

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592952

研究課題名(和文) レプチン遺伝子による上皮間葉移行制御の分子機構

研究課題名(英文) Regulation for invasion of OSCC by reptin

研究代表者

中原 寛和 (NAKAHARA, Hirokazu)

近畿大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70324796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が細胞外基質を分解する過程は、癌細胞の浸潤・転移に最も重要な過程である。クロマチンリモデリング因子、reptinは癌転移抑制遺伝子の発現を抑え、癌の浸潤・転移を制御するという報告されている。今回2種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株OSC-19細胞およびOSC-20細胞を用いてreptinをノックダウンしたところ、両者とも遊走能の亢進と細胞形態の紡錘形変化を認めた。上皮系マーカーであるE-cadherinの発現が低下と間葉系マーカーであるN-cadherinの発現の上昇を認めた。以上の結果よりreptinはEMTに関与することで口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The degradation of extracellular matrix (ECM) is one of the most important processes in the invasion and metastasis of malignant tumor cells. Reptin gene, is known a component of the chromatin remodeling complex, is reported that repress the expression of the metastasis suppressor gene and hence repress the invasion and metastasis of malignant tumor cells. In this study, using two cell lines derived from human oral squamous cell carcinomas, OSC-19 and OSC-20, we demonstrated that knockdown of reptin gene promoted mobility, changed those cells shapes to spindle, and suppress the expression of E-cadherin, promoted the expression of N-cadherin. These phenomena is indicated that reptin regulate the invasiveness into the ECM with relation to EMT (epithelial-mesenchymal transition).

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：癌の浸潤・転移 上皮間葉移行 レプチン 扁平上皮癌 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移の分野は国内外において活発に研究されている分野の一つである。癌の浸潤・転移過程においてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化が重要視されている。研究成果として発表しているように、フィブロネクチン分解・浸潤モデルを開発することにより、細胞が基質に対し浸潤する際、基質方向に対し突起様構造を呈し (浸潤突起 (invadopodia) と命名した) 基底膜基質への浸潤能が *in vivo* における癌転移能に大きく関与することを明らかにした (Nakahara et al. JBC, 1996)。同時に、浸潤突起にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの蛋白分解酵素の凝集が見られることを見出した (Nakahara et al. PNAS 1997)。これらの結果は癌細胞の基底膜浸潤には単にプロテアーゼの生化学的活性化のみでは不十分でそのプロテアーゼの局在性もまた重要なファクターであるというコンセプトを提示した。一方、低分子 GTP 結合蛋白の Rho ファミリー (Rho, Rac, Cdc42) の細胞骨格制御の研究は、近年最も注目を集めている分野で、英国の A. Hall ら、国内では高井義美博士 (神戸大学名誉教授、研究協力者) らによって、正常線維芽細胞の細胞接着・細胞運動などに関与していることが示された。そこでわれわれは Rho ファミリーが基底膜浸潤にいかにかかわっているかを検討し、invadopodia 形成には Cdc42 および Rac の活性化が必須であることを発表した (Nakahara et al. Gene to Cells 2003)。

2. 研究の目的

近年、クロマチン構造変換複合体ががんの浸潤・転移に大きく関与している知見が多く見られる。そこで本研究ではその複合体の一つである reptin の基底膜浸潤における役割に焦点を絞って研究を進めた。クロマチン構造変換複合体については、その役割については不明な点が多く、詳細な研究の余地のある分野である。その癌との関わりについては

2006年 Kim らによって初めて報告された (Kim et al. Nature cell Biol. 2006)。佐伯らは新規に WD40 repeat protein として Monad をクローニングし、機能解析をすすめたところ (Saeki et al. BBRC 2006)、reptin とインターラクションをもつクロマチン構造変換複合体の一つであることが分かった。そこでわれわれは reptin および Monad の機能解析とそれらの癌細胞の浸潤・転移への関わりを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞と培養

