HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TRUE Gene silencing法を用いたcyclin D1の発現抑制による頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖抑制［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	飯塚, さとし
Description	配架番号：2132
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11650号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58861
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Iizuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医学）　氏名　飯　塚　さとし

学位論文題名

TRUE Gene silencing 法を用いた cyclin D1 の発現抑制による
頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖抑制
（Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing）

【背景と目的】

頭頸部癌は世界で年間 55 万人以上が罹患している疾患である．現在，頭頸部癌の治療としては手術，放射線治療，化学治療の３つがあり，これらを複合的に組み合わせて行われている．近年，個々の治療法の進歩は認められるものの，予後に関しては、この 20 年で著しい改善は認められていないのが現状であり，より効果的な薬剤の開発が望まれている．

これまでの研究から，一部の頭頸部扁平上皮癌細胞では，細胞周期の進行制御に関与するタンパク質である cyclin D1 が過剰発現し，これが予後不良因子であることが報告されている．このため，cyclin D1 の発現を抑制させることにより予後が改善され得る可能性も考えられ，cyclin D1 を標的とした分子標的薬や RNA 干渉等の研究が行われてきた．しかしながら，効果的な薬剤の開発が困難なため，これまで臨床への応用が進んでいない．そこで RNA 干渉法等に比較してより容易で低コストの新しい遺伝子発現抑制法に着目した．tRNase ZL (tRNA 3'processing endoribonuclease) は tRNA 前駆体や小さな tRNA 前駆体に類似した RNA 複合体を認識し切断することができる酵素である．すべての真核細胞に存在するこの酵素の性質を利用して，7～30 塩基の small guide RNA (sgRNA)を用いて RNA を任意の部位で特異的に切断する方法が開発されてきた．これを用いた遺伝子発現抑制法を tRNase ZL-utilizing-efficacious gene silencing (TRUE gene silencing)法と呼ぶ．本研究では，この TRUE gene silencing 法を用い cyclin D1 を標的とした sgRNA を設計・合成し，頭頸部扁平上皮癌細胞培養系においてこれらの導入による cyclin D1 発現抑制および増殖抑制作用を調べると共に，抗癌剤との併用による効果を明らかにすることを目的とした．

【材料および方法】

Human cyclin D1 mRNA の二次構造を解析し，tRNaseZL に認識されうる部位を 6 ヶ所選び，5'-half-tRNA (HT)型，heptamer (H)型および linear (L)型の sgRNA (sgHT1-6, sgH1-6 および sgL1-6) を設計し，これらの 2'-O-methyl 化した RNA を化学合成した．ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株である HSC-2 もしくは HSC-3 細胞を培養用プレートに播種し，lipofectamine2000 添加もしくは無添加で種々の sgRNA を導入した．対照としては cyclin D1 siRNA を用いた．さらに細胞を培養後，全 RNA を抽出し，リアルタイム PCR 法により cyclin D1 mRNA 量，ウエスタンブロット法により cyclin D1, RB および pRB のタンパク量を測定した．また，sgRNA に加えてシスプラチンの添加を行い，その効果について調

べた．細胞周期を fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (FUCCI)を用いたリアルタイム観察法，生細胞数については WST-8 を用いた方法，DNA 合成量を bromodeoxyuridin（BrdU）ELISA 法，カスパーゼ 3/7 活性は Caspase-Glo 3/7 Assay System および Caspase-3/7 green detection reagent を蛍光による方法を用いて測定した．さらに，sgRNA の細胞内への取込みを Alexa568 標識した sgRNA を用い蛍光顕微鏡による観察を行った．また，核およびミトコンドリアの染色も行い細胞内での局在を観察した．

【結果】

HSC-2 および HSC-3 細胞における cyclin D1 mRNA 量は，設計した各種 sgRNA の導入によって 20-70%のレベルに低下した．設計した sgRNA の標的部位によって抑制効果には差があり，HT 型では sgHT-2 および sgHT-5 による抑制効果が大きかった．これらの 2'-O-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬を用いないで培地に加えただけで，細胞内に取り込まれ核周辺の細胞質に局在し，加えた sgRNA の量に応じて cyclin D1 mRNA レベルが低下した．cyclin D1 のタンパクレベルについても同様に減少が認められた．Cyclin D1 の標的である RB のリン酸化も抑制された．これらの sgRNA の導入によって，HSC-3 細胞の細胞周期が G1/G0 期の割合が増加し，細胞の DNA 合成量が減少した．カスパーゼ 3/7 活性についても増加した．sgRNA のタイプ（HT 型，H 型および L 型）による違いは cyclin D1 発現抑制活性には大きな差異は認められなかった．また， HSC-3 細胞に抗癌剤であるシスプラチンを加え培養すると生細胞数が減少したが，sgHT-2 もしくは sgHT-5 を加えたところシスプラチン単独時に比べ，さらに減少した．

【考察】

適切に設計された 2'-O-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬等なしで HSC-2 や HSC-3 細胞に取り込まれ，おそらく細胞内で cyclin D1 mRNA と複合体を形成し tRNaseZL によって切断されたと考えられた．これにより頭頸部扁平上皮癌細胞において cyclin D1 のタンパク量が減少し，その標的である RB のリン酸化を低下させ，細胞周期を G1/G0 期にとどまらせることによって細胞増殖を抑えたと考えられた．カスパーゼ 3/7 活性の増加からアポトーシスの誘導も考えられた．sgRNA の効果は，設計部位により異なることから，適切な部位の選択が重要であると考えられた．2'-O-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬を使用せずに細胞内への導入が可能であり，今後の臨床への応用にとって有利な点と考えられた．また，cyclin D1 の発現抑制に効果的な sgRNA はシスプラチンと併用することによって，癌細胞数をさらに減少させたことから，これらの sgRNA が抗癌剤の感受性を増大させた可能性が考えられ，癌細胞増殖に対する協同的阻害作用を示唆しており，今後より詳細な検討が必要と考えられた．

【結論】

本研究は，新たな遺伝子発現抑制法である TRUE gene silencing 法によって cyclin D1 mRNA を標的とした sgRNA を用い，頭頸部扁平上皮癌細胞の cyclin D1 の発現抑制を介して癌細胞の増殖を抑制できることを培養細胞で明らかにしたものであり，本法による頭頸部癌の有用な治療手段としての応用への可能性が示された．