

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670876

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌症例におけるSIRT1細胞内局在の意義解明と予後予測法の確立

研究課題名(英文) Intracellular localization of SIRT1 in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

大津 敬(Ohtsu, Takashi)

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)・がん治療学部・主任研究員

研究者番号：10270696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔扁平上皮癌症例を用いた研究結果から、SIRT1は癌細胞の核内では癌抑制遺伝子の役割を、細胞質では癌遺伝子の役割を果たしていると推定された。SIRT1の二面性を分子生物学的および免疫化学的に解析し、統計解析によりSIRT1を含めた予後予測法の確立を目指した。

SIRT1は核移行シグナル(NLS)および核外輸送シグナル(NES)配列をもち、核細胞質間を移動する。この現象を解析するため、NLSおよびNES配列に変異を導入したSIRT1遺伝子を作製した。NCBIデータベースに記載されたSIRT1のNLSおよびNES配列は、幾つかの研究結果とは異なるため、再確認する必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： SIRT1 is a gene with the role of both of a cancer suppressor gene and a oncogene. In our study of the oral squamous carcinoma, SIRT1 seems to act as a cancer suppressor gene in the nucleus, but as a oncogene in the cytoplasm. We aimed at the establishment of the prognostic prediction method of oral squamous carcinoma including SIRT1 and related genes by statistical analysis.

SIRT1 includes two nuclear localization signal (NLS) and two nuclear export signal (NES) sequences, and move between nuclear and cytoplasm. We made the SIRT1 genes introduced mutation into NLS and NES sequence to analyze this phenomenon. It was suggested that the NLS and NES sequence of SIRT1 listed in NCBI database should be reconfirmed.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SIRT1 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔の扁平上皮癌の予後予測は非常に難しい。他の扁平上皮癌では、組織学的悪性度に比例して、腫瘍の大きさに比例して、予後が悪くなることが多い。しかし、口腔の扁平上皮癌では、予後予測因子として所属リンパ節転移、血管侵襲、結節病変の被膜外浸潤と手術断端陽性とが挙げられるのみである。また、予後予測のバイオマーカーも見出されていない(WHO, Pathology & Genetics of HNT, 2005, p174-5)。

(2) SIRT1 は長寿遺伝子として発見されたが、class の脱アセチル化酵素であり、癌抑制遺伝子としての役割と癌遺伝子としての役割を持つとされる (Song NY and Surh YJ, Ann NY Acad Sci, 2012)。われわれが神奈川県立がんセンター病院の 193 例の口腔癌症例、125 例の異形成上皮と 117 例の正常上皮を用いた SIRT1 の研究結果では、SIRT1 は正常扁平上皮では核内に発現し、悪性度に比例して核内から細胞質へと移行し、核発現症例では有意に予後良好であり、細胞質発現症例では有意に予後不良であった (Noguchi A, et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013)。われわれは、この現象の細胞生物学的意義を扁平上皮癌培養細胞を用いて分子生物学的に解明しようと研究している。

(3) 口腔の扁平上皮癌の予後予測バイオマーカーの候補として ING (Inhibitor of growth) 遺伝子を標的に富山大学口腔外科学講座と共同研究してきた。一定の成果を挙げ、今回、SIRT1 に焦点を当て、神奈川県立がんセンターに蓄積された予後調査が正確な口腔扁平上皮癌症例 300 例を用いて研究を継続し、発展させることにした。本研究に類似した報告は国内、国外ともに見られない。

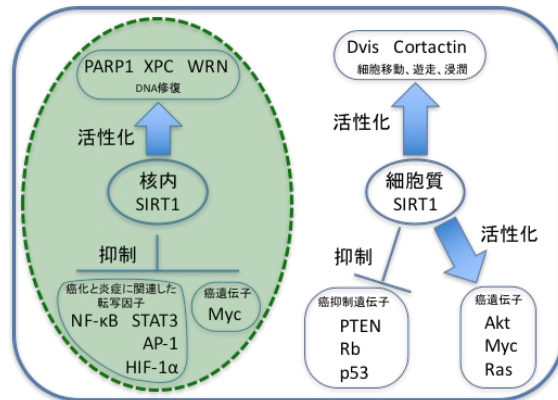
2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の予後予測は、予後予測因子としてリンパ節転移、血管侵襲と手術断端陽性が挙げられるのみであり、非常に困難である。また、予後予測の有効なバイオマーカーも見出されていない。SIRT1 は、癌抑制遺伝子と癌遺伝子の両者の側面を持つ遺伝子であるが、われわれの口腔扁平上皮癌症例を用いた研究結果から、SIRT1 は癌細胞の核内では癌抑制遺伝子の役割を、細胞質では癌遺伝子の役割を果たしていると推定された。文献での考察を踏まえると、SIRT1 の局在と関連遺伝子との相互作用は、以下の図のように推測される。本研究は以下の 3 つのステップを順次クリアすることで、予後予測法の確立に繋げる。