実験には浸潤様式の異なる 2 種のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である OSC-19 細胞および OSC-20 細胞を用いた。各細胞の培養は 10%FBS を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地を用いて、37°C 5%CO₂ の条件下で行った。継代培養には TRYPSIN-EDTA SOLUTION (1×) を使用した。

(2) Reptin の siRNA の配列と siRNA の導入

Reptin の siRNA の作成は QIAGEN 社 (USA) に依頼した。標的とする配列は 5' -CCGGAGATCCGTGATGTAACA-3' であり、その配列はセンス鎖が 5' -GGAGAUC-CGUGAUGUAACATT-3'、アンチセンス鎖が 5' -UGUUACAUCACGGAUCUCCGG-3' であった。siRNA の導入には SuperFect[®] Transfection Reagent を用い reptin の siRNA と SuperFect[®] Transfection Reagent を 20 分間室温で混合後、それぞれの細胞に添加し、導入後 48 時間の細胞をそれぞれの実験に使用した。また、siRNA は加えず、SuperFect[®] Transfection Reagent のみを作用させた細胞群を control 群とし、siRNA および SuperFect[®] Transfection Reagent の両者とも加えない野生株を wild type 群とした。reptin の発現は培養細胞および siRNA の導入細胞の抽出液を通常のウエスタンブロッティング法にて検出した。

(3) Invasion assay

ポアサイズ $8\mu\text{m}$ のケモタキセル[®]を用いた Boyden chamber の変法にて細胞浸潤能を検討した。塩化カルシウム、塩化マグネシウム無添加 phosphate buffered saline (以下 PBS(-)) で 50 倍希釈したマトリジェルマトリックス $50\mu\text{l}/\text{well}$ をケモタキセル[®]に入れてメンブランをコーティングした後、24 穴カルチャープレートにケモタキセル[®]を設置した。2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の reptin knockdown 群、control 群、wild type 群の細胞を DMEM 培地で $2.5 \times 10^4/100\mu\text{l}$ に調整し、その $200\mu\text{l}$ をケモタキセル[®]に加えた後、DMEM 培地 $500\mu\text{l}$ に浸漬させ、 37.0°C , $5.0\%\text{CO}_2$ の条件下に 24 時間培養した。培養後の細胞はディフ・クイック試薬にて H-E 染色を行った。光学顕微鏡を用いて、チャンバー上部より下部へ移動した癌細胞の数を数えた。各細胞群につき 3 視野を観察し、その平均値を求め、有意差検定を行った。

(4) Wound healing assay

Wound healing assay は以下の方法で行った。初めに、24 穴カルチャープレートの裏側に測定部位となる線を引き、2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の reptin knockdown 群、control 群、wild type 群の細胞を $1 \times 10^5/\text{well}$ で播種し、 $10\%\text{FBS}$ 含有 DMEM にて培養した。confluent になった状態で $1000\mu\text{l}$ のクリスタルチップの先で、初めに引いた線に垂直になるようスクラッチを行い、径約 1mm の wound field を作成し、6 時間後、12 時間後の測定部位上の wound field の幅を位相差顕微鏡にて観察した。その幅を Adobe photoshop[®] 上で計測し、初めの幅との差を各細胞が wound field 内を進展した距離とし、それを百分率で示した。

(5) ゼラチンザイモグラフィ

MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) の活性の検出には、ゼラチンザイモ電気泳動キッ

トを使用した。2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の reptin knockdown 群、control 群、wild type 群の無血清培養液 (24 時間無血清培養) をサンプルとし、同社のプロトコールに従って行った。サンプルを等量のサンプル調整バッファと混合し、室温で 15 分放置した後、 15mA の定電流で電気泳動を行った。泳動後、 $2\%\text{Triton X-100}$ 含有洗浄液 200ml にて 1 時間振盪し脱 SDS 化を行い、 $1\%\text{Triton X-100}$ 含有酵素反応用バッファ 50ml にてゲルを 37°C で 40 時間インキュベートした。その後、染色液にて 30 分間タンパク染色を行った後、脱色し、ゲルを観察した。

