることが分かっている (Morimoto, Gene Dev. 2008)。

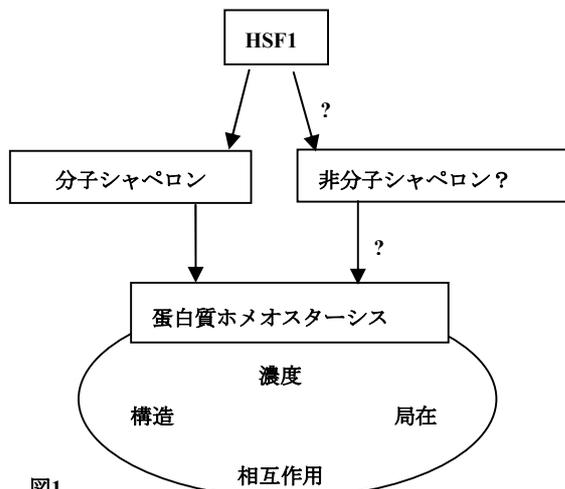


図1

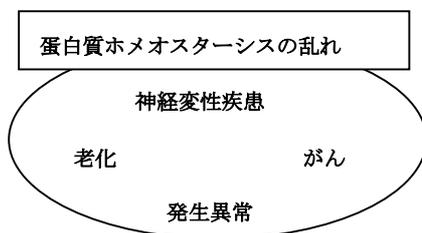


図2

癌細胞においては、癌細胞の増殖は **HSF1** に依存しており (Lindquist et al., Cell. 2007)、子宮頸癌細胞である **HeLa** 細胞において **HSF1** ノックダウンすることで、**cisplatin + heat** (Hyperthermochemotherapy) への感受性が高まることが報告されている (Gabriella et al., Cancer Reserch. 2006)。確かに、口腔扁平上皮癌細胞において **HSF1** をノックダウン

することで細胞の増殖は抑制されることが、われわれの実験から分かっている (図 3)。

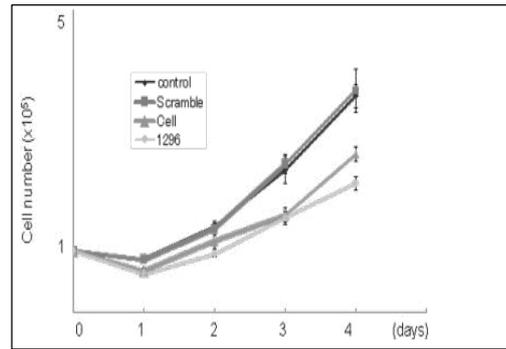


図3 HSC-2におけるsh-RNA(Cell, 1296)を用いた HSF1 knockdownによる細胞増殖の変化。

口腔癌細胞を用いた、**CDDP** 単独、温熱療法単独、熱ショック転写因子の **knockdown** による抗腫瘍効果を *in vitro* にて効果判定した。結果は、それぞれ単独群では投与量、温度、ウイルス量に依存して細胞増殖能の低下、アポトーシス誘導の増加、細胞浸潤能の低下、細胞遊走能の低下などを認めた。**Knockdown** においては、至適用量と考えられる量を設定することにより、他の 2 群と同様の結果となった。しかし、投与量に比して必ずしも細胞増殖能の低下が比例しないため、細胞のコンディション、アデノウイルスの劣化等に注意を払う必要性が今後の課題となった。次に、それぞれのコンビネーションを行ったところ、**CDDP+HS**、**HS+KD** では相加効果を認めるも、**CDDP+KD** では有意に効果の増強を認めなかった。しかしながら、**CDDP + HS + KD** の 3 者併用群では有意に相乗効果を認めた (図 4)。

Knockdown + CDDP+ Heat shock

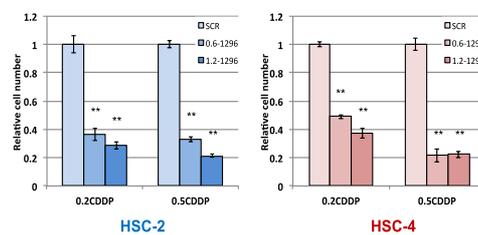


図 4

Scheffe's F test **p<0.01

また、3 種類の癌細胞株において **HSF1** を **knockdown** することで遺伝子発現量の低下を来す共通する 8 つの遺伝子を **microarray** にて同定できたので、**HSF1** との関係、癌細胞における役割を検証した (図 5)。

