

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593043

研究課題名(和文) 頭頸部癌における予後予測因子 SIRT1 の細胞内局在に依存した細胞生物学的機能の解明

研究課題名(英文) Subcellular localization and biological functions of SIRT1 in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

菊地 慶司 (Kikuchi, Keiji)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：90372094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：蛋白質脱アセチル化酵素SIRT1は癌の発生・進展に関与するが、促進的であるか抑制的であるかは癌の種類やSIRT1の細胞内局在によって異なっている。我々は頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)においてはSIRT1の核での高発現は予後良好に相関するが、SIRT1が細胞質に局在する場合は予後不良であることを見いだした。HNSCCでのSIRT1の癌抑制的機能の背景を検討し、SIRT1が癌抑制遺伝子であるTP53遺伝子の発現に寄与している可能性があることを見いだした。SIRT1の核内移行シグナルに変異を導入し、HSC2細胞の細胞質に発現させて効果を検討したが、浸潤能などに大きな変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Participation of protein deacetylase SIRT1 to cancer initiation and progression depends on the context, including cancer types and subcellular localization of SIRT1. In head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), we found that high SIRT1 expression in nuclei predicts favorable prognosis in patients, while it in cytoplasm accompanies malignancy. To know the roles of SIRT1 in HNSCC, we investigated what genes are regulated by SIRT1 in HNSCC cells and found that SIRT1 contributes to transcription of the TP53 gene, a member of TP53 family and implicated in tumor suppression. As TP53 suppresses metastasis, we examined the effect of expression of SIRT1 carrying mutations in nuclear localization signals on cell invasion in HNSCC-derived cells. No significant changes in invasive activity of the cells upon cytoplasmic expression of EGFP-mutated SIRT1 was observed, suggesting that cytoplasmic SIRT1 participates in malignancy through cellular processes other than cell invasion.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：SIRT1 頭頸部癌 TP53

1. 研究開始当初の背景

蛋白質脱アセチル化酵素である SIRT1 は栄養状態に応じた個体（酵母、線虫、マウス）寿命の制御に関与していることから注目を集めており、健康寿命あるいは寿命の延長を目的として SIRT1 を標的とする薬剤の開発が進んでいる。SIRT1 は機能的にがんの発生・進展にも関与しうると考えられているが、がん種やステージによって異なるとも報告されており、詳細は不明な点が多い。

また、頭頸部癌症例の予後予測は現在きわめて困難であるが、われわれは頭頸部癌症例において SIRT1 の発現と予後の関係を予備的に検討し、1) SIRT1 核発現が予後良好の独立した因子でありうる、2) SIRT1 細胞質発現が悪性度の指標となりうる、3) SIRT1 核発現が術前の化学療法・放射線療法の治療効果の指標となりうる、ことを見出した。

従って SIRT1 は頭頸部がんの予後予測因子、また予防および治療の標的分子となりうる可能性がある。しかし、たとえば、SIRT1 が核に局在して癌抑制に機能する場合にはレスベラトロールなど SIRT1 を活性化する薬剤はがんの予防・抑制に寄与しうるが、SIRT1 が細胞質に局在する場合、癌抑制の機能を喪失しているのみならず悪性化に積極的に関与しているとする SIRT1 の活性化はむしろ避けるべきこととなる。このような観点から、頭頸部癌において SIRT1 がどのような細胞生物学的機能をもっているのか、またそれが細胞内局在によってどのように変わるのかを明らかにしていくことが必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では頭頸部癌において SIRT1 の核・細胞質発現の生物学的意義を明らかにするとともに、その分子論的背景を解析し、SIRT1 を標的とした薬剤の頭頸部癌の予防と治療への応用に寄与することを目的とす

る。

3. 研究の方法

（1）各種の癌での SIRT1 の発現：神奈川県立がんセンター倫理委員会の承認を受けた上で、神奈川県立がんセンター病院・消化器外科および頭頸部外科において治療のため切除された、あるいは検査のため取得された組織で、病理診断科において保管されていたホルマリン固定・パラフィン包埋組織より組織マイクロアレイを作成し、常法に従って抗 SIRT1 抗体による免疫組織染色をおこなった。

