

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462929

研究課題名(和文) 口腔癌細胞におけるアポトーシス制御因子GRIM19の発現制御機構

研究課題名(英文) Functional Analysis of Apoptosis Regulatory Factor GRIM19 in Oral Carcinoma Cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は口腔扁平上皮癌細胞株におけるGRIM-19の発現解析を行い低発現株(HSC-2細胞)と高発現株(Ca9-22細胞)が存在していることを見出した。この発現の違いはGRIM-19の転写レベルではなくタンパク質レベルで制御されている可能性が考えられた。そこでユビキチン/プロテアソーム系ならびにオートファジー系のタンパク質分解系について各種阻害剤を用いて検討したところCa9-22における発現にオートファジーが関与している可能性が示唆された。一方、HSC-2細胞における非発現は、タンパク質分解系によるものではなくGRIM-19遺伝子のコード領域の塩基配列の変異による可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the expression of the GRIM-19 in oral squamous cell carcinoma cell lines and found a low-GRIM-19 expression cell line (HSC-2) and a high- GRIM-19 expression cell line (Ca9-22). Our results also suggested that the expression of the GRIM-19 is regulated at the protein levels but not transcriptional level. To determine the regulatory mechanism for the expression of GRIM-19 protein, we analyzed the involvement of ubiquitin-proteasome systems and autophagy system using various inhibitors. The results demonstrated that the expression of GRIM-19 protein unregulated by treatment with the proteasome and the autophagy inhibitors in Ca9-22 cells. However neither the proteasome inhibitor nor the autophagy inhibitor enhanced the expression in HSC-2 cells. These results suggest a possibility that the impaired expression of GRIM-19 in HSC-2 cells is due to a mutation in the coding region of the GRIM-19 gene.

研究分野：口腔外科学

キーワード：GRIM19 扁平上皮癌 アポトーシス I F N オートファジー STAT3

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン (IFN)は、腫瘍細胞に直接作用し、アポトーシスの誘導や細胞増殖を抑制するだけでなく、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞、マクロファージ等の免疫担当細胞の活性化を誘導することにより抗腫瘍活性を誘導する。がん治療において、IFN は単独投与よりも他の薬剤と併用することにより治療成績が上昇することが知られており、この併用療法の 1 つにビタミン A グループのノレチノイン酸 (RA) がある。海外共同研究者のグループは IFN と RA の併用により腫瘍細胞にアポトーシスが誘導されたことから、そのアポトーシスの制御因子として分子量 16kDa の GRIM-19 (the Genes-associated with Retinoid-Interferon induced Mortality) を同定した。GRIM-19 は EGF など増殖因子や IL-6 によって活性化する情報伝達転写因子 STAT3 と結合し、その活性化を抑制することにより腫瘍細胞の増殖を抑制することが報告されている。また GRIM-19 はミトコンドリアのトコンドリア呼吸鎖複合体 I の構成因子 (NDUFA13) として局在し、酸化リン酸化反応、解糖系に参与していることも報告されている。GRIM-19 の細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用については乳癌、大腸癌、子宮頸癌などの多くの固形癌由来細胞株にて解析が行われてきているが、一方、その発現誘導に関わるメカニズムについては未だ十分には明らかにはされていない。我々はこれまでに口腔扁平上皮癌細胞における GRIM-19 の発現解析を行ってきた。その結果、口腔扁平上皮癌細胞株の中に GRIM-19 の発現が低い細

胞株である HSC-2 と逆に構成的な発現が認められる細胞株である Ca9-22 が存在していることを見出した。HSC-2 細胞では IFN と RA にて共刺激を行なっても、GRIM-19 タンパク質の発現誘導は認められなかったが、Ca9-22 細胞ではその発現増強が認められた。そこで mRNA レベルでの GRIM-19 の発現を Real time PCR 法にて検討した結果、予想に反して HSC-2 細胞においても Ca9-22 細胞とほぼ同程度の恒常的な mRNA の発現が認められた。さらに Ca9-22 細胞でも IFN と RA の共刺激により GRIM-19 mRNA の発現増強は認められなかった。これらの結果から GRIM-19 の発現制御が遺伝子の転写レベル、転写後の mRNA の安定性での制御ではなく、タンパク質レベルで制御されている可能性が示唆された。またこれらの口腔癌細胞株における GRIM-19 遺伝子発現における不応答性が多くの癌細胞が獲得している IFN に対する不応答性に起因しているか否かを検討するために他の IFN 誘導遺伝子 CXCL11 および TRAIL の発現について Real time PCR 法にて解析を行った。その結果、いずれの細胞においても CXCL11 および TRAIL の発現を認めたことから IFN のシグナル伝達の異常によるものではないことが明らかとなった。

2. 研究の目的

これまでの結果から GRIM-19 の発現が転写レベルではなくタンパク質レベルで制御されている可能性が示唆された。GRIM-19 の発現誘導機構に関しては、他の固形癌においても未だ十分には解明されておらず、その解明は GRIM-19 の抗腫瘍