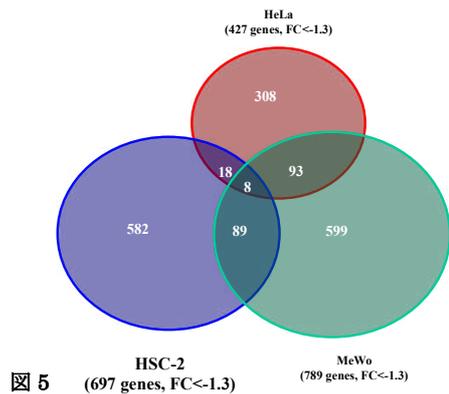


図 5

結果は、8種類の遺伝子のうち2種類の遺伝子において HSF1 と同様の発現様式を呈するものを認め、実際の口腔扁平上皮癌および白板症の生検材料より免疫組織学的検討を行ったところ、有意に癌細胞においてその発現が上昇していることから HSF1 の癌細胞に対する様々な影響の一因となることが解明された。HSF1 で制御されている遺伝子が癌の種類によってかなり異なっているが、一部の共通な遺伝子の産物は、膜関連タンパク質であった。特に、8種類の遺伝子の1つである BCAP31 はアポトーシスに関与しており、HSF1 の knockdown による細胞増殖抑制との関連が高い可能性が示唆された (図 6)。

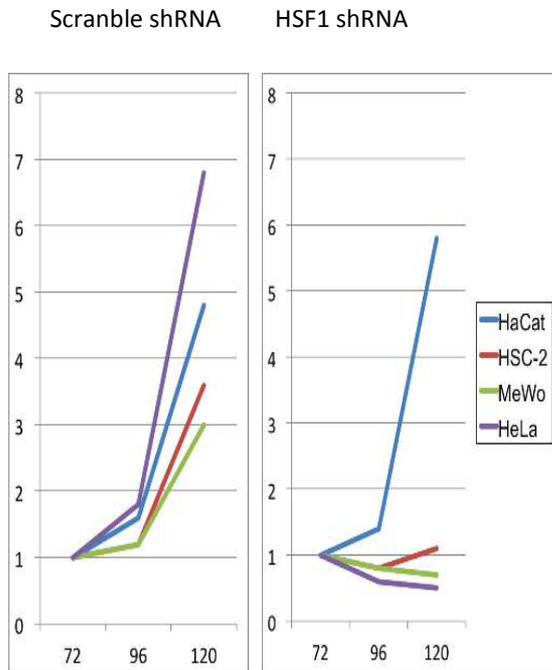


図 6

当初の目的では、HSF1 と他の HSF 群とのコンビネーションによるノックダウンを検討していたが、先に述べたように、他の HSF 群のノックダウンが困難となり、代わりに新

たなる HSF1 関連遺伝子 BCAP31 のノックダウンを行った。結果は、HSF1 ほどの細胞増殖抑制効果はないものの、コンビネーションによるノックダウンでは、双方の細胞増殖抑制効果が増強されかなりの癌細胞治療への期待が高くなった。

以上のことから、HSF1 による抗腫瘍効果はいろいろな種類の癌細胞に有効に働き、その効果は従来の抗がん剤治療や温熱療法により、より効果的に発揮されることが解明された。また、HSF1 関連遺伝子とのコンビネーションによる knockdown でもその効果の増強を認めているため、今後は in vivo にてその効果の確認が必要と考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ①堀永大樹、癌細胞に共通する HSF1 に関連する 8 つの遺伝子、日本口腔外科学会、2012 年 10 月 20 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- ②堀永大樹、口腔扁平上皮癌に対する熱ショック転写因子 HSF1 による抗腫瘍効果の検討、日本口腔外科学会、2011 年 10 月 22 日、大阪国際会議場 (大阪)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀永 大樹 (HORINAGA DAIJU)
 山口大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：30379987