（2）培養がん細胞での SIRT1 の細胞内局在：生化学的な方法による細胞分画のウェスタンブロット解析、抗 SIRT1 抗体による細胞の蛍光免疫染色、SIRT1 と GFP の融合蛋白を細胞に発現させて GFP を観察する、の3通りの方法で調べ、いずれの方法が妥当であるかを検討した。また、SIRT1 の核移行シグナルに変異を導入して細胞質に（も）局在する GFP との融合蛋白を作成し、その機能を検討した。

（3）SIRT1 による遺伝子発現調節：上皮幹細胞あるいは頭頸部癌のがん幹細胞の維持に関わると考えられる 12 遺伝子の発現を 8 種類の頭頸部癌由来の細胞株で検討し、それら遺伝子の発現と SIRT1 の発現レベルとの相関、また遺伝子相互の発現レベルの相関を検討した。SIRT1 の発現を RNA 干渉によりノックダウンし、それらの遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。また、頭頸部癌組織での SIRT1 その他遺伝子の mRNA の発現は、神奈川県立がんセンター倫理委員会の承認を受けた上で、頭頸部癌の生検組織のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を病理診断科より受領して RNA を抽出して逆転写後、リアルタイム PCR により定量した。

4. 研究成果

(1) 各種のがん組織での SIRT1 の発現とがんの臨床病理学的特性・患者の予後

胃癌・大腸がんでは SIRT1 の高発現は悪性化に関与していると考えられるのに対し、頭頸部がんにおいては、SIRT1 の発現が低い症例でがんが未分化である割合が相対的に高く、かつ患者の無再発期間の短縮・生命予後の短縮に有意に関連していることを見いだした(図1)。予備的な検討段階では SIRT1

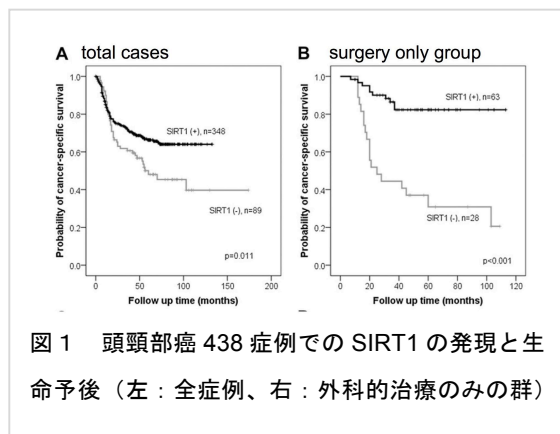


図1 頭頸部癌 438 症例での SIRT1 の発現と生命予後 (左: 全症例、右: 外科的治療のみの群)

の発現は抗がん剤治療に対する応答に関連しているかと思われたが、症例数を増やした解析の最終結果では、これはむしろ外科的治療のみを受けた症例で顕著であることが判明した(図1)。

頭頸部がんにおいて SIRT1 は基本的には癌抑制的に機能しているものと考えられる一方、頭頸部癌でも SIRT1 が細胞質に発現している症例では予後が不良であることが確認された。これが単に SIRT1 が核に局在していないために癌抑制の機能を発揮し得ないのか、それとも細胞質に存在することが癌の悪性化に積極的な意味を持つのかを検討課題になると考えられた。

(2) SIRT1 の細胞内局在の検出

SIRT1 の細胞内局在を検出するために、まず細胞の分画方法を検討した。0.1%の Triton X-100 の存在化で細胞をホモジナイズした場合、SIRT1 は核から容易に流出してしまうことが判明した。Triton X-100 の濃度を 0.03% とする、あるいは界面活性剤を用いないでホ

モジナイズのみで核を単離しようとする、ショ糖密度勾配遠心を併用しても核と細胞質の分離が不完全となり、結局 SIRT1 の局在を保ったまま細胞を分画する至適な条件を見つけるには至らなかった。

