

平成21年 5月19日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791479

研究課題名（和文） 新規分化誘導遺伝子 RIG-I の導入による新たな口腔癌治療法の開発

研究課題名（英文） The development for newly treatment of oral cancer by transfection of RIG-I, novel differentiation induction gene.

研究代表者

榑 宏剛 (SAKAKI HIROTAKA)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90374850

研究成果の概要：

RIG-I その機能ははまだ明らかにされていない新規の遺伝子である。

申請者は RIG-I 遺伝子を用いた新たな遺伝子治療の可能性に着目し、これまで遂行してきた RIG-I 遺伝子の機能解析に加え、口腔癌由来細胞株を用い、RIG-I 遺伝子の腫瘍抑制遺伝子としての可能性を検討し、同遺伝子を用いた遺伝子治療につながる基礎的研究を行った。

その結果、RIG-I 遺伝子導入によって口腔癌由来細胞株において G1/S 期および G2/M 期進行が抑制されることが推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

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：RIG-I、poly-IC、口腔癌細胞

1. 研究開始当初の背景

RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) は分化誘導遺伝子として遺伝子バンクに登録されているが、その機能ははまだ明らかにされていない新規の遺伝子である。

申請者は平成 17・18 年度科学研究費補助金(若手 B: 口腔粘膜における感染防御機構の解明ならびに遺伝子治療の基礎的研究、2,900 千円)の交付を受け、RIG-I 遺伝子が細菌・ウイルス感染の際に口腔粘膜における免疫反応を賦活化させ、口腔粘膜における感染防御機構に重要な役割を果たしていること

を明らかにし、報告した。

加えて、申請者は、上記研究の過程で試行した cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析によって、RIG-I 遺伝子導入群において癌関連遺伝子の発現量に著明な変化が認められることを見出した。

以上のことより RIG-I は免疫機構の賦活化を促している可能性が高く、アポトーシスによる抗腫瘍効果を有するものと推測された。近年、免疫療法的一端として、頭頸部や肺の悪性腫瘍に対し、二本鎖 RNA を癌細胞に導入することによって、効果的な腫瘍抑制効果が

期待されることが報告されている。しかしながら、生体に対し、ウイルス（二本鎖 RNA）導入を行うことは危険性を伴い、臨床応用への妨げになることが予想される。そこで申請者は RIG-I 遺伝子を用いて、ウイルス導入を行うことなく、ウイルス導入や IFN 療法と同等の効果が期待される新たな遺伝子治療の可能性に着目した。

2. 研究の目的

常在性の細菌やウイルスの侵入に常にさらされる口腔内において組織が恒常性を保つためには、口腔内に特異的な感染防御機構を有するものと推測される。それゆえ申請者は、RIG-I の細菌刺激やウイルス感染刺激による発現を明らかにし、さらに口腔内の免疫機構における同遺伝子役割について解析を行い、同遺伝子を用いた遺伝子治療につながる基礎的研究を行ってきた。

本研究においては、これまで遂行してきた RIG-I 遺伝子の機能解析に加え、口腔癌由来細胞株を用い、RIG-I 遺伝子の腫瘍抑制遺伝子としての可能性を検討し、同遺伝子を用いた遺伝子治療につながる基礎的研究を行うことが目的である。

3. 研究の方法

平成19年度

口腔癌由来細胞株に対する RIG-I 遺伝子導入のための免疫学的検討

①細胞培養と細菌・ウイルス刺激

ここでは、細菌・ウイルスに常に暴露されいながら恒常性を保っている口腔粘膜の特異的な免疫機構と、口腔由来の悪性腫瘍の関係を検討する。口腔癌由来細胞株として、HSC-3 (舌癌由来細胞株：高転移性)、HSC-4 (舌癌由来細胞株：低転移性)、Ca9-22 (歯肉癌由来細胞株)、を培養ディッシュ上で継代培養する。培地中に LPS ならびに二本鎖 RNA (ウイルス感染を想定) として poly IC (polyinosinic-polycytidylic acid) を添加し、一定時間刺激後細胞より RNA または蛋白を回収する。また、随時、RIG-I、各種サイトカイン・ケモカイン遺伝子、IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 、NF- κ B に対して RT-PCR およびウエスタンブロッティングを施行し、癌細胞株に対し抗腫瘍効果が期待できる至適な刺激条件を検討する。