1) この推論、SIRT1 の相反する二面性を、その細胞内局在に注目して分子生物学的に解析する。

2) SIRT1 の細胞内局在が予後予測の有効なバイオマーカーであることを示し、その関連遺伝子の発現との関係を解析する。

3) バイオインフォマティクス解析と多変量解析により SIRT1 を含めた予後予測因子を変数にした予後予測方程式を作成する。



図：核または細胞質に局在する SIRT1 と推測される関連遺伝子との関係

3. 研究の方法

SIRT1 は 2 つの NLS (nuclear localization signals) と 2 つの NES (nuclear export signals) を有して、核細胞質移動のシャトリングを行っている。これにより SIRT1 が核と細胞質の両方に局在できるのであるが、この局在が口腔扁平上皮の正常性及び悪性と関連するかは証明されていない。

まず、この関連を、培養細胞を用いて証明していくために、核内移行を阻害するように NLS に変異を導入した SIRT1 遺伝子を作製し、核内に SIRT1 が局在する株化細胞を用いて NLS 欠損型 SIRT1 遺伝子発現細胞株を樹立する。一方、細胞質移行を阻害するように NES に変異を導入した SIRT1 遺伝子を作製し、細胞質に SIRT1 が局在する株化細胞を用いて NES 欠損型 SIRT1 遺伝子発現細胞株を樹立する。

各種培養細胞から核分画および細胞質分画を分離し、SDS-PAGE、ウェスタンブロット後に抗 SIRT1 抗体で SIRT1 を検出し、その細胞内局在を調べる。また、それぞれの細胞を固定し、抗 SIRT1 抗体で染色し SIRT1 の細胞内局在を明らかにする。これらの細胞株で SIRT1 の細胞内局在と悪性度の変化を migration assay、trans-well assay 等により評価、比較し、細胞質に局在する SIRT1 と悪性度の関連を確認する。

次に、核内での癌抑制遺伝子的な役割を、細胞質内での癌遺伝子的な役割を、培養細胞を用いて解析する。SIRT1 周辺遺伝子群(DBC1,

アセチル化 H3K9、アセチル化 H4K16、PTEN、Rb、p53、NF- κ B、STAT3、AP-1; HIF-1, Akt, Myc, Ras, PARP1, XPC, WRN 等)の発現を、mRNA およびタンパク質レベルで確認する。また、リン酸化状態についても解析する。

さらに、予後調査が正確な口腔扁平上皮癌症例 400 例の TMA (tissue microarray) を作製し、SIRT1 の免疫組織化学を施行し、SIRT1 核発現と細胞質発現と臨床病理学的事項、生存期間との関係を統計学的に解析する。SIRT1 関連遺伝子群の免疫組織化学も施行し、大量のデータを集積し、それらの成果をもとにバイオインフォマティクス解析と多変量解析により予後予測方程式を作成する。

4. 研究成果

培養細胞における SIRT1 の発現と細胞内局在を確認するため、口腔扁平上皮癌由来の株化細胞 5 系統、KOSC-2 c13-43、KON、HSC-2、Ca9-22、HO-1-N-1 を準備した。また、正常細胞として、初代培養口腔粘膜ケラチノサイト、hOMK100 を準備した。これらの細胞を培養し、タンパク質を抽出して SDS 電気泳動の後、ウェスタンブロットを行い、抗 SIRT1 抗体により SIRT1 の発現を確認した。株化細胞においては、発現量の差はあるものの、すべての細胞株で SIRT1 の発現が認められた。また、細胞の核と細胞質を分画し、同様に SIRT1 発現を確認したところ、核でも認められたものの、その主な発現は細胞質であった。一般に、がん細胞株は悪性度が高いと考えられていて、今回の結果も、それに沿った物と考えている。一方、正常細胞では SIRT1 の発現は確認できなかった。

