

平成30年6月18日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20384

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の浸潤界面における細胞競合現象のプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteomic analysis of cell competition in the lateral invasion front of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

阿部 達也 (ABE, Tatsuya)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70634856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌・上皮内癌が非癌上皮との間に形成する明瞭な上皮内界面が、病理組織標本上でしばしば観察される。この癌・非癌界面は生体内での細胞競合現象の場であると仮説を立て、検証した。病理組織標本の検討で、界面に面する癌組織にアポトーシスや硝子体、細胞傷害との関連を示唆する組織・細胞変化を認めた。病理組織標本から選択採取した癌・非癌組織それぞれの界面近接・非近接組織を材料に、LC-MS/MSによるプロテオーム解析を行ったところ、癌あるいは非癌界面近接組織で特異的発現増減を示す7分子を同定した。以上より、これらの分子が、癌細胞が敗者となりうる細胞競合現象メカニズムに関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma (SCC) and carcinoma in-situ (CIS) frequently form the interface facing non-cancerous epithelium. I hypothesized cell competition might be occurred between cancer and non-cancerous cells in this interface. Thus, I investigated this interface histopathologically and performed proteomic analysis using LC-MS/MS. In histological analysis, apoptotic bodies, hyaline bodies, and other morphological changes suggesting cell damage were frequently observed in the cancer side adjacent to the interface. From proteomic analysis, 7 proteins, specifically increasing or decreasing in the cancer or non-cancerous sides adjacent to the interface, were identified. These proteins may be involved in cell competition between oral SCC/CIS cells and non-cancerous cells.

研究分野：病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 細胞競合 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜における扁平上皮癌 (SCC)・上皮内癌 (CIS) の病理組織標本で、上皮内を側方に進展 (側方浸潤) する癌組織は、隣接する上皮との間に、癌細胞と非癌細胞が直接に接触する界面を形成することがしばしば観察される。このような口腔扁平上皮癌-非癌界面は、サイトケラチン (CK) 17 および CK13 の免疫組織化学的手法によっても、CK17 陽性癌組織が CK13 陽性非癌組織と接触する場として客観的に認識できる (Mikami, Oral Oncol 2011)。

一方で、このような表現型の異なった細胞の接触界面は、近年の細胞生物学で最も注目される研究領域になってきた cell competition (細胞競合) (Johnston, Science 2009) という概念を想起させるものであった。これは異なる遺伝子変異状態の細胞が接触すると、両者に相対的な勝者・敗者関係が生まれ、敗者の細胞は排除される現象である。そこで細胞競合の視点から上皮内癌を捉え直す必要があることを認識するようになった。試験管内実験で明らかになってきた細胞競合関連分子を組織レベルで癌-非癌部境界において可視化できるのではないかと考えたのである。

そこで、口腔 SCC・CIS 組織標本、とくに明瞭な癌-非癌界面という異種細胞の接触する現場を材料に検証できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、“細胞競合 cell competition”という近年注目されてきた細胞生物学の研究主題を、口腔癌と非癌部との境界面に当てはめて、ヒト疾患を対象として細胞競合現象の出現状況を、プロテオーム解析を主たる手段として検証する。その研究結果をもとに口腔癌-非癌境界を可視化して悪性判定を客観化する方法を開発して病理診断に反映させるとともに、細胞競合現象を応用して癌細胞抑制という治療技術として臨床現場にトランスレーショナルな展開となる基礎研究を目指す。

3. 研究の方法

ヒト口腔粘膜 SCC・CIS ホルマリン固定パラフィン包埋標本を材料に、(1) 癌-非癌界面における組織レベルの形態変化を癌細胞側と非癌部とを区別してとらえ、(2) 界面に関与している分子を、プロテオーム解析手法を用いて網羅的に解析する。次いで、ヒト口腔扁平上皮癌培養細胞株を用いて、(3) プロテオーム解析により抽出されたタンパク質候補の機能解析を行い、癌-非癌界面における細胞間相互作用あるい

は界面部特異的な細胞機能への関わりを明らかにする。

以上の検討結果から、総合的に細胞競合の視点から扁平上皮癌・上皮内癌の癌-非癌界面を検討して、細胞競合現象の病理診断指標としての意義を確定する。

4. 研究成果

(1) 癌-非癌界面の病理形態学的解析

口腔 SCC・CIS の外科切除組織標本 200 例以上を検討し、CIS 55 界面・SCC 57 界面、合計 112 界面を抽出した。病理組織学的に癌-非癌界面は、癌部からみて直線型 (47%)、斜面型 (34%)、凸面型 (19%) に分類された。界面部の形態的な変化を検討すると、細胞間隙拡大 (71%)、基底膜破壊 (83%)、癌細胞質濃縮 (65%)、アポトーシス小体 (60%) に加えて好酸性硝子体 (36%) が出現し、いずれの所見も癌部において高頻度で、界面部癌組織における細胞死の亢進と細胞傷害が示唆された。また、界面部には好中球やリンパ球などの炎症細胞浸潤も好頻度に認められた。上記の好酸性硝子体は免疫組織化学的にカスパーゼ 3 の活性化を伴っている点などでアポトーシス小体との共通点があったが、典型的なアポトーシス小体とは形態的に異なっており、また TUNEL 陽性も認められない点から、未知の細胞死機序が示唆された。以上の検討から、癌部で細胞死が亢進し、癌細胞が細胞競合における敗者となる可能性が示唆された。