(6) 蛍光免疫染色

アクチン細胞骨格は、ファロイジンによる蛍光免疫染色にて観察した。直径 18mm のマイクロカバーガラスを敷いた 12 穴カルチャープレート (Corning) に $10\%\text{FBS}$ 含有 DMEM 培地で $2 \times 10^4/\text{well}$ に調整した 2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の reptin knockdown 群、control 群、wild type 群の細胞を播種し、24 時間培養した。培養液を除去後、 $3.7\%\text{ホルムアルデヒド}$ 溶液にて室温で 10 分間固定した。PBS(-) にて洗浄した後、PBS(-) にて $1/500$ に希釈した rhodamine phalloidin を 20 分間作用させ、再び PBS(-) にて洗浄し、染色を行った。蛍光イメージは Axiovert 200M 蛍光顕微鏡にて観察した。

(7) ウェスタンブロット

RIPA Lysis Buffer (1×) (Santa Cruz Biotechnology, USA) に protease inhibitor cocktail を添加し、細胞可溶液を作成した。2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の reptin knockdown 群、control 群、wild type 群の細胞を溶液にて可溶化し、ソニケーターにて細胞を粉砕、遠心後、上清を回収しサンプルとした。各種サンプルの蛋白質を MICRO PLATE READER MODEL 680[®] にて一定量に調整し、 10% 、 12.5% および $15\%\text{ポリアクリルアミド}$ ゲル上で電気泳動を行った。その後、ゲルを転写装

置にて PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 0.05% Tween20 含有 PBS 10ml にイムノブロック[®]を 500 μ l 加えた溶液にてブロッキングを行った。そして一次抗体として mouse monoclonal anti-human E-cadherin、mouse monoclonal anti-human N-cadherin、mouse monoclonal anti-human TIP49b、mouse monoclonal anti-human Cytokeratin AE1/AE3、mouse monoclonal anti-porcine Vimentin と反応させ、二次抗体として Horse radish 過酸化酵素 (HRP) を付与した horse anti-mouse IgG、goat anti-rabbit IgG、donkey anti-goat IgG と反応させた。0.05% Tween20 含有 PBS にて十分に洗浄を行い、ECL プラスウエスタンプ ロッティングシステムを用いて発光シグナルを増幅した後、KODAK Gel Logic 2200 にて現像した。現像したデータは Image J program を用いて数値化した。

4. 研究成果

(1) reptin 遺伝子のノックダウンが細胞浸潤能に与える影響

2種の口腔扁平上皮癌細胞の reptin 遺伝子を knockdown することによる細胞の浸潤能の変化を、ケモタキセル[®]を用いた Boyden chamber の変法で検討した。その結果、OSC-19 細胞では reptin knockdown 群が control 群に比べ約 2.5 倍に浸潤能が亢進した (Student' s t-test, * : p<0.05, ** : p<0.05)、OSC-20 細胞では約 2 倍の亢進が認められ (Welch' s t-test, * : p<0.05)、2種の細胞株とも reptin knockdown 群で有意に浸潤能が亢進していた。

(2) reptin 遺伝子の knockdown が郵送能におよぼす影響

癌細胞の局所浸潤には細胞の遊走能の亢進と細胞外基質の分解が必要と考えられているため、まず reptin 遺伝子を knockdown した際の細胞の遊走能の変化を wound healing assay を用いて検討した。wound

field への細胞の移動を 6 時間後、12 時間後に観察したところ、OSC-19 細胞の reptin knockdown 群において wound field 辺縁から増殖・移動してきた細胞による修復が時間経過とともに進行し、12 時間後にはスクラッチ部がほぼ細胞に満たされた。その結果を定量化したところ reptin knockdown 群は control 群と比較し、約 200%細胞の遊走能が有意に亢進していた (Welch' s t-test, * : p<0.05, ** : p<0.05)。さらに OSC-20 細胞においても同様に reptin knockdown 群で約 60%遊走能が有意に亢進していた