培養細胞での SIRT1 発現量および細胞内局在が変化する条件を明らかにすることは、今回の SIRT1 機能解析において、関連遺伝子の発現に与える影響を調べるために必須である。SIRT1 は一般に貧栄養条件下で発現亢進が認められるため、培養細胞を低栄養培地で培養したときの SIRT1 発現を確認した。添加するウシ胎仔血清を 10%、2%、0.5% とした培地で培養を 1 日、3 日、7 日間行い、SIRT1 タンパク質の発現をウェスタンブロットにより比較したが、どの細胞株でも有意な変化は見られなかった。膠芽腫由来の株化細胞では、培地中のグルコース濃度の違いにより SIRT1 の細胞内局在が変化することが報告されていることから、口腔扁平上皮癌由来の細胞株でも同様の現象が観察できるかどうか確認中である。

SIRT1 の細胞内局在と悪性度の関連を解析するために、NLS および NES に変異を導入した SIRT1 遺伝子の作製を試みた。NCBI データベースによると、ヒト SIRT1 遺伝子 mRNA の塩基配列で翻訳開始点を 1 番目とした場合、

NLS は 94 番目から 120 番目および 667 番目から 690 番目の領域と、また、NES は 412-435 および 1273-1293 の領域となっている。これらの領域のアミノ酸配列を、マウス SIRT1 における NLS および NES を明らかにした研究報告 (Tanno M, et al. J Biol Chem, 2007) と比較すると、ヒトデータベース NLS の 94 番目から 120 番目のアミノ酸配列はマウス SIRT1 の NLS 配列と相同であるが、もう一つの NLS および 2 つの NES はアミノ酸配列が異なる。また、報告されたマウス NES のアミノ酸配列は、NES アミノ酸配列予測に関する報告 (Kosugi S, et al. PLoS Comput Biol 2014) と矛盾しないが、ヒトデータベースの SIRT1 の NES アミノ酸配列は大きく異なる。以上のことから、データベースに記載されたヒト SIRT1 の NLS、NES 領域は十分に信用できるものとは判断できず、上記の 2 つの報告を基にヒト SIRT1 の NLS、NES 配列候補を探索することとした。その結果、ヒト SIRT1 塩基配列の 691 番目から 714 番目がマウスの NLS と相同でありヒト SIRT1 の NLS 配列候補と考えられた。また、NES に関しては、436 番目から 459 番目および 1297 番目から 1317 番目の領域を候補と考えた。後者はマウス SIRT1 の NES 配列の一つと相同である。これらのヒト SIRT1 遺伝子 NLS および NES 候補配列に変異 (塩基性アミノ酸をアラニンに置換等) を導入することを試みたが、SIRT1 は GC リッチの領域が多く、変異導入遺伝子の作製には時間を要した。現在、変異導入遺伝子とレポーター遺伝子の融合遺伝子を作製している。

SIRT1 関連遺伝子の発現解析のため、DNA 修復に関する遺伝子 (PARP1、XPC、WRN) 炎症および発癌に関する遺伝子 (NF- κ B、STAT3、AP-1、HIF-1a)、細胞の転移浸潤に関する遺伝子 (Dvl1、CTTN)、癌原遺伝子 (Akt、Myc、Ras)、癌抑制遺伝子 (PTEN、Rb、p53) の定量 PCR による mRNA 量測定が可能であることを確認した。

これまで、研究計画の第 1 段階である培養細胞における SIRT1 遺伝子解析を行っているところであり、当初計画であるヒト検体を用いた研究に到達できていない。しかしながら、公的なデータベースに記載されている NLS および NES の情報が誤っている可能性があることを発見したことは、大きいと考えている。この情報の真偽については、今後も解析を続けることが重要で、結果によってはデータベースの情報を修正する必要がある可能性もあり、また、SIRT1 に係わる多くの研究者に対して、有益な情報を提供することとなる可能性もある。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 敬 (OHTSU, Takashi)
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・主任
研究員
研究者番号：10270696

(2) 研究分担者

高野 康雄 (TAKAN0, 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・医学研究科・教授
研究者番号：50208328

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・特別
研究員
研究者番号：10456395

片山 佳代子 (KATAYAMA, Kayoko)
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・主任
研究員
研究者番号：70584374

笠島 理加 (KASAJIMA, Rika)
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・特別
研究員
研究者番号：20630875