(2) 界面部プロテオーム解析

上記の形態的検討ののちに選択された特に明瞭な癌-非癌界面を形成する症例の病理組織標本から、界面に近接する癌組織、界面から離れた癌組織、界面に近接する非癌組織、界面から離れた非癌組織をレーザーマイクロダイセクション (LMD) により分取し、それぞれ LC-MS/MS 質量分析を行い、プロテオーム解析を行った。LMD における癌および非癌の区別は CK17 および CK13 免疫組織化学を併用した。その結果、癌部 (区分 +) 側で 4,035 種のタンパク質 (3,138 遺伝子)、非癌部 (区分 +) で 2,812 種のタンパク質 (2,236 遺伝子) が同定された。emPAI 法による定量的解析を行ったところ、癌部で tubulin alpha-1A chain、histone H1.4 ほか 112 分子が、非癌側では uncharacterized protein C2orf54 ほか 8 分子が特異的に同定された。ついで、 から までの区画を別々に比較検討したところ、laminin-1 や interleukin-1 receptor antagonist など 7 分子の特異的な増減が界面部組織で見出された。これらの検討結果は、国際誌に報文として受理・掲載された (Abé, Exp Mol Pathol 2017. 雑誌論文 1)。

プロテオーム解析の結果からは、これまでに知られている細胞競合関連分子の有意な量的増減は明らかではなかったものの、界面部組織で特異的な発現パターンを示す複数の分子が同定されたことから、これらの分子が、癌細胞が敗者となる細胞競合あるいは他の細胞間相互作用に関連している可能性を考え、機能解析をおこなうこととした。

(3) 界面部特異的タンパク質の機能解析

抽出されたタンパク質の機能解析をより詳細に行うために、培養細胞を用いた発現解析および機能的検討を行ったところ、癌界面部組織で特異的な増加を示したタンパク質の1つである ladinin-1 は、口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2, 3, 4 で発現が確認された。ladinin-1 の機能解析を行うために、siRNA によるタンパク質発現抑制実験を施行したところ、ladinin-1 発現抑制細胞で増殖が著しく抑制され、特に増殖抑制の顕著だった HCS-2 を用いた検討では、cleaved-caspase 3 陽性細胞率、TUNEL 陽性細胞率の増加が認められ、Annexin-V・PI 染色による flowcytometry 解析でもアポトーシスおよび二次ネクロシスの増加が認められた。また、ladinin-1 発現を抑制した細胞では、wound scratch 試験で細胞の移動が抑制されたことから、ladinin-1 が細胞の遊走に関わっている可能性も示唆された。

以上の結果から、ladinin-1 は癌-非癌界面に面する癌細胞の生存と遊走に関わっている可能性が示唆されたが、癌細胞が敗者となる細胞競合メカニズムとの直接的な関連性は現時点では明らかでなく、ladinin-1 以外に同定されたタンパク質候補の詳細かつ相互の関連性も考慮した広範な検討が必要と考えられた。

以上のように、口腔 SCC・CIS と非癌上皮部との界面では、特定の分子発現に変動があることが確認されたので、癌-非癌界面特異的な細胞間クロストークの存在が示唆された。また、臨床的には癌は発育・進展して生命予後を脅かすが、これはすなわち最終的に癌細胞が勝者となるシナリオが存在するということである。ところが本研究の検討では、界面に接する組織ではむしろ癌部に細胞傷害性変化が強調された。癌細胞がどの時点細胞競合における勝者となるのかは未詳であるが、細胞競合の結果、癌部に細胞死をもたらす現象は制がん方策としてもユニークであり、臨床応用も視野に入れて今後さらに癌-非癌界面を詳細に解析して新たな研究領域の創出を目指していく所存である。

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 4 件)

1. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion fronts and non-cancerous epithelia. *Experimental and Molecular Pathology*, 102(1): 327-336, 2017. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.02.018. (査読あり)
2. Babkair H, Yamazaki M, Uddin MS, Maruyama S, Abé T, Essa A, Sumita Y, Ahsan MS, Swelam W, Cheng J, Saku T. Aberrant expression of the tight junction molecules claudin-1 and zonula occludens-1 mediates cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Human Pathology*. 57: 51-60, 2016. doi: 10.1016/j.humpath.2016.07.001. (査読あり)
3. Essa AAM, Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Babkair H, Raghieb AM, Megahed EMED., Cheng J, Saku T. Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. *Pathology* 48(3): 219-227, 2016. doi: 10.1016/j.pathol.2016.02.006. (査読あり)
4. Hasegawa M, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Abé T, Babkair H, Saito C, Saku T. Differential immunohistochemical expression profiles of perlecan-binding growth factors in epithelial dysplasia, carcinoma in-situ, and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *Pathology - Research and Practice*, 212 (5): 426-436, 2016. doi: 10.1016/j.prp.2016.02.016. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

1. 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, 許 波, 隅田賢正, 程 珺, 山本 格, 朔敬: 口腔表在性癌と非癌部粘膜上皮との界面におけるタンパク質動態解析. 第 106 回日本病理学会総会, 2017 年.
2. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Saku T: Proteome

profiling at the lateral interface of oral squamous cell carcinoma/carcinoma in-situ. 第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2016 年.

3. 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, 許波, Hamzah Babkair, 隅田賢正, 程 琺, 山本 格, 朔 敬: 口腔表在癌と非癌部粘膜上皮との界面における細胞競合現象の解析. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年.
4. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Cheng J, Saku T: Proteomics of the lateral interface of oral squamous cell carcinoma. The Global Oral Cancer Forum, 2016.
5. 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, Babkair H, 隅田賢正, 程 琺, 朔 敬: 口腔表在性癌と非癌部粘膜上皮との界面における細胞競合現象. 平成 27 年度新潟歯学会第 2 回例会, 2015 年.

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 達也 (ABE Tatsuya)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号: 70634856