(Student' s t-test, * : p<0.05, ** : p<0.05)。

(3) 2種の口腔扁平上皮癌における reptin 遺伝子が基質分解酵素 (MMP-2, MMP-9) に与える影響

Reptin 遺伝子を knockdown した際の浸潤能の変化において、基質分解酵素がいかに関与しているのかを検討した。基質分解酵素のなかでも基底膜構成主成分である IV 型コラーゲンを分解し得る MMP-2 と MMP-9 に焦点をしばった。浸潤様式の異なる 2種の口腔扁平上皮癌細胞の各群において MMP-2 と MMP-9 の酵素活性の差異を、ゼラチンゼイモグラフィにて検討した結果、OSC-19 細胞および OSC-20 細胞ともに reptin knockdown 群、control 群、wild type 群の 3群で MMP-2 と MMP-9 の活性に差は認められなかった。

(4) reptin 遺伝子の knockdown による 2種の口腔扁平上皮癌細胞の形態変化

癌細胞が浸潤・遊走する際には、アクチン細胞骨格の再構成が起こることが知られている。そこで reptin 遺伝子を knockdown した 2種の口腔扁平上皮癌細胞の細胞骨格形態の変化を観察するため、OSC-19 細胞および OSC-20 細胞の各群の細胞を rhodamine phalloidin を用いて、アクチン細胞骨格の蛍光免疫染色を行った。OSC-19 細胞、OSC-20

細胞ともに control 群および wild type 群では類円形の不整な細胞形態を示したが、reptin knockdown 群では両者とも線維芽細胞様の紡錘形に形態が変化していた。

(5) 上皮間葉関連タンパクの発現変化

Reptin 遺伝子を knockdown した際の OSC-19 細胞と OSC-20 細胞の浸潤能の変化と上皮間葉移行との関わりを検討するため、まず 2 種の口腔扁平上皮癌細胞の各群における上皮間葉関連蛋白の発現について、ウエスタンブロット法を用いて比較した。上皮系マーカーである E-cadherin、Cytokeratin の発現に関しては OSC-19 細胞と OSC-20 細胞の各群で Cytokeratin の発現はほとんど変化がなかったが、E-cadherin の発現は両者とも reptin knockdown 群で低下していた。間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin に関しては、OSC19 細胞の reptin knockdown 群で N-cadherin の発現の上昇が見られた。一方、OSC-19 細胞の Vimentin、OSC-20 細胞での N-cadherin、Vimentin の発現の変化は認めなかった。

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 11 件)

- ① 岡本知子、中原寛和、内橋隆行、上田貴史、榎本明史、村尾直文、松井裕一、泉本貴子、安本実央、末松美由紀、鶴田由美子、谷口雅代、濱田傑 注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者の口腔管理についての臨床的検討 近大医学誌 38:73-77, (2013) 査読無
- ② 泉本貴子、中原寛和、榎本明史、松井裕一、内橋俊大、栗本聖之、内橋隆行、上田貴史、濱田傑 周術期院内紹介患者の歯性感染症治療 近大医学誌 37:69-72, (2013) 査読無
- ③ 榎本明史、上田貴史、内橋隆行、中原寛和、濱田傑. 歯性感染症におけるシタフロキサシン(グレースビット)の有用性.