次に蛍光免疫染色により SIRT1 の細胞内局在を検討した。SIRT1 を強制発現させた細胞を用いて細胞の固定および市販の抗体 (Epitomics E104 および Santa Cruz H300) の反応条件を検討し、SIRT1 を特異的に検出する条件を設定した。導入遺伝子により発現させた SIRT1 は核に局限して発現することが確認された(図2)。しかし、この条件では内在性の SIRT1 のシグナルはきわめて弱く、核に局限して存在すると断言することは困難であった。SIRT1 に対するポリクローナル抗体を独自に作成することを試みたが、免疫染色に使用可能な抗体(抗血清)を取得することはできなかった。

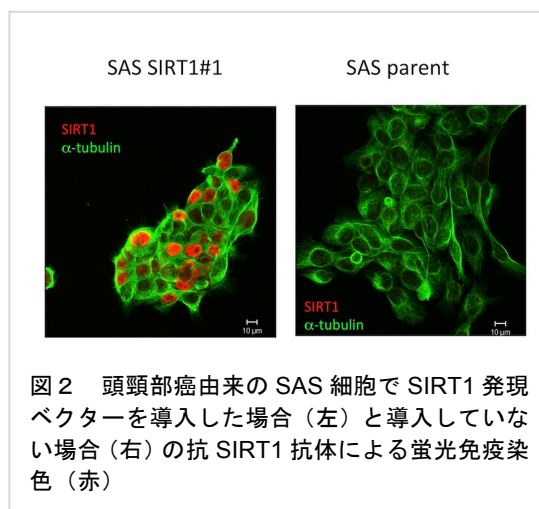


図2 頭頸部癌由来の SAS 細胞で SIRT1 発現ベクターを導入した場合(左)と導入していない場合(右)の抗 SIRT1 抗体による蛍光免疫染色(赤)

以上の結果から、SIRT1 の局在の変動については SIRT1 と GFP の融合蛋白を作成して細胞内局在を検討するのが現時点では最も信頼性が高いと判断した。

(3) 頭頸部がん細胞での SIRT1 の癌抑制的機能の分子論的背景

扁平上皮細胞においては SIRT1 が上皮細胞の分化に促進的に関与すると報告されている。また、口腔がんにおいて SIRT1 は上

皮間葉転換 (EMT) を抑制すると報告されている。頭頸部がんにおいて SIRT1 の発現ががんの高分化と関係する可能性を示唆する (1) での観察と考え合わせ、頭頸部扁平上皮がんにおける SIRT1 の機能について (がんの幹細胞仮説に従って) ① SIRT1 の発現が低い未分化な細胞 (あるいは上皮幹細胞) ががん化して低分化のがん細胞となる、あるいは② 高分化ながん細胞であっても SIRT1 の発現が低下することによって低分化のがん細胞あるいはがん幹細胞の性格が強いがん細胞となる、という仮説をたてて検討を行った。上皮幹細胞あるいは頭頸部癌のがん幹細胞の維持に関わると考えられる遺伝子群の発現を 8 種類の頭頸部癌由来の細胞株で検討し、それら遺伝子の発現と SIRT1 の発現レベルとの相関、また遺伝子相互の発現レベルの相関を検討した。その結果、例えばがん幹細胞のマーカーと考えられる NANOG 遺伝子の発現は上皮幹細胞の維持に関わる ING5 および UHRF1 遺伝子の発現と正の相関を示す一方、分化マーカーである involucrin 遺伝子の発現とは逆相関を示した。従って、選択した遺伝子群の発現パターンはある程度細胞の分化度を反映しているものと考えられた。しかし、SIRT1 の発現は p63 遺伝子のアイソフォームでアミノ末端側の転写活性化ドメインを欠く、DNp63 遺伝子との逆相関を示した以外はどの遺伝子の発現とも相関を示さなかった。さらに、HSC 2 細胞と KOSC2 細胞で SIRT1 の発現を siRNA により knockdown し、これらの遺伝子の発現がどのように変化するかを調べた。その結果、TAp63 遺伝子のみ発現が低下する

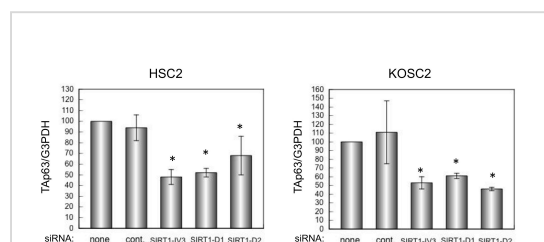


図3 頭頸部癌由来の HSC 2 細胞 (左) あるいは KOSC2 細胞 (右) に SIRT1 に対する siRNA を導入して 48 時間後に TAp63 mRNA 量を定量的 RT-PCR により測定した結果。* 3 回の独立した実験で $p < 0.05$