過去に申請者らが行った予備的な検討 (未報告) では、正常ヒト歯肉線維芽細胞と歯肉癌由来細胞株において、すでに数種類の遺伝子において発現の差異を確認している。

②口腔癌由来細胞株における cDNA マイクロア

レイを用いた包括的遺伝子解析

刺激条件決定後、回収した RNA を用いて cDNA マイクロアレイを施行し、LPS 刺激あるいは poly IC 刺激によって発現増強が認められる遺伝子を包括的に検討する。

③定量的 RT-PCR を用いた遺伝子発現レベルでの検討

RNA から MMLV 逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、②のスクリーニングでしぼり込まれた目的の遺伝子を Light Cycler を用いて定量的 RT-PCR を施行し、mRNA の発現量の定量を行う。定量的 RT-PCR により、mRNA レベルにおいて目的遺伝子の発現変化を詳細に検討する。

④目的遺伝子の蛋白産生レベルでの検討

③において発現増強が確認された遺伝子に対して、ウエスタンブロッティングを施行し、蛋白産生レベルにおいても産生増強が認められることを確認する。

平成20年度

①RIG-I 遺伝子導入による免疫機能賦活化の検討

平成19年度において確認された遺伝子の発現が、RIG-I 遺伝子導入後にどのように増強または減弱するかを Light Cycler を用いて定量的 RT-PCR を施行し、mRNA の発現量の定量を行う。また、ウエスタンブロッティングも同様に施行し検討する。

この際、RIG-I の導入条件は申請者が以前確立し報告した研究に基づいて行う。即ち、ベクターを用いて RIG-I 遺伝子を導入した際に、強制発現した RIG-I によって遺伝子導入に用いたベクターを駆逐しないよう、最適な導入条件を用いるものである。

②RIG-I 遺伝子導入後の cDNA マイクロアレイによる検討

導入条件決定後、RIG-I 遺伝子を前述の口腔癌由来細胞株に遺伝子導入し、細胞株間における癌関連遺伝子の発現の差異について検討する。対照群としては、正常ヒト歯肉線維芽細胞を用いる。

正常ヒト歯肉線維芽細胞に対する cDNA マイクロアレイのデータは、過去に申請者が交付を受けた平成17・18年度科学研究費補助金 (若手B：口腔粘膜における感染防御機構の解明ならびに遺伝子治療の基礎的研究) において解析済みであるため、これを応用するものである。

cDNA マイクロアレイによる網羅的解析によって発現の変化が認められた遺伝子に対して、定量的 RT-PCR およびウエスタンブロッティングを施行し対照群と比較検討する。

cDNAマイクロアレイによって得られたデータ間の総合的な統計解析処理に関しては、東北化学薬品(株)生命システム研究所に依頼する。

4. 研究成果

LPS 刺激では各種口腔癌細胞における RIG-ImRNA の発現上昇は認められなかった。polyIC 刺激では 3 種の口腔癌細胞の中で Ca9-22 のみで RIG-ImRNA の発現が濃度・時間依存性に上昇することが分かった。また、RIG-I 全長 cDNA を Ca9-22 に遺伝子導入したところ、効率良く遺伝子導入されることが分かった。