Hospital Dentistry & Oral Maxillofacial Surgery. 24:61-64, (2013) 査読有

- ④ 内橋俊大、中原寛和、榎本明史、内橋隆行、栗本聖之、泉本貴子、濱田傑. 下顎骨に発生した良性歯原性腫瘍および悪性腫瘍の鑑別. 近畿大学医学雑誌 37:87-91, (2012) 査読無
- ⑤ Morimoto Y, Hamada S, Ogura T, Nakahara H, Enomoto A, Uchihashi T, Hiraoka S-i, Kogo M. A case of malignant melanoma discovered as a result of metastatic disease of the temporomandibular joint. Journal of Oral and Maxillo-facial Surgery, Medicine, and Pathology. 25:74-8, 2012 査読有
- ⑥ 内橋俊大、中原寛和、榎本明史、内橋隆行、栗本聖之、濱田傑：下顎骨に発生した良性歯原性腫瘍および悪性腫瘍の鑑別. 近大医学誌 37:87-91, (2012) 査読無
- ⑦ Enomoto A, Uchihashi T, Izumoto T, Nakahara H, Hamada S: Suppurative arthritis of the temporomandibular joint associated with bisphosphonate: a case report. J Oral Maxillofacial Surg 70:1376-1379, (2012) 査読有
- ⑧ Itoh Y, Nakahara H, Itoh, R, Ito A, Satou T. Osteoplastic ameloblastoma: a case report and literature review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 113: 23-28, (2012) 査読有
- ⑨ 栗本聖之、中原寛和、榎本明史、内橋隆行、内橋俊大、濱田傑：抗血栓薬服用患者および出血性素因を有する患者の歯科観血的処置について一医科と歯科との連携で安全に処置を行うために一近大医学誌 36:167-171, (2011) 査読無
- ⑩ Enomoto A, Nakahara H, Uchihashi T,

Tsuji H, Hamada S: FDG-positive Warthin's tumor in a neck node mimicking metastasis in primary intraosseous left posterior mandibular cancer staging with PET/CT. J Oral Maxillofacial. Surg. 69: 2052-2054, (2011) 査読有

- ⑪ Nakano Y, Nakahara H, Isomura (Tanaka) E, Fukuda Y, Uchihashi T, Kogo M: Adenomatoid hyperplasia of salivary gland at the uvula: Case report. J. Osaka Univ. Dent. Soc. 55: 111-114, (2011) 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 内橋俊大、中原寛和、古郷幹彦、稲生靖、藤堂具紀. 第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルス I 型 G47 Δ を用いた口腔扁平上皮癌新規治療戦略, 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 2014 年 1 月 23、24 日、札幌コンベンションセンター
- ② 中原寛和、森影恵理、榎本明史、上田貴史、内橋隆行、濱田傑. 当科における前癌病変の臨床統計的検討, 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2014 年 1 月 23、24 日、札幌コンベンションセンター
- ③ 内橋隆行、中原寛和、榎本明史、上田貴史、下出孟史、中谷貴範、森影恵里、森口侑可子、濱田傑. 破骨細胞抑制薬関連顎骨壊死への系統的口腔管理確立の試み, 第 58 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会. 2013 年 10 月 11、12 日、福岡国際会議場
- ④ 中原寛和、森影恵理、濱田傑. 当科における歯肉癌の臨床統計的検討, in 第 58 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会. 2013 年 10 月 11、12 日、福岡国際会議場
- ⑤ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Todo T. A NEW THERAPEUTIC STRATEGY FOR ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA USING G47 Δ, A THIRD GENERATION ONCOLYTIC HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE1, 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 Japan Society of Gene Therapy 2013 19th Annual Meeting. 2013 年 6 月 6, 7, 8 日、岡山コンベンションセンター
- ⑥ 中原寛和、森影恵里、濱田傑、当科における舌癌の臨床統計的検討, 第 37 回頭頸部癌学会. 2013 年 6 月 11、12 日、京王プラザホテル
- ⑦ 中原寛和、濱田傑、榎本明史、上田貴史、内橋隆行. 当科における頭部郭清施行症例の検討, 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2013 年 5 月 22, 23 日、栃木県総合文化センター
- ⑧ 中原寛和、森影恵里、濱田傑. 当科における口腔癌の臨床的統計的検討, 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2013 年 1 月 24, 25 日、秋葉原コンベンションセンター
- ⑨ 中原寛和、濱田傑、榎本明史、上田貴史、内橋隆行. 当科における頭部郭清施行症例の検討, 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2013 年 1 月 24, 25 日、秋葉原コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 寛和 (NAKAHARA, Hirokazu)
近畿大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70324796