



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11650
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58863
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Iizuka.pdf



学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

飯塚 さとし

Satoshi Iizuka

学 位 論 文

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)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

飯塚 さとし

Satoshi Iizuka

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	12 頁
考察	28 頁
総括および結論	32 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Satoshi Iizuka, Nobuhiko Oridate, Masayuki Nashimoto, Satoshi Fukuda, Masato Tamura

Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing

PLoS One. 9(12):e114121, 2014.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Satoshi Iizuka, Nobuhiko Oridate, Masayuki Nashimoto, Satoshi Fukuda, Masato Tamura

Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by sgRNA targeting cyclin D1 mRNA on TRUE gene silencing.

第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日～5 日, 横浜

緒言

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、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る^{1,2)}。その原因の一端として、頭頸部癌の抗癌剤抵抗性が挙げられており、より効果的な薬剤の開発が望まれている。

Cyclin D1 は細胞周期を調節するタンパク質 G1/S サイクリンの 1 つである。ヒト cyclin D1 遺伝子 (*CCND*) は chromosome11q13 に存在し、この領域の転座によるがん遺伝子として 1991 年に発見された。Cyclin D1 は CDK と複合体を形成し核内に移行し、Rb をリン酸化し、E2F や cyclin E の転写活性化をもたらし細胞を G1 期から S 期へ移行させる³⁾。サイクリンは、必要時に一過性に合成され機能することで細胞周期を調節しており、細胞増殖には必須であるが、同時にその発現異常は細胞周期調節に異常をきたし、細胞の癌化に関与すると考えられている⁴⁾。

Cyclin D1 遺伝子の存在する chromosome11q13 領域の増幅が生じている癌として、古くから子宮癌、膀胱癌、食道癌などが報告されている。また、癌化によるさまざまな細胞内シグナル伝達系の癌遺伝子の活性化に伴って cyclin D1 の過剰発現が知られている^{4,5)}。耳鼻科領域の頭頸部癌でも cyclin D1 の過剰発現と、その過剰発現が予後不良因子であることが報告されている⁶⁾。例えば、頭頸部癌患者 53 症例を癌組織における cyclin D1 の過剰発現の有無で群別化し、全生存率および無病生存率を比較した報告では、cyclin D1 が過剰発現している群は、有意に予後が不良である⁷⁾。また Oridate らは、RNA 干渉法で cyclin D1 siRNA によって頭頸部癌細胞培養系で cyclin D1 の発現抑制に伴って、癌細胞の増殖低下とコロニー形成能が低下したと報告している⁸⁾。これらより、cyclin D1 の発現抑制により、予後の改善の可能性も考えられ、アンチセンスや RNA 干渉等の遺伝子発現抑制法や cyclin D1 を標的とした分子標的

薬に関する研究が行われてきた⁴⁾。しかしながら、効果的な薬剤の開発は困難であり、臨床への応用は進んでいないのが現状である。

本研究では、RNA 干渉等に比較して、より容易で低コストの遺伝子発現抑制法である TRUE gene silencing 法に着目した。tRNase ZL (tRNA 3'processing endoribonuclease) は tRNA 前駆体や、tRNA 前駆体に類似した RNA 複合体を認識し、切断できる酵素である⁹⁾。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¹⁰⁻¹²⁾。これを用いた新しい遺伝子発現抑制法を tRNase ZL-utilizing-efficacious gene silencing (TRUE gene silencing) 法とよぶ¹³⁾。本法の原理は標的 RNA の塩基配列に相補的に sgRNA が結合し、上記の tRNA 類似 RNA 複合体が形成され、この構造を細胞内の tRNase ZL が認識し特異的に切断するというものである。sgRNA は 4 種類 (5' -half-tRNA 型, heptamer 型, hook 型および 14-nt linear 型) に分類されるが、これらは 7～30 塩基対と非常に短いため、合成も低コストである^{10, 14)}。また塩基が短く、ある種の細胞ではトランスフェクション試薬を用いずに細胞内に取り込まれるとする報告がある^{15, 16)}。これまでこの TRUE gene silencing 法を用いて、ヒト培養細胞での Bcl-2, Glycogen synthase kinase (GSK)-3 β , vascular endothelial growth factor (VEGF), WT-1 などの発現抑制が報告されている^{13, 16, 18, 19)}。また、2013 年には、ヌードマウスの皮下にヒト白血病細胞株である HL60 細胞を移植したゼノグラフト実験で、sgRNA の投与によりマウスの生存率の上昇が報告されている¹⁷⁾。

本研究では TRUE gene silencing 法を用い cyclin D1 を標的とした数種の sgRNA を設計し、ヒト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ともに、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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

BrdU: bromodeoxyuridine

CDK: Cyclin-dependent-kinase

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FBS: fetal bovine serum

FUCCI: fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HSC: Human squamous carcinoma

PCR: Polymerase chain reaction

SD: Standard deviation

sgRNA: small guide RNA

TRUE gene silencing: tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing

実験方法

細胞培養

ヒト頭頸部癌由来 HSC-2 細胞および HSC-3 細胞の培養には、10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories; Pasching, Austria) および 100 μ g/ml のカナマイシン (Meiji Seika ファルマ, 東京)を加えた RPMI-1640 培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を使用した²⁰⁾. これらの細胞は、37°C, 5%CO₂ 下で培養を行った.

試薬

シスプラチン (cis-diammine dichloroplatinum; CDDP) はヤクルト (東京) 製を使用した。

RNA 合成

ヒト 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、それぞれの部位に 5' -half-tRNA (HT)型, heptamer (H)型および linear (L)型の sgRNA (HT1-6, H1-6, L1-6) を設計した. これらの 18 種類の sgRNA について、5' 末端および 3' 末端両方をリン酸化・全塩基 2' -O-メチル化した RNA を日本バイオサービス (埼玉県朝霞) にて化学合成した. また 3' 末端を Alexa568 標識し、5' 末端がリン酸化され、全塩基 2' -O-メチル化が施されている 3 種類の sgRNA (sgHT5, sgH5, sgL5) も日本バイオサービスに委託し合成した. ネガティブコントロール sgRNA としては cyclin D1 mRNA 配列と全く関連がなく、これまで活性を有さないことが報告されている sgLucHep1, sgLucHep2, sgLucHep3, H5470 および H13782 を使用した^{17,18)}. ポジティブコントロールとして siRNA (Silencer® select pre-designed siRNA for mouse cyclin D1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用した.

合成した sgRNA の塩基配列を表 1 に示した.

表 1 : 設計した sgRNA の塩基配列

名称	塩基配列
HT1	5'-GCAGCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUUGUC-3'
HT2	5'-CCCGCUGUGGCGCAAUGGAUAACGCGAUUGG-3'
HT3	5'-GAUGUGCUGGCGCAAUGGAUAACGCGUGUCA-3'
HT4	5'-GGCACCGUGGCGCAAUGGAUAACGCGGCCUC-3'
HT5	5'-CGGCCUCUGGCGCAAUGGAUAACGCGCGCCA-3'
HT6	5'-ACACUUGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUAAUA-3'
H1	5'-GCAGCAG-3'
L1	5'-GCAGCAGCUCCUG-3'
H2	5'-CCCGCUG-3'
L2	5'-CCCGCUGCCACCAU-3'
H3	5'-GAUGUGC-3'
L3	5'-GAUGUGCAAAUUG-3'
H4	5'-GGCACCG-3'
L4	5'-GGCACCGCCCCUUC-3'
H5	5'-CGGCCUC-3'
L5	5'-CGGCCUCGGGGCCG-3'
H6	5'-ACACUUG-3'
L6	5'-ACACUUGUUAUAU-3'
sgLucHep1	5'-GGGCCAG-3'
sgLucHep2	5'-GAUCGAG-3'
sgLucHep3	5'-GAGCGAG-3'
H5470	5'-UUUUUCU-3'
H13782	5'-CUUCUUU-3'

トランスフェクション

sgRNA もしくは siRNA の培養細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を 1 ウェル (24 ウェル細胞培養用プレートを使用) あたり 3 μ L 用いて行った.

リアルタイム PCR による mRNA 量の測定

ISOGEN II (ニッポンジーン, 富山) を用いて, 各細胞から全 RNA を抽出した. それらの RNA から high capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems)を用いて cDNA を合成し, assay-on-demand TaqMan probes (Applied Biosystems)および ABI Prism 7000 sequence detection system を使用してリアルタイム PCR を行った. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を内部コントロールとして用い, $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて cyclin D1 mRNA 量を定量した.

ウェスタンブロット解析

プロテアーゼインヒビター(Complete mini, Roche, Indianapolis, IN, USA) とフォスファターゼインヒビターカクテル PhoSTOP (Roche) を添加した CellLytic-M Mammalian cell lysis/extraction reagent (Sigma-Aldrich) を用いて, 細胞からの全タンパク質を回収した. 回収したタンパク質を, SDS ポリアクリルアミド TGX ゲル(4-15%) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)で電気泳動し, そのゲルを PVDF メンブレン (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した. 転写後のメンブレンは一次抗体として anti-cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-phosphoRB (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-RB (Cell Signaling) もしくは anti- β -actin (GeneTex, Irvine, CA, USA) を用い, 室温で 1 時間反応させた. メンブレンを洗浄後, horseradish peroxidase 標識抗マウスもしくはウサギ IgG 抗体 (GE lifesciences, Pittsburgh, PA, USA)を二次抗体として用い, その

後 ECL prime detection system (GE lifesciences) を使用し LAS1000mini (フジフィルム, 東京) でそれぞれのタンパク質を検出した.