以上の結果から、歯肉癌由来の Ca9-22 を用いて、①polyIC 刺激、②RIG-I 遺伝子導入、③RIG-I 遺伝子導入+polyIC 刺激の 3 群の比較について cDNA マイクロアレイを用いて行い、polyIC 刺激ならびに RIG-I 遺伝子導入による Ca9-22 での遺伝子発現における抗腫瘍効果を検討することとした。また、平成 17・18 年度科学研究費補助金「口腔粘膜における感染防御機構の解明ならびに遺伝子治療の基礎的研究」における歯肉線維芽細胞における cDNA マイクロアレイの結果と比較することで、歯肉線維芽細胞と Ca9-22 間での RIG-I の抗腫瘍効果の差異も検討した。

マイクロアレイで得られた結果をもとに特徴的な発現パターンを示す遺伝子群の抽出を行うために、各群の比較のいずれかで発現変動を示した 4,376 遺伝子を対象に、階層クラスタリングを実施した。また、RIG-I 遺伝子導入および二本鎖 RNA 処理の影響の分子レベルでの理解を目的として、発現変動遺伝子に関するパスウェイの抽出を行った。

解析の結果、poly-IC 刺激では、サイクリンファミリー、CDK ファミリーおよび CDC25 ファミリーが発現減少する一方、細胞周期停止に関わる遺伝子の発現上昇が認められた。これらから細胞周期の G1/S 期および G2/M 期進行の抑制が示唆された。

RIG-I 遺伝子導入群では、サイクリンファミリー、CDK ファミリーおよび CDC25 ファミリーに発現減少が見られる点は poly-IC 処理の場合と共通している。また、S 期移行に関連する転写因子の発現減少および細胞周期停止に関わる遺伝子の発現上昇が認められた。これにより RIG 処理によっても G1/S 期および G2/M 期進行が抑制されることが推測された。

以上の結果をもとに発現変動遺伝子に対して RT-PCR およびウエスタンブロッティングを施行し対照群と比較検討した。その結果、Ca9-22 細胞株の細胞周期に影響を及ぼすも

のの中でも RIG-I を介した経路と介さない経路があることが明らかとなった。

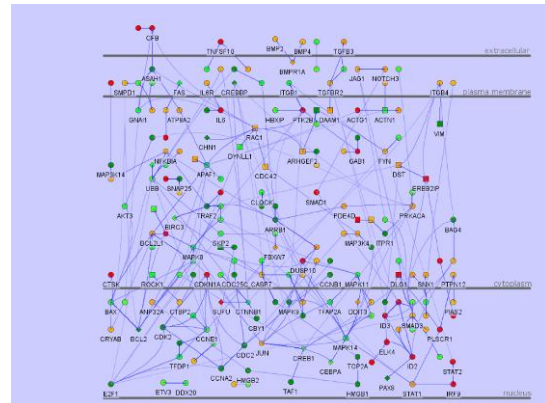


図 1 RIG-I 遺伝子導入によるパスウェイ解析の結果

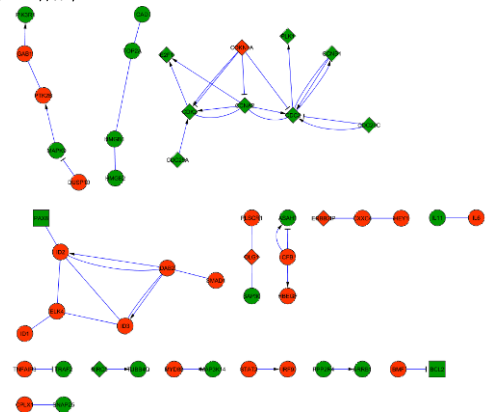


図 2 細胞周期に関するパスウェイ解析の結果

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 1 件)

- ① Sakaki H, Satoh H, Kobayashi W, Narita K, Asano T, Kimura H, A case of pleomorphic adenoma in the palate detected by positron emission tomography/computed tomography screening for cancer, Asian J Oral Maxillofac Surg, 20, 97-101, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

榊 宏剛 (SAKAKI HIROTAKA)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90374850

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：