

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15743

研究課題名(和文) SPARCを介する細胞競合制御による口腔扁平上皮癌の予防に向けての基礎的研究

研究課題名(英文) Involvement of SPARC-mediated cell competition on carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山本 哲也 (Yamamoto, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00200824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はSPARCが口腔扁平上皮癌の発癌初期においては細胞競合による淘汰からの回避に働き、癌の発生・進展において重要な役割を演じていることを報告してきた。本研究では、口腔扁平上皮癌の悪性化におけるSPARCの関与を検討した。株化口腔扁平上皮癌細胞および不死化口腔粘膜上皮細胞にSPARC発現ベクターを導入した結果、増殖能の亢進、導入細胞と非導入細胞との共培養系における非導入細胞の排除が認められたが、細胞間接着、浸潤、遊走能への影響は認められなかったことより、SPARCは癌の悪性化には関与しない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that SPARC plays important roles in the development and progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) through avoidance from exclusion of loser cells at cell competition. In this study, we examined the involvement of SPARC in malignant potentials of OSCC. Transfection of SPARC expression vector into OSCC cells and the immortalized oral mucosal epithelial cells resulted in enhanced proliferative capacity and exclusion of control cells in the co-culture system of SPARC overexpressed cells and control cells. On the other hands, the ability of adhesion, invasion, and migration were not affected, suggesting that SPARC may not be involved in malignant potentials of OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：細胞競合 扁平上皮癌 SPARC

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は単一あるいは数個の口腔粘膜上皮細胞が癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化という癌原性の突然変異を多段階的に蓄積することにより発生すると考えられている。したがって、口腔扁平上皮癌の発生初期においては癌の前駆細胞である癌原性細胞(異型細胞)がその周囲を正常細胞で囲まれた状態で存在し、この癌原性細胞と正常細胞の間では細胞間相互作用が生じていると考えられる。近年、この細胞間相互作用によって細胞競合が起こり、癌原性細胞が細胞競合の敗者(Loser)となって組織から排除されること、逆にこの細胞競合機構が破綻すると癌原性細胞が細胞競合の勝者(Winner)となり、浸潤・増殖して癌が発生することが明らかとなってきた¹⁾。その分子機構として、がん遺伝子産物 Myc を高発現している細胞は高い適応能を有して勝者となり、逆に Myc の発現が低い細胞は敗者となり細胞死に陥り貪食されるが、その一方で、敗者の細胞は SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) osteonectin の発現誘導を介して自己防衛シグナルを作用させ、細胞のアポトーシスを抑制することが知られている。

SPARC はもともと細胞外マトリックスに存在する分泌性のカルシウム結合タンパクであり、我々はこれまでに口腔扁平上皮の発癌における SPARC 発現の意義を検討し、SPARC は白板症の症例において異型度が強くなるにつれて陽性率が高くなり、早期浸潤癌では腫瘍細胞の多くに局在が認められる。

株化口腔扁平上皮癌細胞(OSC)細胞において siRNA により SPARC をノックダウンすると細胞の増殖能および遊走能が低下する。

株化 OSC 細胞に SPARC を導入すると非導入細胞が排除されることを明らかにした²⁾。これらのことは、SPARC は発癌初期においては細胞競合による淘汰からの回避に働くと

ともに、癌の発生・進展において重要な役割を演じていることを示唆している。SPARC は様々な癌において悪性度や予後との関連が報告されているが、口腔扁平上皮癌の発生における細胞競合の関わりの中で、SPARC がどのような機構を介して悪性化の過程に寄与しているかについては未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の悪性化において SPARC がどのようなシグナルを介して細胞動態に影響するのかについて検討する。

3. 研究の方法

不死化口腔粘膜由来上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞における SPARC 発現誘導機序の検討

不死化口腔粘膜上皮細胞(RT7細胞)および当科で樹立した株化口腔扁平上皮癌細胞(OSC-4)に、これまでに勝者細胞の上流で細胞競合を調節すると報告されている細胞競合関連タンパク質 c-Myc-GFP の発現ベクターを作製し、トランスフェクタントを樹立する。c-Myc 強発現細胞とコントロール細胞を共培養した際、Myc 強発現細胞の周囲において SPARC の発現誘導が生じるかを共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーにて検討する。

不死化口腔粘膜由来上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞の悪性化への SPARC の影響

RT7細胞およびOSC-4にSPARC発現ベクターを導入し、増殖能:MTTアッセイ、遊走能:Wound healing assay、浸潤能:Invasion cahmber assay、細胞間接着能:経上皮電気抵抗値(TEER)の測定およびFITC-dextranの透過アッセイ、接着能:フィブロネクチンコートウェルへの接着細胞数の計測を行う。

SPARC 導入不死化口腔粘膜由来上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞における下流シグナルの検討

コントロール細胞と SPARC 強発現細胞より蛋白を抽出し、Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D) を用いて下流のシグナルの関連について (JNK、MAPK、PI3K-Akt、JAK-STAT シグナルなど) 網羅的に検討を行うとともに、発現変化が認められた蛋白について Western blotting を行う。

4 . 研究成果

不死化口腔粘膜由来上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞における SPARC 発現誘導機序の検討

c-Myc 強発現細胞とコントロール細胞を共培養し共焦点顕微鏡にて観察した結果、RT7 および OSC-4 いずれにおいても、Myc 強発現細胞周囲に明らかな SPARC の発現誘導は認められなかった。また、フローサイトメトリーにて Myc 低発現細胞における SPARC の発現を解析したが、SPARC の発現への影響は認められなかった。

不死化口腔粘膜由来上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞の悪性化への SPARC の影響

RT-7 および OSC-4 に SPARC を強発現させた結果、増殖能の若干の亢進は認められたが、細胞形態、遊走能、浸潤能、アポトーシス誘導能への影響は認められなかった。また、細胞間接着能への影響を検討するため、チャンパー底面にそれぞれの細胞のモノレイヤーを形成させた後、FITC-dextran を添加し、チャンパーより漏れ出た dextran 量を計測したが、いずれの細胞においても SPARC 強発現の影響は認められなかった。また、フィブロネクチンコートしたウェルに細胞を播種し、3 時間後に接着した細胞数を計測したところ、SPARC 強発現により若干の接着細胞数の増

加が認められたものの、有意差は認められなかった。また、TEER においても SPARC 強発現の影響は認められなかった。

SPARC 導入不死化口腔粘膜由来上皮細胞および口腔扁平上皮癌細胞における下流シグナルの検討

コントロール細胞と SPARC 強発現細胞より蛋白を抽出し、Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D) を用いて SPARC の下流のシグナルへの影響について検討した結果、SPARC 強発現によりコントロール細胞の約 1.2 倍の FAK、Src のリン酸化の亢進が認められた。

以上のことより、口腔扁平上皮癌の発生、進展の過程において、SPARC は発癌初期においては細胞競合による淘汰からの回避に働き、癌の発生に重要な因子であるが、癌の進展には殆ど影響しない可能性が示唆された。

[参考文献]

1) Super competition as possible mechanism to pioneer precancerous fields. Rhiner C, Moreno E. Carcinogenesis 2009 30(5): 723-728.

2) SPARC is associated with carcinogenesis of oral squamous epithelium and consistent with cell competition. Yamada T, Ohno S, Kitamura N, Sasabe E, Yamamoto T. Med Mol Morphol. 2015 48(3):129-137. doi: 10.1007/s00795-014-0089-5.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00200824

(2)研究分担者

笹部 衣里 (SASABE Eri)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：40363288

北村 直也 (KITAMURA Naoya)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：70351921