蛍光顕微鏡解析

コラーゲンコーティングした 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子, 大阪) に HSC-3 細胞を 1×10^5 個/mL で 2 mL 播種し, CO_2 インキュベーターで 24 時間培養, その後トランスフェクション試薬を使用せずに Alexa568 標識した sgRNA を 200 nM 添加し, 引き続き 24 時間 CO_2 インキュベーター下で培養した. その後 1xPBS 2 mL で 2 回洗浄した. 観察は倒立顕微鏡 (ニコン Ti-E), レンズは Plan Fluor 40x 対物レンズ (NA 0.75 ニコン) および Plan Apo VC 100x 対物レンズ (NA 1.40 ニコン) を使用した. 核およびミトコンドリアの染色は, それぞれ Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) および MitoTracker Green FM™ (Molecular Probes) を用いて行った.

FUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) による細胞周期の解析

HSC-3 細胞を培養し, コラーゲンコーティングした 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子) に細胞濃度 1×10^4 個/mL で 2 mL 播種し CO_2 インキュベーターで 24 時間培養後, sgRNA を 200 nM 添加し, 引き続き 24 時間培養した. BacMam gene delivery system (Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor BacMam 2.0, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を使用し細胞周期を観察した. すなわち, geminin-GFP 40 μL および Cdt1-RFP 40 μL を RPMI-1640 2 mL に混合し, この溶液で培地を交換し 1 時間培養し, その後溶液を RPMI-1640 2 mL で再度交換したのち 1x BacMam enhancer 2 μL を添加し, 引き続き 90 分 CO_2 インキュベーター下でインキュベートした. その後、再び培地を RPMI-1640 2 mL で交換し 16 時間培養した. 顕微鏡は confocal laser scanning

microscopy system (ニコン A1 Ti-E), レンズは Plan Apo VC 20x 対物レンズ (NA 0.75 ニコン) を使用し, 観察・撮影を行った.

カスパーゼ 3/7 活性測定

細胞のカスパーゼ 3/7 活性は, sgRNA もしくは siRNA を作用させてから 6 時間後の HSC-3 細胞において, caspase colorimetric assay (Caspase-Glo 3/7 Assay Systems, Promega, Madison, MI, USA)を用い, ルミノメーター (Glomax 20/20, Promega)を用いて発光量を測定した.

また, カスパーゼ 3/7 活性を有する細胞を以下のイメージング手法で観察・撮影した. HSC-3 細胞をコラーゲンコーティングした 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子) に細胞濃度 1×10^5 個/mL で 2 mL 播種し 24 時間培養後, sgRNA を 200 nM 添加した. 引き続き 24 時間培養の後, CellEvent Caspase-3/7 green detection reagent (Life Technologies)を最終濃度 $2 \mu\text{M}$ 加えて 30 分インキュベートした. 観察は倒立顕微鏡 (ニコン Ti-E), レンズは Plan Fluor 40x 対物レンズ (NA 0.75 ニコン) を使用し観察・撮影を行った.

BrdU (bromodeoxyuridine) ELISA による DNA 合成量の測定

細胞の DNA 合成量は Cell Proliferation Biotrak ELISA System (version 2, GE Healthcare) を用い ELISA 法により, 以下の方法で測定した. 培地に最終濃度 $1 \mu\text{L}$ の BrdU labeling reagent を加え, 24 時間培養した. 培地を除去し固定したのち, ブロッキング溶液を加え, 30 分間ブロッキングを行った. ペルオキシターゼ標識抗 BrdU 二次抗体を加え 60 分間インキュベート後, wash solution にて洗い, 基質である TMB (tetramethylbenzidine) を加え 5 分間反応させた. $1\text{M H}_2\text{SO}_4$ で反応を停止させたのち, マイクロプレートリーダー (iMark, Bio-Rad) を用いて 450 nm の吸光度を測定した.

生細胞数測定

生細胞の測定は CCK-8 assay (同仁化学, 熊本) を使用した. HSC-3 細胞を 24 ウェルプレートに培養し, WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) を各ウェルに 20 μ L 加え, 2 時間 CO₂ インキュベーターでインキュベート後, 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した.

統計学的解析

それぞれの実験においては 3 回の独立した実験を行ってデータを得, 図のデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した. 二群間の平均の検定には対応のない Student's t-test を用いて検定し, $P < 0.05$ を有意差ありとみなした.

実験結果

Cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA のデザインと頭頸部扁平上皮癌細胞における cyclin D1 の発現抑制

ヒト cyclin D1 mRNA (Genbank accession #NM_053056.2) の二次構造を解析し tRNaseZL によって認識されうる部位を 6 か所選定し、それら 6 か所の部位 (sites 1~6) における 5'-half-tRNA (HT) 型, 14-nt linear (L) 型および heptamer (H) 型の sgRNA 計 18 種類の塩基配列を設計した (図 1). 設計した sgRNA の型と部位を, それぞれ英略と数字で示している. 例えば, site2 の HT 型は sgHT2, site5 の H 型の sgRNA は sgH5 と表す.

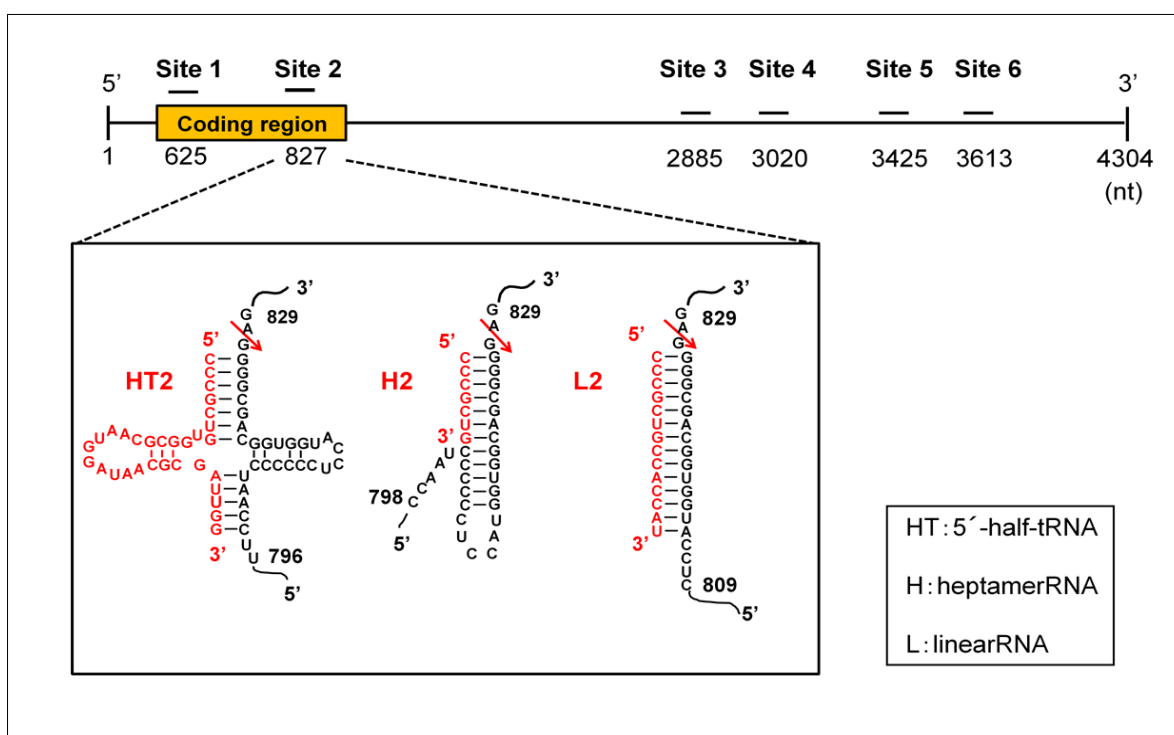


図 1 Cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA のデザイン.

ヒト cyclin D1 mRNA の 2 次構造より tRNase ZL が認識し得る部位を 6 か所 (sites 1~6) 選定し, それぞれの部位で HT 型, H 型および L 型の sgRNA を設計した. 図 1 の下には site 2 の HT2, H2 および L2 の塩基配列を示した.