ことが認められた (図 3)。

TAp63 は細胞の分化やアポトーシスの誘導に関わるほか、がん細胞の浸潤能を抑制するなどして癌抑制遺伝子として機能することが報告されており、SIRT1 が TAp63 の発現を維持していることは SIRT1 ががん抑制的であることの背景のひとつになっていると考えられる。

実際に頭頸部癌において SIRT1 の発現と TAp63 遺伝子の発現が相関するかどうかを、頭頸部癌の生検組織のホルマリン固定・パラフィン包埋標本より RNA を抽出してリアルタイム PCR により検討した。SIRT1 mRNA の発現と TAp63 mRNA の発現の間で有意な正の相関が認められた一方、細胞では発現の相関が認められなかった SMARCA5 遺伝子についてはそのような相関は認められなかった (図 4)。

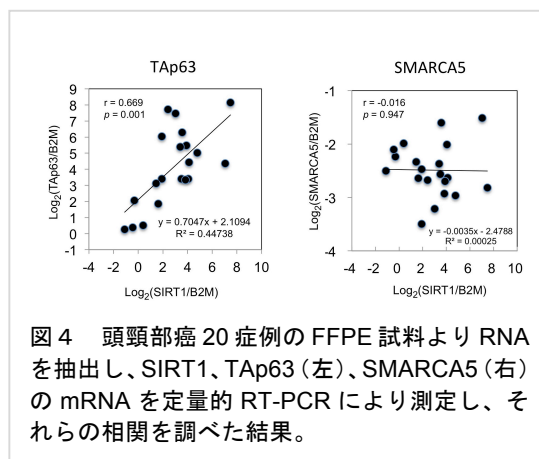


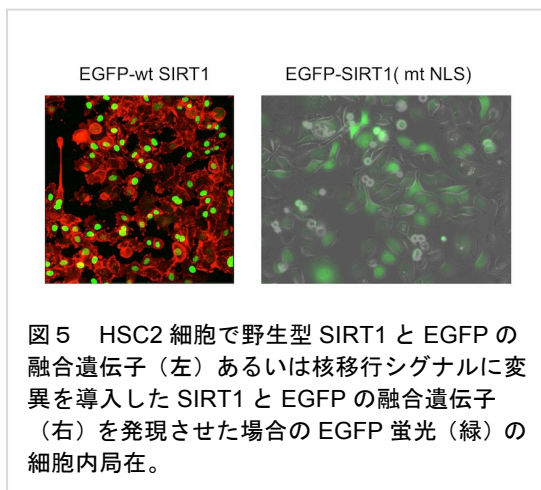
図4 頭頸部癌 20 症例の FFPE 試料より RNA を抽出し、SIRT1、TAp63 (左)、SMARCA5 (右) の mRNA を定量的 RT-PCR により測定し、それらの相関を調べた結果。

これらの結果から、① SIRT1 は頭頸部癌細胞においてがん細胞の分化あるいは癌幹細胞の分化に寄与するとは考えにくい、② SIRT1 が頭頸部癌において癌抑制的に機能する背景に癌抑制遺伝子である TAp63 遺伝子の発現を維持している可能性がある、ことが結論された。

(4) SIRT1 の細胞内局在と機能

(2) の結果をうけて、SIRT1 の核移行シグナル (2 カ所) に変異を導入した変異体に EGFP を N 末端側に融合した発現ベクター

を作成し、HSC2 細胞に導入して変異 SIRT1 蛋白の細胞内局在とその発現の効果を、(3)の結果より細胞の浸潤能に注目して検討した。核移行シグナルに変異を導入した場合、SIRT1 が細胞質にも局在することが確認されたが、細胞の形態そのものが大きく変化することは認められなかった (図5)。