作用を理解する上に意義あるものと考え本研究を実施した。本研究では口腔扁平上皮癌細胞における GRIM-19 のタンパク質レベルでの発現制御機構を明らかにするために、タンパク質合成系および分解系の側面から解析を行うこととした。

3 . 研究の方法

1) 細胞培養

口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 および Ca9-22 は、10 % FBS および 1 % ペニシリン / ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地にて 24 時間培養した。培養後、細胞は IFN β (10 ng/ml, PeproTech) と RA (10 ng/ml, Sigma-Aldrich) にて 16 時間刺激し、以下の実験に供試した。

2) 阻害剤

プロテアソーム阻害剤として Lactacystin (10 μ M, Merck Millipore)、MG-132 (20 μ M, Merck Millipore) またはオートファジー阻害剤として 3-methyladenine (5mM, Merck Millipore) を供試した。細胞を 24 時間培養後、各種阻害剤を添加し 1 時間前処理した後、IFN と RA にて所定の時間共刺激を行ない、実験に供試した。

3) タンパク質発現解析

細胞を所定時間培養後、Whole cell lysate を抽出し、SDS-PAGE にて分離、PDVF 膜にトランスファー後、抗 GRIM19 抗体 (Novus Biologicals)、抗 Akt リン酸化抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 STAT3 抗体を用いてウエスタンブロット法にて検討した。

4 . 研究成果

1) PI3K-Akt-mTOR 経路の検討

タンパク質の翻訳には I3K-Akt-mTOR 経路の活性化が関与していることから IFN β と RA の共刺激により HSC-2 ならびに Ca9-22 における Akt のリン酸化について検討した。その結果、IFN β と RA により GRIM-19 の発現増強が見られる Ca9-22 ならびに非発現 HSC-2 のいずれの細胞も Akt のリン酸化が認められ細胞間の違いは認められなかった。

2) ユビキチン/プロテアソーム系の解析

真核生物における細胞内タンパク質分解機構は、2 つに大別される。1 つは、ユビキチンプロテアソーム系で、ユビキチンにより標識された基質がプロテアソーム系により分解される機構である。もう 1 つは、オートファジーによるタンパク質分解で、細胞質の一部が隔離膜により取り込まれてオートファゴソームを形成し、その後リソソーム膜と結合することにより内容物が分解されるものである。まず始めに、ユビキチンプロテアソーム系が GRIM-19 の発現制御に関与しているか否かを検討するために、プロテアソーム系阻害剤 Lactacystin (10 μ M)、MG-132 (20 μ M) にて細胞を 1 時間前処理後、所定時間 IFN と RA にて共刺激を行ない、ウエスタンブロット法にて解析した。その結果、HSC-2 においては、プロテアソーム系阻害剤の前処理により GRIM-19 タンパクの発現の増加は認められなかった。一方、Ca9-22 細胞では、プロテアソーム系阻害剤の添加により GRIM-19 の発現が認められた。これらの結果から Ca9-22 細胞における GRIM-19

の発現にプロテアソーム系が関与している可能性が示唆された。

3) オートファジー系の解析

GRIM-19 はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の構成因子の1つ(NDUFA13)であることから、ミトコンドリアタンパク質の分解系であるマイトファジーが関与している可能性も考えられた。そこで、オートファジーが GRIM-19 の発現制御に関与しているか否かを検討するために、オートファジー阻害剤にて細胞を1時間前処理後、所定時間 IFN と RA にて共刺激を行ない、ウェスタンブロット法にて解析した。Ca9-22 細胞ではオートファジー阻害剤のみの処理、ならびに IFN β と RA の共刺激により GRIM-19 の発現が増強した。この結果は、Ca9-22 細胞においてはオートファジーも GRIM-19 のタンパク質発現に関与していることが示唆された。一方、HSC-2 細胞ではオートファジー阻害剤の処理でも GRIM-19 の発現は認められなかった。これらの結果から、HSC-2 細胞における非発現は、タンパク質の分解系によるものではなく、GRIM-19 遺伝子のコード領域の塩基配列にフレームシフトなどの変異が認められる可能性が考えられた。そのため今後、HSC-2 細胞においては、GRIM-19 コード領域の塩基配列に変異が認められるか否かを検討するために、polyA mRNA から cDNA を合成して、塩基配列を解読する予定である。一方、Ca9-22 細胞に関しては、GRIM-19 の発現にオートファジーが関与しているか否かを詳細に解析するために、ミトコンドリア分画における GRIM19 の発現およびオートファゴソームと

GRIM19 の局在について検討を行っていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 口腔癌細胞におけるアポトーシス制御因子 GRIM19 の発現制御機構. 森 一将、廣井美紀、嶋田 淳、大森喜弘. 第56回歯科基礎医学会、2014年9月. 福岡国際会議場.

2) 口腔癌細胞におけるアポトーシス制御因子 GRIM19 の発現制御機構. 森 一将、廣井美紀、嶋田 淳、大森喜弘. 第59回日本口腔外科学会総会、2014年10月. 幕張メッセ.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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 (Kazumasa Mori)

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 (Yoshihiro Ohmori)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50194311

(3)連携研究者

なし