設計した塩基配列の sgRNA を 5' 末端および 3' 末端両方をリン酸化・全塩基 2'-O-メチル化した RNA を化学合成した．初めに，どの部位を標的とした sgRNA が cyclin D1 mRNA の発現量を減少させるか検討するために，HSC-2 細胞に lipofectamine2000 を使用し 200 nM（最終濃度）の HT1~6 の sgRNA をトランスフェクションし，24 時間後の cyclin D1 mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した（図 2）．ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとしては，それぞれ 10 nM siRNA および 200 nM sgLucHep3 (control sg) を使用した．sgHT2, sgHT4 および sgHT5 の sgRNA では，cyclin D1 mRNA は何も加えていない場合（none）と比べて有意に減少し，それぞれおよそ 50%，56% および 39% のレベルに減少した（図 2）．siRNA 処理では，cyclin D1 mRNA は約 11% と著しく減少した（図 2）．

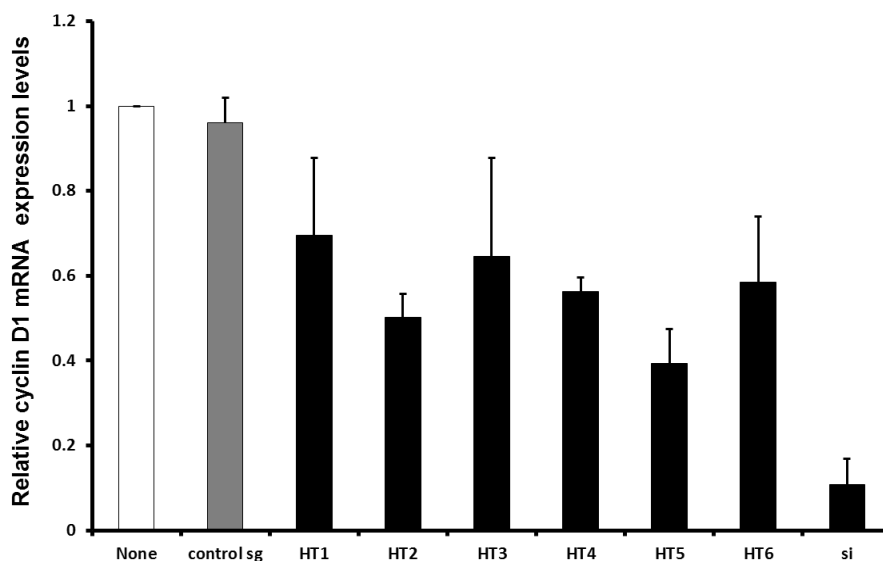


図 2 トランスフェクション試薬を用いて sgRNA をトランスフェクション後の cyclin D1 mRNA 発現量の減少

HSC-2 細胞を 1×10^5 cells/mL で 24 ウェル細胞培養プレートに 500 μ L 播種し 24 時間培養後，Lipofectamine2000 を用いて sgRNA (200 nM) (HT1-6) もしくは siRNA (10 nM) をトランスフェクションした．引き続き 24 時間培養後，RNA を抽出しリアルタイム PCR 法を行い，細胞の cyclin D1 mRNA 量を測定した．無処理細胞 (None) の値を 1 とし相対値を平均 $\pm$ SD で示した．コントロールとして sgLucHep3 を用いた．

これまでの報告から、2'-O-メチル化した sgRNA はトランスフェクション試薬を用いなくて単独で培地中に加えるだけで細胞内に取り込まれる可能性が示されている。そこで、トランスフェクション試薬を用いずに単独で HSC-2 細胞の培地中に sgRNA を添加し、24 時間後の cyclin D1 mRNA 量を測定した。siRNA では mRNA 量は 70%程度までしか減少しなかった。一方、sgRNA では sgHT2 が 31%, sgHT5 が 29%と有意に cyclin D1 mRNA 量が減少した (図 3)。

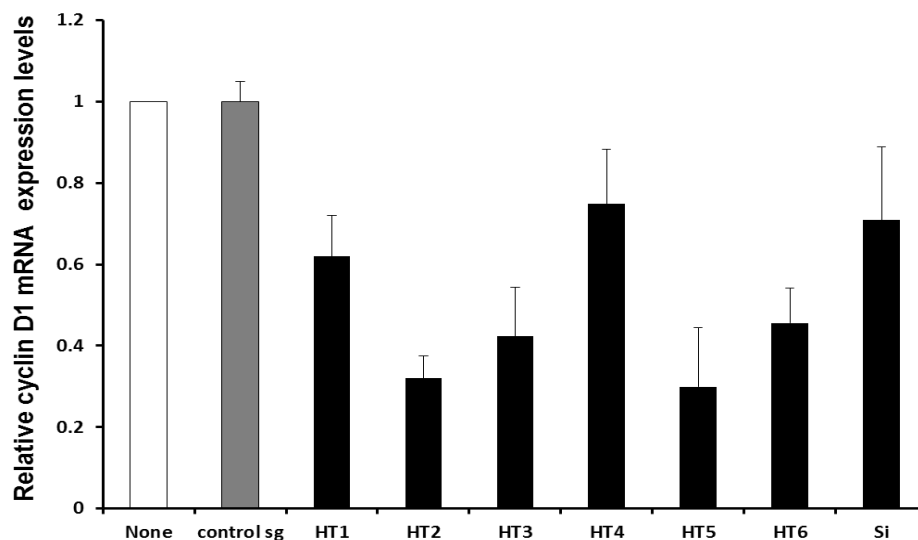


図3 sgRNA をトランスフェクション試薬を使用しないで培地中に加えた後の cyclin D1 mRNA 発現量の減少。

HSC-2細胞を 1×10^5 cells/mL で 24 ウェル細胞培養プレートに 500 μ L 播種し 24 時間培養後、培地中に単独で sgRNA (HT1-6) (200 nM) もしくは siRNA (10 nM) を添加した。更に 24 時間培養後、RNA を抽出しリアルタイム PCR を行い、細胞の cyclin D1 mRNA 量を測定した。無処理細胞 (None) の値を 1 として相対値を平均 $\pm$ SD で示した。コントロールとして sgLucHep1 を用いた。

以上の結果から、ヒト cyclin D1 mRNA 上の site2 および site5 を標的とした sgRNA が TRUE gene silencing 法を用いた cyclin D1 発現抑制には有効であると考えられた。そこで、頭頸部扁平上皮癌細胞にトランスフェクション試薬を用いないで単独で sgRNA をどの程度の濃度で加えたとき、cyclin D1 mRNA をどの程度減少させるか検討した。

sgHT2 は加えた濃度を増加させるにつれて、cyclin D1 mRNA 量が 100 nM で 38%, 200 nM で 31%まで低下した。一方、siRNA はトランスフェクション試薬を用いていない場合には、cyclin D1 mRNA 量の低下は sgRNA の場合よりも少なかった (図 4)。これらより、トランスフェクション試薬を用いず単独で培地中に加えた場合でも、200 nM 程度の sgRNA が頭頸部扁平上皮癌細胞である HSC-3 細胞の cyclin D1 mRNA レベルを有効に低下させることが示された。

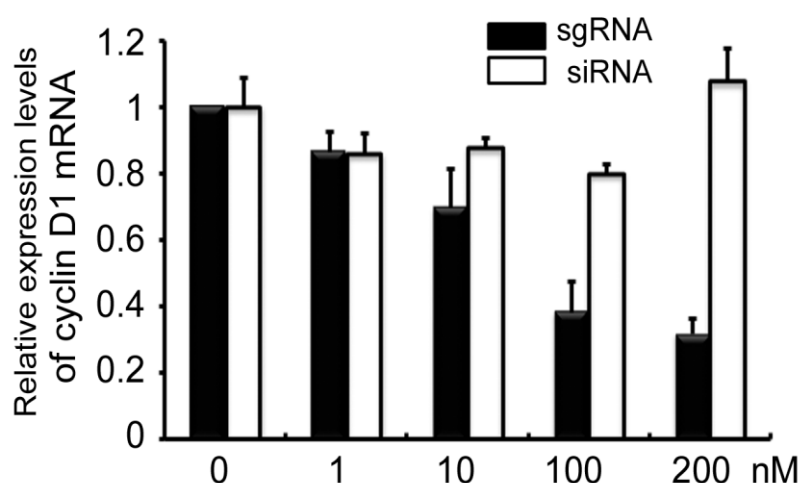


図 4 種々の濃度の sgRNA および siRNA を HSC-3 細胞にトランスフェクション試薬を使用しないで加えた後の cyclin D1 mRNA 発現量。

HSC-3 細胞を 1×10^5 cells/mL で 24 ウェル細胞培養プレートに 500 μ L 播種し 24 時間培養後、培地中に単独で図に示した濃度の sgHT2 もしくは siRNA を添加した。更に 24 時間培養後、RNA を抽出しリアルタイム PCR を行い、細胞の cyclin D1 mRNA 量を測定した。無処理細胞 (None) の値を 1 として相対値を平均 $\pm$ SD で示した。

次に sgRNA を培地に加えてからの cyclin D1 mRNA レベルの低下の時間経過を、sgRNA 添加後、RNA を回収し検討した。HSC-3 細胞において、200 nM の sgHT2 を加えたところ 6 時間後までは cyclin D1 mRNA はわずかな低下であったが、12 時間後で約 40%，24 時間後では 23% のレベルまで、時間経過とともに減少した。しかし 48 時間後では 24 時間後と同程度のレベルであった（図 5）。