野生型、および核移行シグナルに変異を導入した SIRT1-EGFP 蛋白を発現する HSC2 細胞の浸潤能をコラーゲン 3 次元培養系で検討したが、SIRT1 の細胞質への局在にともなって浸潤能が昂進する傾向は認められなかった。

(5) 総括

本研究の結果、頭頸部癌において SIRT1 は癌抑制遺伝子 TAp63 の発現の促進を介して癌抑制因子として機能しうることが明らかとなった。これは SIRT1 を活性化する薬剤は頭頸部がんの予防・治療に有効でありうることを示唆する。しかし、SIRT1 が細胞質に局在する場合の機能を本研究において明らかにするには至らず、内在性の SIRT1 の細胞内局在を確定できる手法の開発とあわせて今後さらに検討する必要がある。

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)

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- ① Kikuchi K, Noguchi A, Kasajima R,

Miyagi Y, Hoshino D, Koshikawa N, Kubota A, Yokose T, Takano Y.

Association of SIRT1 and tumor-suppressor gene TAp63 expression in head and neck squamous cell carcinoma. Tumor Biology, 査読あり、May 7 2015, E-pub ahead of print. doi: 10.1007_s13277-015-3515-y.

- ② Noguchi A, Kikuchi K, Zheng H, Takahashi H, Miyagi Y, Aoki I, Takano Y. SIRT1 expression is associated with a poor prognosis, whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. Cancer Med, 査読あり, 3:1553-61 (2014). doi: 10.1002/cam4.310.
- ③ Oyanagi J, Kojima N, Sato H, Higashi S, Kikuchi K, Sakai K, Matsumoto K, Miyazaki K. Inhibition of transforming growth factor- β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. Exp. Cell Res, 査読あり, 326:267-279 (2014)
- ④ Zheng HC, Noguchi A, Kikuchi K, Ando T, Nakamura T, Takano Y. Gene expression profiling of lens tumors, liver and spleen in α -crystallin/SV40 T antigen transgenic mice treated with Juzen-taiho-to. Mol Med Rep, 査読あり, 9(2):547-52 (2014).
- ⑤ Zheng H, Kameda Y, Sekiguchi H, Akaike M, Miyagi Y, Takano Y. High SIRT1 expression and low DBC1 expression are associated with poor prognosis in colorectal cancer. J. Cancer Therapeutics Res, 査読あり

り, 2:1-8 (2013).

- ⑥ Noguchi A, Li X, Kubota A, Kikuchi K, Kameda Y, Zheng H, Miyagi Y, Aoki I, Takano Y. SIRT1 expression is associated with good prognosis for head and neck squamous cell carcinoma patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 査読あり, 115(3):385-92 (2013). doi: 10.1016/j.oooo.2012.12.013.
- ⑦ Noguchi A, Kikuchi K, Ohtsu T, Yoshiwara M, Nakamura Y, Miyagi Y, Zheng H, Takano Y. Pulmonary tumors associated with the JC virus T-antigen in a transgenic mouse model. Oncol Rep, 査読あり, 30(6):2603-8 (2013)

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 菊地 慶司、笠島 理加、高野 康雄：頭頸部癌細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 の TAp63 遺伝子発現への関与. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014
- ② 菊地慶司, 野口映, 高野康雄：頭頸部癌細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 の癌化形質への関与. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
- ③ 野口映, 高野康雄. SIRT1 核発現は頭頸部扁平上皮癌の進展・予後のバイオマーカーである. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.
- ④ 菊地慶司, 野口映, 高野康雄. SIRT1 high-expression and low expression of SIRT1 inhibitor DBC1 correlates poor prognosis of colon cancer patients. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.
- ⑤ 野口映, 菊地慶司, 高野康雄. SIRT1 の高発現は胃癌における予後不良因子である. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札

幌, 2012.

〔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：
出願年月日：
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

菊地 慶司 (KIKUCHI, Keiji)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・がん生物学部・研究員
研究者番号：90372094

(2) 研究分担者

野口 映 (NOGUCHI, Akira)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・がん生物学部・研究員
研究者番号：10456395

高野 康男 (TAKANO, Yasuo)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・所長
研究者番号：60142022

野口 誠 (NOGUCHI, Makoto)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：50208328

(3) 連携研究者

()

研究者番号：