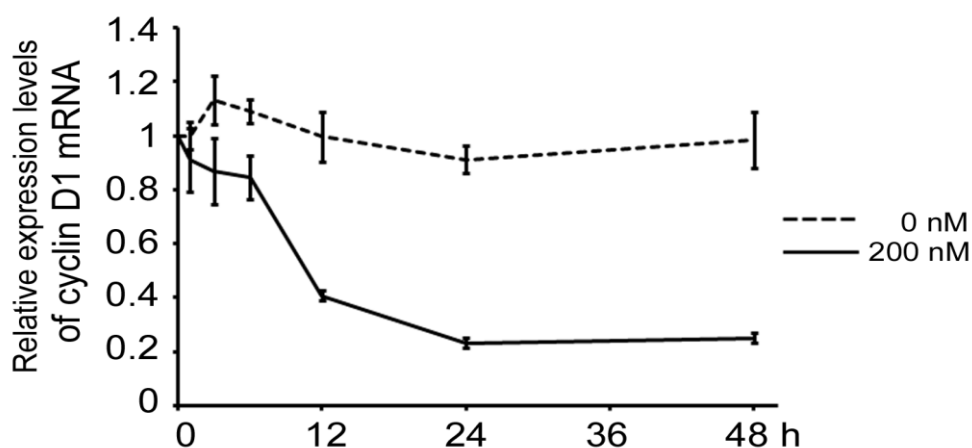


図 5 sgRNA および siRNA を HSC-3 細胞にトランスフェクション試薬を使用しないで加えた後の cyclin D1 mRNA 発現量の経時的変化。

HSC-3 細胞を 1×10^5 cells/mL で 24 ウェル細胞培養プレートに 500 μ L 播種し 24 時間培養後、sgHT2 (200 nM) を添加した。図に示す時間培養後、RNA を抽出しリアルタイム PCR を行い、細胞の cyclin D1 mRNA 量を測定した。無処理細胞 (None) の値 (0 時間) を 1 としして相対値を平均 $\pm$ SD で示した。

TRUE gene silencing 法で使用する sgRNA は, tRNA 類似 RNA 複合体形成において構造的に 4 種類に分類される^{11, 13, 14)}. これら sgRNA の構造の違いが cyclin D1 の発現抑制においてどのような効果を及ぼすかを明らかにするため, HT 型以外の H 型および L 型の sgRNA を用いて検討した. Cyclin mRNA の site 2 および site 5 を標的とした sgH2, sgL2, sgH5 および sgL5 (いずれも 200 nM) についてトランスフェクション試薬を用いないで培地に加えた場合, 24 時間後の cyclin D1 mRNA 量は sgHT2 もしくは sgHT5 の場合と同程度の減少を示し, sgRNA の型による大きな違いは認められなかった (図 6).

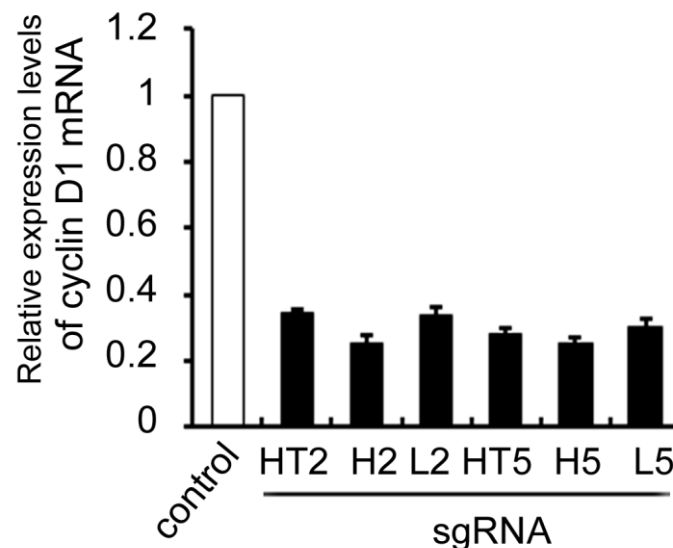


図 6 sgRNA の型の違いによる cyclin D1 mRNA 発現量減少に対する効果.

HSC-3 細胞を 1×10^5 cells/mL で 24 ウェル細胞培養ディッシュに 500 μ L 播種し 24 時間培養後, それぞれの sgRNA (200 nM) を添加した. 24 時間培養後, RNA を抽出しリアルタイム PCR を行い, 細胞の cyclin D1 mRNA 量を測定した. コントロールとして sgLucHep2 を用い, これを 1 として相対値を平均 $\pm$ SD で示した.

以上の結果から、適切に設計された sgRNA を用いた TRUE gene silencing 法によって、トランスフェクション試薬を用いずに頭頸部扁平上皮癌細胞の cyclin D1 mRNA の発現を抑制し得ることが示された。そこで、次にタンパクレベルでも cyclin D1 を抑制し得るかをウェスタンブロット解析で検討した。HSC-3 細胞にトランスフェクション試薬は用いずに sgHT5, sgH5 もしくは sgL5 を培地に加えたところ、コントロールの sgLucHep2 や何も加えていない場合と比べて、cyclin D1 のタンパク量は著しく低下した (図 7)。一方、Lipofectamine2000 を用いて siRNA をトランスフェクトした場合は cyclin D1 のバンドはほとんど検出されなかった。

Cyclin D1 は細胞内において CDK と複合体を形成し、その複合体が RB 蛋白のリン酸化を促進させる³⁾。リン酸化した RB (phospho-RB :pRB) は E2F 等の細胞内転写因子との結合能を失い、これらによって細胞周期を S 期に移行させる³⁾。そこで cyclin D1 mRNA の発現を抑制する sgRNA が、cyclin D1 のシグナル伝達の標的である RB のタンパクのリン酸化レベルにも影響を及ぼし得るかを検討した。sgHT5, sgH5 もしくは sgL5 による cyclin D1 のタンパクレベルの低下に伴って、pRB が低下し RB タンパク量は増加した (図 7)。これらの結果は、sgRNA による cyclin D1 の抑制が RB タンパクのリン酸化レベルにも影響を及ぼすことを示している。

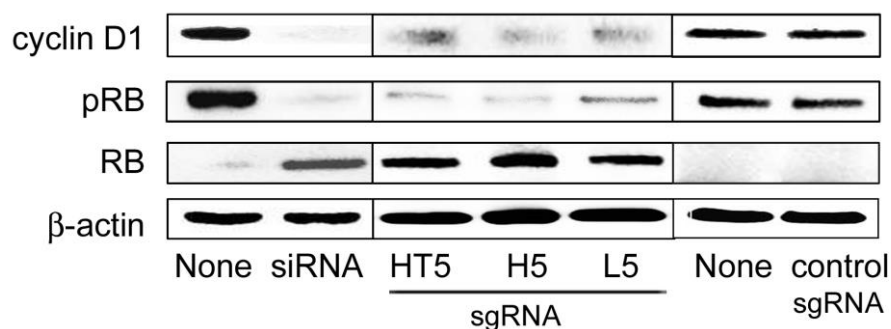


図7 HSC-3 細胞における sgRNA 添加後の cyclin D1, pRB および RB タンパク量.

HSC-3 細胞を 1×10^5 cells/mL で 24 ウェル細胞培養プレートに播種し 24 時間培養後、それぞれの sgRNA (200 nM) を添加した. 24 時間培養後、細胞からタンパク質を回収・可溶化しウェスタンブロット解析を行った. コントロールとして sgLucHep2 を用いた. siRNA (10 nM) は Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションした.

トランスフェクション試薬不使用下での sgRNA の頭頸部扁平上皮癌細胞内への取り込みおよび細胞内における sgRNA の局在

トランスフェクション試薬なしで頭頸部扁平上皮癌細胞内に 2'-O-メチル化した sgRNA が取り込まれていることを明らかにするために、Alexa568 で標識した sgRNA を HSC-3 細胞に取り込ませ、蛍光顕微鏡を用いて観察した. sgHT5, sgH5, sgL5 いずれの sgRNA も細胞内に取り込まれていた (図8). 細胞内への取り込み率を調べるため、これらの画像をランダムに 15 視野選び、視野内の細胞数における取り込まれた細胞数をカウントした. sgHT5, sgH5, sgL5 いずれの sgRNA でも、およそ 30~40% 程度の取り込み率であった (図8).

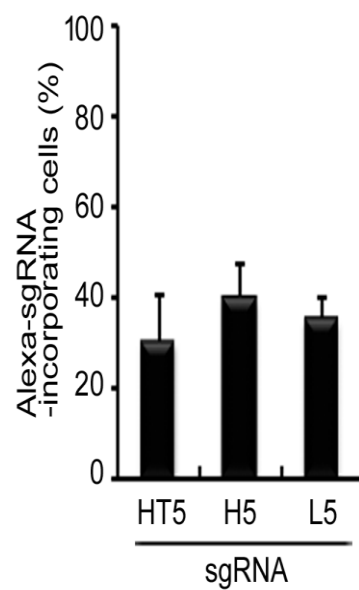
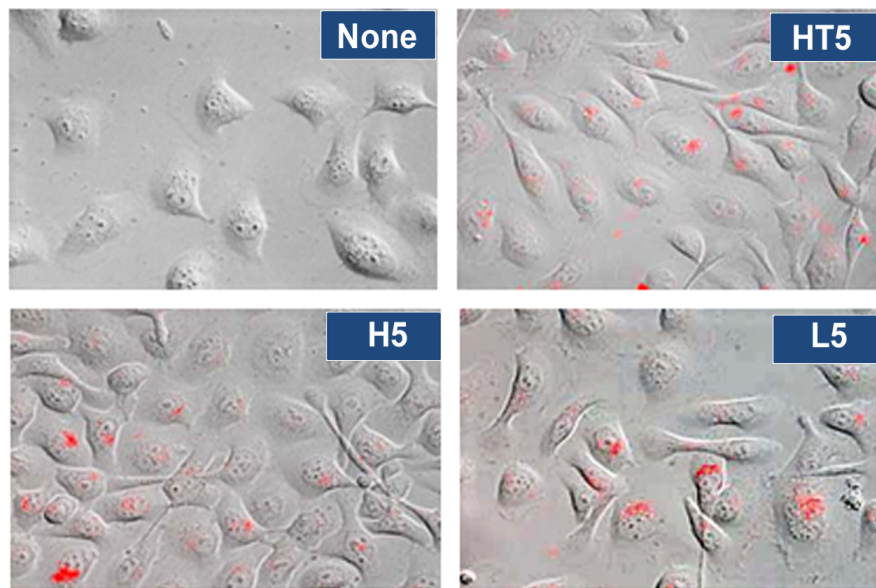


図8 HSC-3細胞における sgRNA の細胞への取り込み.

HSC-3細胞を 1×10^5 cells/mL で播種し 24 時間培養後, Alexa568 標識したそれぞれの sgRNA (200 nM) を添加した. ついで 24 時間培養したのち蛍光顕微鏡にて観察・撮影した (上図). 赤色が Alexa568 の蛍光を示している. 画像をランダムに 15 視野選び, 視野内の細胞数と取り込まれた細胞数をカウントし, 取込み細胞の全細胞数に対する割合をパーセント (平均 $\pm$ SD) で示した (下図).

次に、細胞に取り込まれた sgRNA の細胞内における局在を観察するため、同様に Alexa568 標識した sgRNA を添加し、さらに核およびミトコンドリアの染色も行い観察した (図 9)。細胞内局在を詳細に調べるためにラインスキャン法で検討したところ、取り込まれた sgRNA は主に核周辺の細胞質に集積し、ミトコンドリアには集積していなかった (図 9)。これらの結果から、2'-O-メチル化した sgRNA はトランスフェクション試薬を用いなくて培地に加えるだけで、頭頸部扁平上皮癌細胞内に取り込まれ、核周辺の細胞質に局在していることが示された。

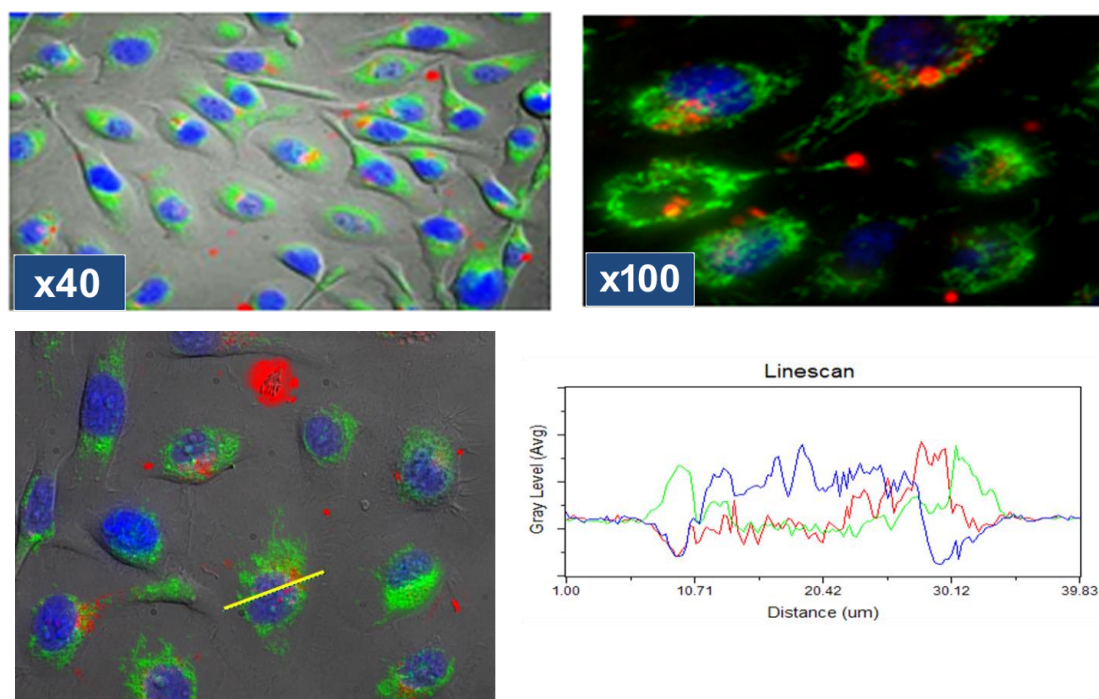


図 9 HSC-3 細胞における sgRNA の細胞内局在。

HSC-3 細胞を 1×10^5 cells/mL で播種し 24 時間培養後、Alexa568 標識した sgRNA (赤) を 200 nM 添加した。更に 24 時間培養した後、観察・撮影を行った。核およびミトコンドリアの染色は、それぞれ Hoechst 33342 (青)、MitoTracker Green FM™ (緑) を用いて行った。右下图は、左下图の線の部位のラインスキャンを示す。

Cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA の頭頸部扁平上皮癌細胞の細胞周期に及ぼす影響

Cyclin D1 は細胞周期調節タンパクの 1 つである．cyclin D1 が sgRNA によって抑制された結果，細胞周期に変化を及ぼし得るかを検討した．細胞周期を観察するために FUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) system を用いた．FUCCI は細胞周期の特定の時期に蓄積する二つのタンパク質分子，Cdt 1 と Geminin を用いて細胞周期の進行をリアルタイムに観察できる蛍光プローブである．Cdt 1 は G1 期にのみ存在し S/G2/M 期には存在しない．一方 Geminin は，DNA 複製から細胞分裂に至るまでの S/G2/M 期にのみ存在し G1 期には存在しない．そこでこれらのタンパクに蛍光色素を付け，その蛍光によって細胞周期の進行状況を可視化させたのが FUCCI system である²¹⁾．G1 期の細胞は赤，S/G2/M 期の細胞は緑の蛍光で可視化される．

HSC-3 細胞に sgH5 (200 nM) をトランスフェクション試薬等を使用しないで加え，FUCCI system を用いて観察した．陰性コントロール sgRNA (Hep1, sgLuc Hep1) および無処理の場合についても同様に行った．無処理 (None) および陰性コントロール(Hep1)の場合では，緑色蛍光を示す細胞が多くみられた．一方，sgH5 を加えた場合は，赤色蛍光を示す細胞が多く見られ，緑色蛍光細胞は少なかった (図 10)．撮影した画像をランダムに 5 視野選び，赤の蛍光を発する細胞 (G1 期) と緑の蛍光を発する細胞 (S/G2/M 期) の割合をグラフで示した (図 10)．sgH5 を作用させ cyclin D1 発現が抑制された HSC-3 細胞では，S/G2/M 期の細胞が減少し G1 期の細胞が増加し，頭頸部扁平上皮癌細胞の細胞周期の進行が阻害されていることが明らかになった．

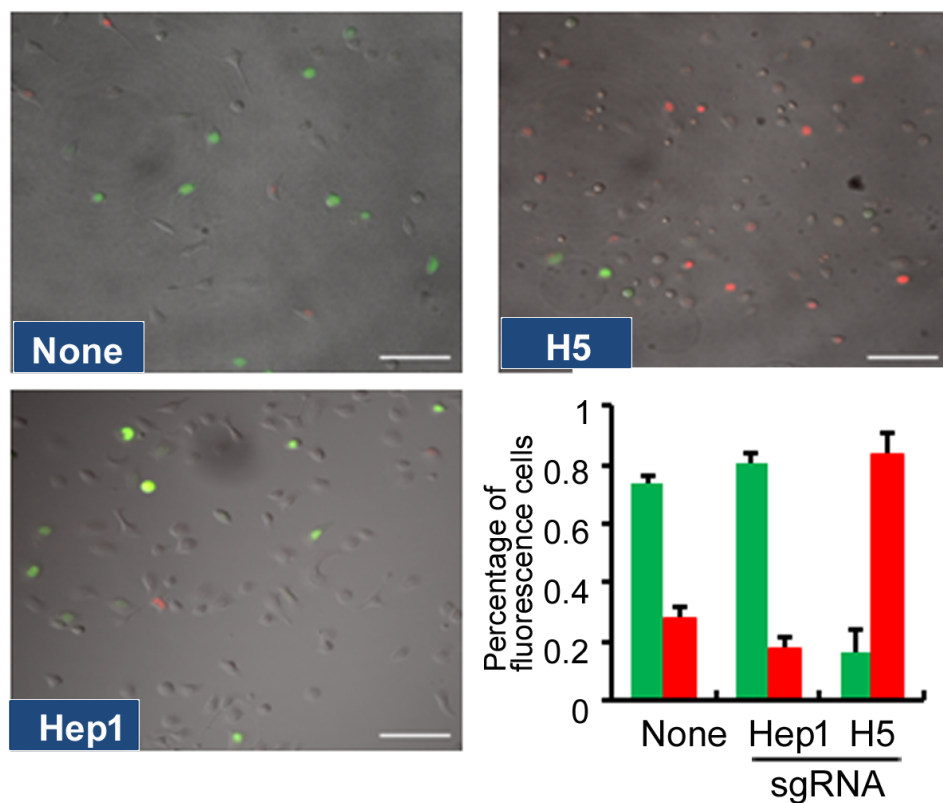


図 10. sgRNA による HSC-3 細胞の細胞周期の進行阻害.

HSC-3 細胞をガラスボトムディッシュに播種し、24 時間培養後 sgH5 (H5) を 200 nM 添加し、更に 24 時間培養した。コントロールとして sgLucHep1 (Hep1) (200 nM) を用いた。FUCCI Cell Cycle Sensor BacMam 2.0 を用い蛍光顕微鏡で観察・撮影を行った。赤が G1 期、緑が S/G2/M 期の細胞を示す。Scale bar ; 100 μ m. ランダムに 5 視野選び、赤と緑の蛍光を発する細胞数を数え、その割合 (平均 $\pm$ SD) をグラフで示した (右下)。

Cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA の頭頸部扁平上皮癌細胞のアポトーシスに及ぼす影響

細胞周期進行の阻害による頭頸部扁平上皮癌細胞のアポトーシス誘導の有無を調べるために、アポトーシスに關与するカスパーゼ 3/7 活性を測定した²²⁾。Cyclin D1 を抑制する sgHT2 および sgHT5 の sgRNA を作用させたところ、HSC-3 細胞のカスパーゼ 3/7 活性は有意に増加した (図 11)。その程度は、cyclin D1 の siRNA によるカスパーゼ 3/7 活性の増加よりも低かった。

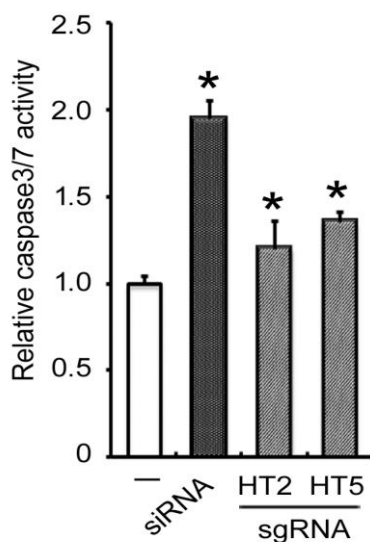


図 11. sgRNA 添加後の HSC-3 細胞のカスパーゼ 3/7 活性。

HSC-3 細胞を細胞培養プレートに播種し 24 時間培養後、sgRNA (200 nM) を添加した。さらに 6 時間培養後、caspase colorimetric assay を用いて細胞のカスパーゼ 3/7 活性を測定した。siRNA (10 nM) は Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションした。無処置の場合 (-) を 1 として相対値を平均±SD で示した。*P < 0.05

さらに、カスパーゼ 3/7 活性を緑色蛍光で検出する Caspase-3/7 green detection reagent を用いて観察した。Cyclin D1 の発現を抑制する sgRNA (sgHT5, sgH5 および sgL5) を作用させた細胞では、いずれもカスパーゼ 3/7 活性による緑色蛍光を発する細胞が認められた(図 12)。これらの結果から、cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA を作用させると頭頸部扁平上皮癌細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

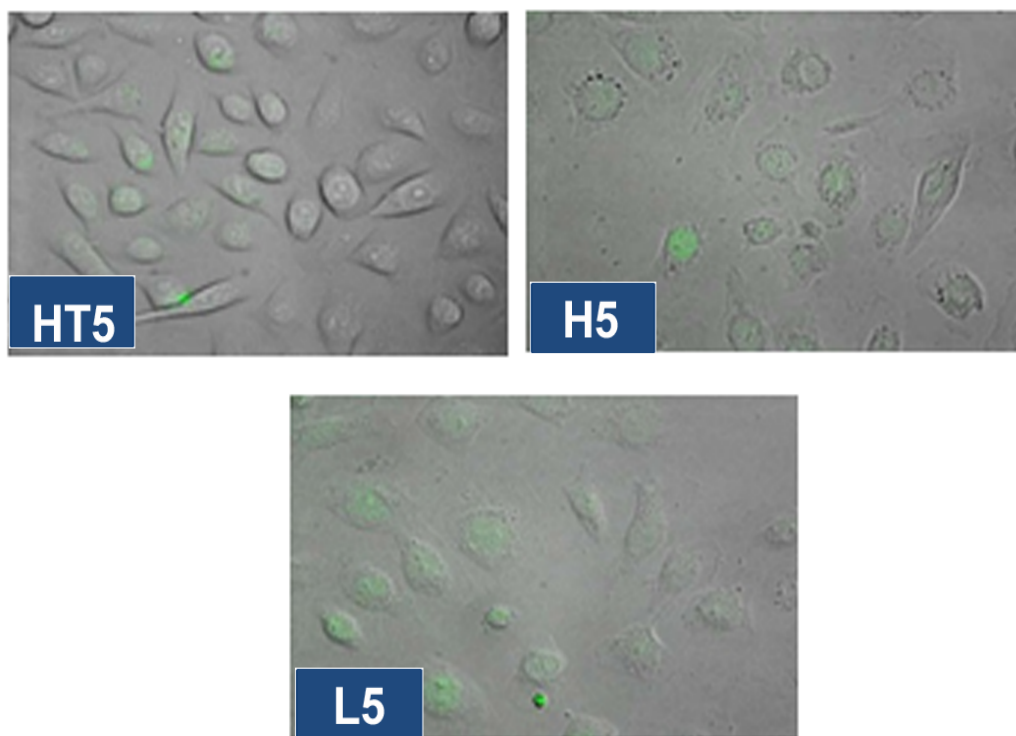


図 12. sgRNA 添加後の HSC-3 細胞のカスパーゼ 3/7 活性のイメージングによる解析。

HSC-3 細胞を 1×10^5 cells/mL で播種し、その 24 時間後に sgRNA (HT5, H5, L5) (200 nM) を培地に加えた。24 時間後に CellEvent Caspase-3/7 green detection reagent を加え 30 分培養した後に観察・撮影した。

Cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA の単独およびシスプラチン併用による頭頸部扁平上皮癌細胞の細胞増殖に及ぼす影響

シスプラチン (CDDP) はプラチナ製剤に属する抗悪性腫瘍剤で、DNA の二重らせんに架橋を形成して増殖を抑制する²³⁾。この作用は非常に強く、頭頸部扁平上皮癌における化学療法で中心的役割を果たしている。そこで cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA の単独およびシスプラチンとの併用の、頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖に及ぼす影響を、DNA 合成および生細胞数を測定して検討した。

DNA 合成は、細胞の bromodeoxyuridin (BrdU) の取り込み量を測定した。BrdU はチミジンのアナログであり、細胞周期の S 期特異的に DNA に取り込まれる。シスプラチン単独で HSC-3 細胞の BrdU の取り込み量は減少したが、sgHT2 もしくは sgHT5 をシスプラチンと同時に作用させたところ、BrdU の取り込み量はシスプラチン単独に比べて、さらに有意に減少した (図 13)。

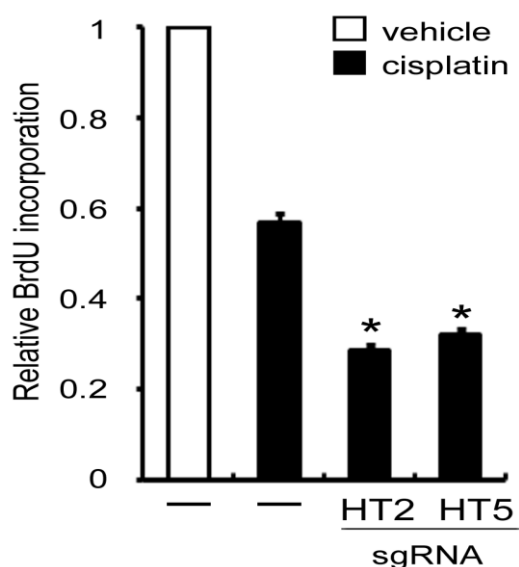


図 13. sgRNA およびシスプラチン添加後の HSC-3 細胞の DNA 合成量。

HSC-3 細胞を 1×10^4 cells/mL で 24 ウェル細胞培養プレートに播種し 24 時間培養後、sgRNA (sgHT2, sgHT5) (200 nM) を添加した。引き続き 24 時間培養後にシスプラチン 10 μ M を添加し (■ : cisplatin), 4 時間培養後に BrdU 取り込み量を測定した。無処理の場合 (□ vehicle) を 1 として相対値を平均 $\pm$ SD で示した。* $P < 0.05$

生細胞数は WST-8 を用いて測定した。sgHT2 もしくは sgHT5 を HSC-3 細胞に加えたところ、生細胞数は有意に減少した (図 14)。また、cyclin D1 mRNA をターゲットとした sgRNA である sgHT2 もしくは sgHT5 をシスプラチンと共に作用させたところ、HSC-3 細胞の生細胞数はシスプラチン単独に比べて、さらに大きく減少した (図 14)。

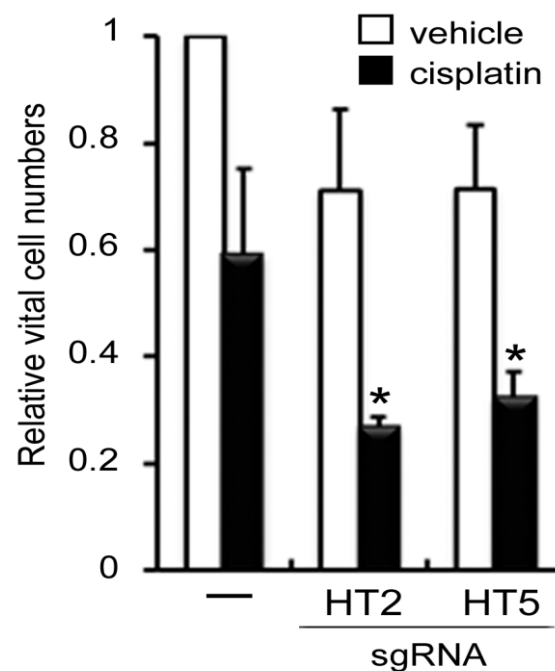


図 14. HSC-3 細胞における sgRNA およびシスプラチン添加後の生細胞数。

HSC-3 細胞を細胞濃度 1×10^5 cells/well で 24 ウェル細胞培養プレートに播種し 24 時間培養後、sgRNA (sgHT2, sgHT5) (200 nM) を添加した。引き続き 24 時間培養後にシスプラチン 10 μ M を添加し (■ : cisplatin), さらに 72 時間培養後に生細胞数を測定した。無処理の場合 (□ vehicle) を 1 として、相対値を平均 $\pm$ SD で示した。*P < 0.05

考察

一般にアンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA などの核酸分子を真核細胞に取り込ませるためにはトランスフェクション試薬、エレクトロポレーション法やリン酸カルシウム法などの手法を用いることが必要となる。しかし、近年、ある種のオリゴヌクレオチドはトランスフェクション試薬を必要とせずに細胞内に取り込まれ、効果を示すことが報告されている²⁴⁻²⁷⁾。本研究により、2'-O-methyl 化した sgRNA が、培地中への添加のみで HSC-3 細胞等の頭頸部扁平上皮癌細胞に、取り込まれることが示された。すでに、浮遊細胞であるヒト白血病細胞 HL-60 においても同様に 2'-O-methyl 化した sgRNA が細胞内に取り込まれることが報告されている^{16,17)}。本研究から、これら培養細胞への取り込みは、比較的、普遍的な現象であることが考えられた。

これらの sgRNA がどのような機序で細胞内に取り込まれるかは、まだ解明されていないが、HL-60 細胞においては chlorpromazine, nystatin もしくは methyl- β -cyclodextrin といったエンドサイトーシス阻害薬を用いても sgRNA のアポトーシス誘導作用や mRNA 抑制作用は減じることはなかったとの報告があり、sgRNA の細胞内への取り込み機構が clathrin, caveolae やラフト依存性のエンドサイトーシスいずれの経路も関与していないことが示唆されている²⁶⁾。同様に、Koller らも 1 本鎖で修飾したアンチセンスオリゴヌクレオチドが、これら経路に非依存性に細胞内に取り込まれたと報告している²⁹⁾。これらより、本研究の頭頸部扁平上皮癌細胞においても 2'-O-methyl 化した sgRNA は同様に clathrin や caveolae を介さない経路で細胞内に取り込まれている可能性が高いと考えられた。

Takahashi らは、取り込まれた sgRNA の細胞内局在が HL-60 細胞では、ミトコンドリアに多く観察されたと報告している¹⁶⁾。本研究では、HSC-3 細胞において核周辺の細胞質に多く局在しており、取り込まれた sgRNA の細胞内の輸送が細胞種によって異なっている可能性が考えられた。細胞内輸送について chloroquine もしくは brefeldin A を使用して阻害すると、TRUE gene

silencing 法による sgRNA のアポトーシス誘導作用が低下した²⁸⁾という報告もあり、sgRNA の細胞への取込みと細胞内輸送の詳細な機構の解明に関しては、今後の検討課題であろう。

細胞周期調節タンパクは抗腫瘍薬のターゲットの 1 つとして注目を集めている。Cyclin D1 の発現異常は頭頸部扁平上皮癌を含め、様々な種類の癌細胞で報告されており⁴⁾、また Ras 等を含めた他の発癌遺伝子によって誘導された癌においても cyclin D1 の発現の亢進が認められる。逆に、cyclin D1 活性を低下させたマウスでは腫瘍化が抑制されていたという報告がある^{30,31)}。さらに、cyclin D1 の過剰発現と予後との負の相関は頭頸部癌のみならず、肺癌、前立腺癌、乳癌、悪性黒色腫、多発性骨髄腫など多くの腫瘍で報告されている³²⁻³⁷⁾。

これらの報告から、現在 cyclin D1 は癌治療における分子標的治療のターゲット候補の 1 つと考えられている。しかしながら、cyclin D1 は核内機能タンパクであることから cyclin D1 を標的とする薬剤の開発は困難であり、cyclin D1 と複合体を形成する CDK を阻害する低分子化合物 PD0332991 (Pfizer) などが治験中ではあるが、未だ臨床への応用が進んでいない³⁸⁾。また cyclin D1 mRNA の翻訳を阻害する mTOR 阻害剤といったアプローチもされているが開発が進行していない³⁹⁾。

そこで、癌組織における cyclin D1 の発現増加を種々の遺伝子発現抑制法を用いて抑えるという手法が考えられ、アンチセンス法、アプタマー法や RNA 干渉法による cyclin D1 の発現抑制法が報告されている^{8,40-48)}。しかし、これら遺伝子発現抑制法のいずれを用いる場合でも、核酸を細胞内へ導入するためには、適宜トランスフェクション試薬もしくはリン酸カルシウム法、レトロウイルスやアデノウイルス等を用いる必要がある。本研究から、2'-O-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬を要しないで容易に癌細胞への導入が可能なことは、TRUE gene silencing 法の今後の臨床への応用にとって有利な点と考えられる。siRNA は Jak-Stat 経路を介してインターフェロン β を誘

導する。しかし、2'-O-methyl 化した RNA は、このインターフェロン β を誘導しないことが種々の細胞で報告^{15,49)}されており、この点も 2'-O-methyl 化した sgRNA を用いる TRUE gene silencing 法の、従来の遺伝子抑制法に比べて有利な点と考えられる。

これまでの報告から 2'-O-methyl 化した sgRNA は細胞内で標的 mRNA と複合体を形成し tRNaseZL によって認識され切断されると考えられている。Takahashi らは、tRNaseZL を siRNA でノックダウンさせた HL-60 細胞で sgRNA の効果が低下し、他方 tRNaseZL を過剰発現させると sgRNA の効果が増大したと報告している⁵⁰⁾。また、3'-RACE 法によって tRNaseZL によって切断された mRNA 断片が検出されている¹⁹⁾。本研究から、適切に設計された 2'-O-methyl 化した sgRNA は、HSC-2 および 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 によって切断されることにより、cyclin D1 mRNA 量を減少させたと考えられた。これにより cyclin D1 が減少し、その標的である RB のリン酸化が低下し、細胞周期が G1/G0 期にとどまったことにより、細胞増殖が抑えられたと推測された。細胞周期の進行阻害とアポトーシス誘導の機構は不明であるが、アポトーシスに関与するカスパーゼ 3/7 の活性化が認められたことから、アポトーシスの誘導も考えられた。これらの sgRNA の効果は cyclinD1 mRNA 上の設計部位によって異なることから、sgRNA の結合部位が重要であることが示唆され、標的となる mRNA の二次構造等を考慮した適切な設計の重要性が考えられた。

シスプラチンは、種々の固形癌の化学療法に広く使用されている抗癌剤の一つである。その作用機序は、DNA の同一鎖内または異なる DNA 鎖間での架橋を形成し DNA 合成を阻害し、いくつかのシグナル伝達経路を活性化し、アポトーシスに至り殺細胞効果を示すとされる²³⁾。そこで、本研究では頭頸部扁平上皮癌細胞に、cyclin D1 発現抑制に効果的な sgRNA とシスプラチンを併用さ

せた場合、どのような効果があるかも検討した。sgRNA とシスプラチンでは作用機構が異なるため、相加効果が予想されたが、sgHT2 と sgHT5 はシスプラチンによる HSC-3 細胞の細胞生存率を、さらに大きく減少させ、相乗効果が認められた。これらの結果は、cyclin D1 をターゲットとした 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いる。これらの点に関しては、今後、より詳細な検討が必要であろう。

以上より、シスプラチンと cyclin D1 をターゲットとした sgRNA の組み合わせは、頭頸部扁平上皮癌治療に有効である可能性が示唆された。また、低分子化合物や抗体といった分子標的薬と cyclin D1 をターゲットとした sgRNA の併用も考えられる。さらに cyclin D1 を標的とする sgRNA は、他の臓器の悪性腫瘍細胞にも効果を示す可能性もあり、今後、投与方法や全身投与における有効性、毒性の評価や薬物動態の解析のための動物実験が、将来の臨床応用を踏まえて必要とされるであろう。これらの検討により sgRNA の有効性と安全性が確立されれば、sgRNA と他の抗腫瘍薬との併用が可能となり、より効果的な治療につながると考えられる。

総括および結論

本研究は以下を明らかにした.

1. ヒト cyclin D1 mRNA を標的とし tRNaseZL によって認識され得る sgRNA を設計した.
2. 適切に設計された sgRNA の導入による TRUE gene silencing 法により, 頭頸部扁平上皮癌細胞培養系において cyclin D1 の発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで抑制させた.
3. 2'-O-methyl 化した sgRNA はトランスフェクション試薬等を用いなくとも頭頸部扁平上皮癌細胞内に取り込まれ, 核周辺の細胞質に局在した.
4. 適切に設計された sgRNA の導入によって, 頭頸部扁平上皮癌細胞において細胞周期の進行が抑制された. また, 一部の細胞ではアポトーシスに参与するカスパーゼ 3/7 活性が誘導された.
5. 適切に設計された sgRNA の導入によって, 頭頸部扁平上皮癌細胞において DNA 合成を低下させ, 生細胞数を減少させた. また, これら sgRNA はシスプラチンによる頭頸部扁平上皮癌細胞の細胞生存率をさらに減少させた.

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. 担癌マウス等を用いた動物実験を用い, これら sgRNA の有効性および安全性に関する検討が今後の課題である.

謝辞

博士學位論文を終えるに当たり、本研究の機会を与えて下さいますと共に、多くのご指導とご助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野の福田諭教授、横浜市立大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科の折館伸彦教授、新潟薬科大学健康・自立総合研究機構の梨本正之教授に甚大なる謝意を表します。直接ご指導頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔分子生化学教室の田村正人教授に心より感謝いたします。

また、sgRNA の設計の際にご助言を頂きました国立精神・神経医療研究センターの高橋昌幸博士、位相差顕微鏡等のイメージング研究に適切なご助言を頂きました北海道大学ニコンイメージングセンターの小林健太郎博士にも謝意を表します。併せて、本研究の遂行にあたり様々なご助言とご協力を頂きました耳鼻咽喉科・頭頸部外科分野の皆様に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90 (2011).
2. Jemal, A. *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**, 71-96 (2008).
3. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**, 153-166 (2009).
4. Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A. & Sutherland, R. L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 558-572 (2011).
5. Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M. R. & Cooper, C. S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **10**, 59-64 (2010).
6. Izzo, J. G. *et al.* Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* **17**, 2313-2322 (1998).
7. Higuchi, E. *et al.* Prognostic significance of cyclin D1 and p16 in patients with intermediate-risk head and neck squamous cell carcinoma treated with docetaxel and concurrent radiotherapy. *Head Neck* **29**, 940-947 (2007).

8. Oridate, N., Kim, H. J., Xu, X. & Lotan, R. Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin. *Cancer Biol Ther* **4**, 318-323 (2005).
9. Nashimoto, M. Anomalous RNA substrates for mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease. *FEBS Lett* **472**, 179-186 (2000).
10. Nashimoto, M. Specific cleavage of target RNAs from HIV-1 with 5' half tRNA by mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease. *RNA* **2**, 523-524 (1996).
11. Tamura, M. *et al.* Intracellular mRNA cleavage by 3' tRNase under the direction of 2'-O-methyl RNA heptamers. *Nucleic Acids Res* **31**, 4354-4360 (2003).
12. Takaku, H., Minagawa, A., Takagi, M. & Nashimoto, M. A novel 4-base-recognizing RNA cutter that can remove the single 3' terminal nucleotides from RNA molecules. *Nucleic Acids Res* **32**, e91 (2004).
13. Elbarbary, R., Takaku, H., Tamura, M. & Nashimoto, M. Inhibition of vascular endothelial growth factor expression by TRUE gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 924-927 (2009).
14. Shibata, H. S., Takaku, H., Takagi, M. & Nashimoto, M. The T loop structure is dispensable for substrate recognition by tRNase ZL. *J Biol Chem* **280**, 22326-22334 (2005).

15. Loke, S. L. et al. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3474-3478 (1989).
16. Takahashi, M. *et al.* A naked RNA heptamer targeting the human Bcl-2 mRNA induces apoptosis of HL60 leukemia cells. *Cancer Lett* **328**, 362-368 (2013).
17. Takahashi, M. *et al.* Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. *Leuk Res* (2014).
18. Nakashima, A. *et al.* Gene silencing by the tRNA maturase tRNase Z(L) under the direction of small-guide RNA. *Gene Ther* **14**, 78-85 (2007).
19. Watanabe, N. *et al.* Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA. *Leuk Res* **37**, 580-585 (2013).
20. Momose, F. *et al.* Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **18**, 391-395 (1989).
21. Sakaue-Sawano, A. *et al.* Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **132**, 487-498 (2008).
22. McIlwain, D. R., Berger, T. & Mak, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008656 (2013).

23. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279 (2003).
24. Stein, C. A. *et al.* Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res* **38**, e3 (2010).
25. Kastelein, J. J. *et al.* Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation* **114**, 1729-1735 (2006).
26. Sazani, P. *et al.* Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol* **20**, 1228-1233 (2002).
27. Vickers, T. A. *et al.* Modification of MyD88 mRNA splicing and inhibition of IL-1beta signaling in cell culture and in mice with a 2'-O-methoxyethyl-modified oligonucleotide. *J Immunol* **176**, 3652-3661 (2006).
28. Tamura, M., Kawano, M., Sato, M. & Nashimoto, M. Involvement of an intracellular vesicular transport process in naked-sgRNA-mediated TRUE gene silencing. *Mol Med Rep* in press
29. Koller, E. *et al.* Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes. *Nucleic Acids Res* **39**, 4795-4807 (2011).

30. Yu, Q., Geng, Y. & Sicinski, P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**, 1017-1021 (2001).
31. Kozar, K. *et al.* Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, 477-491 (2004).
32. Bova, R. J. *et al.* Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* **5**, 2810-2819 (1999).
33. Mineta, H. *et al.* Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **36**, 194-198 (2000).
34. Bali, A. *et al.* Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 5168-5177 (2004).
35. Thomas, G. R., Nadiminti, H. & Regalado, J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* **86**, 347-363 (2005).
36. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* **7**, 750-762 (2007).
37. Volavsek, M., Bracko, M. & Gale, N. Distribution and prognostic significance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx,

- hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol* **117**, 286-293 (2003).
38. Dickson, M. A. et al. Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. *J Clin Oncol* **31**, 2024-2028 (2013).
 39. Sabatini, D. M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* **6**, 729-734 (2006).
 40. Cagnoli, M., Barbieri, F., Bruzzo, C. & Alama, A. Control of cyclin D1 expression by antisense oligonucleotides in three ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* **70**, 372-377 (1998).
 41. Hung, W. C., Huang, J. S. & Chuang, L. Y. Antisense oligodeoxynucleotides targeted against different regions of cyclin D1 mRNA may exert different inhibitory effects on cell growth and gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 719-723 (1996).
 42. Schrump, D. S., Chen, A. & Consoli, U. Inhibition of lung cancer proliferation by antisense cyclin D. *Cancer Gene Ther* **3**, 131-135 (1996).
 43. Driscoll, B. *et al.* Cyclin D1 antisense RNA destabilizes pRb and retards lung cancer cell growth. *Am J Physiol* **273**, L941-949 (1997).
 44. Wang, M. B., Billings, K. R., Venkatesan, N., Hall, F. L. & Srivatsan, E. S. Inhibition of cell proliferation in head and neck squamous cell

- carcinoma cell lines with antisense cyclin D1. *Otolaryngol Head Neck Surg* **119**, 593-599 (1998).
45. Sauter, E. R. *et al.* Antisense cyclin D1 induces apoptosis and tumor shrinkage in human squamous carcinomas. *Cancer Res* **59**, 4876-4881 (1999).
 46. Kornmann, M., Arber, N. & Korc, M. Inhibition of basal and mitogen-stimulated pancreatic cancer cell growth by cyclin D1 antisense is associated with loss of tumorigenicity and potentiation of cytotoxicity to cisplatin. *J Clin Invest* **101**, 344-352 (1998).
 47. Arber, N. *et al.* Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* **57**, 1569-1574 (1997).
 48. Zhou, P. *et al.* Antisense to cyclin D1 inhibits growth and reverses the transformed phenotype of human esophageal cancer cells. *Oncogene* **11**, 571-580 (1995).
 49. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**, 834-839 (2003).
 50. Takahashi, M. *et al.* Elimination of Specific miRNAs by Naked 14-nt sgRNAs. *Plos One* **7** (2012).