

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21564

研究課題名(和文)「癌細胞 vs. 正常細胞の最前線」細胞競合におけるタイト結合の役割の研究

研究課題名(英文)"cancer vs. normal cells." Study on the role of tight junction in cell competition.

研究代表者

北河 憲雄 (Kitagawa, Norio)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：40628517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常ケラチノサイトと癌の生存競争の解明のために、複数の癌細胞・正常細胞を用いた共培養系を構築した。この解析系により、癌細胞集団を取り囲む正常細胞集団では、細胞骨格であるvimentinの発現が上昇することが分かった。この変化は癌細胞集団に対して最前線にいる正常細胞だけでなく、その後方に存在する正常細胞にも見られた。この変化は癌細胞の培養上清を作用させるだけでも誘導された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the cell competition of normal keratinocytes versus cancer, a co-culture experimental system using several cancer cells and several normal cells were constructed. Expression of vimentin, a cytoskeleton, increased in a normal cell population surrounding a cancer cell population. This change was found not only in normal cells at the forefront of the cancer cell population but also in normal cells existing behind them. This change was induced by merely acting the culture supernatant of cancer cells.

研究分野：組織学

キーワード：細胞競合 癌 ケラチノサイト 細胞骨格 抗菌ペプチド Filamin Vimentin Cytokeratin 17

1. 研究開始当初の背景

細胞競合は、同種の細胞間で適応度の高い細胞が適応度の低い細胞を排除するしくみであり、その過程で免疫系の細胞を介さないのが特徴である。

上皮組織の腫瘍は癌と呼ばれるが、この現象は癌細胞と周囲の正常上皮細胞の間でも見られる。Kajita らにより特にこの現象は EDAC (epithelial defense against cancer) と名付けられている (2015)。

皮膚や口腔、食道の上皮は重層扁平上皮と呼ばれる上皮に覆われている。重層扁平上皮は、単層扁平上皮 (血管の内皮・腎臓のボウマン嚢)、単層円柱上皮 (胃・腸・腎臓の尿細管の上皮) と異なり何層にも重層している。重層扁平上皮の主な細胞はケラチノサイトと呼ばれる。また皮膚をはじめとする特に外界からの刺激の強い部分の重層扁平上皮では最外層に角質層が存在し、角質層が存在するものを特に角化上皮、しないものを非角化上皮と呼ぶ。

正常細胞と癌細胞の相互作用の解明に当たって、我々は正常細胞と癌細胞間を繋ぐ細胞間接着装置とそれを連続する細胞骨格に注目した。特にその中でもタイト結合に着目した。

タイト結合は細胞間隙をシールすると共に、細胞膜を頂部と側底部ドメインに区切る。タイト結合が変化すると、細胞膜の各細胞膜ドメイン固有の蛋白質や脂質の成分が交じり合う。その結果、癌細胞が悪性化して自律的増殖、浸潤・転移に繋がる。癌細胞の細胞競合における勝利はタイト結合の消失と連動しているのではないかと疑われる。

2. 研究の目的

ヒト重層扁平上皮における、正常細胞と癌細胞間の生存競争について明らかにする。特

に共培養時の細胞間結合・細胞骨格の変化について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

正常細胞・癌細胞間共培養時の細胞間結合・細胞骨格を構成する蛋白質の発現、局在について調べた。細胞競合は細胞死及び細胞骨格と形態の変異で判断した。

検討には正常のヒト重層扁平上皮に由来する細胞、重層扁平上皮癌に由来する細胞を用いた。用いた全細胞に対してマイコプラズマ感染がないことを確認している。

抗菌ペプチドの3次元での上皮作用は非接着性の dish で細胞塊 (スフェロイド) を作成し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 正常細胞の vimentin 発現

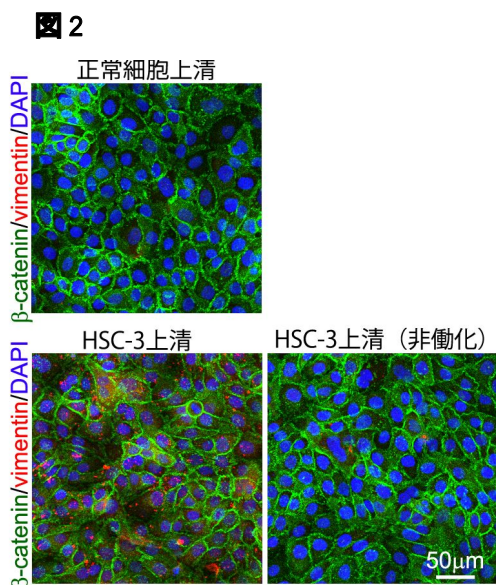
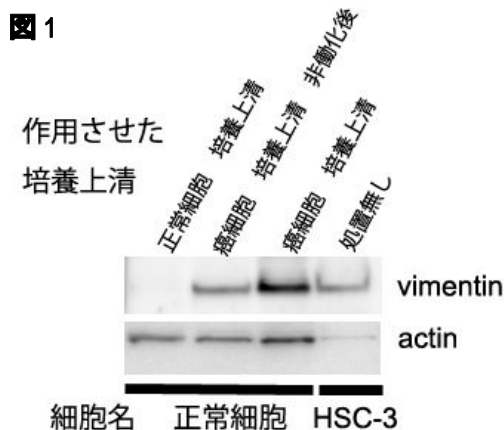
本研究では、まず細胞競合の解明のために、角化上皮・非角化上皮それぞれに由来する複数の癌細胞・正常細胞を用いた共培養系を構築した。本解析系は癌細胞集団とそれを囲む正常細胞集団を解析できることが特徴である。

この解析系により、癌細胞集団を取り囲む正常細胞集団では、細胞骨格である vimentin の発現が上昇し、細胞のアピカル側に点状に局在が見られることが分かった。

興味深いことに、この変化は癌細胞集団に対して最前線にいる正常細胞だけでなく、その後方に存在する正常細胞にも見られた。正常細胞における vimentin の発現と局在は、誘導する癌細胞により異なった。すなわち HSC-3 による誘導では正常細胞全体に同様の vimentin 局在が見られるのに対して、HSC-5 による誘導では最前線と後方に存在する細胞で vimentin の局在様式が異なった。

この vimentin の発現と局在は癌細胞の培

培養上清を正常細胞に作用させるだけでも誘導され、液性因子により誘導されていることが示唆された。一方、非働化した癌細胞の培養上清では、正常細胞に vimentin の発現は見られたものの、アピカル側での局在は観察されなかった。以上のことから vimentin 発現と局在には異なる因子も作用している可能性が示唆された(図 1、2)。



培養上清処理による正常細胞のvimentin発現の変化

vimentin は正常ケラチノサイトでは観察されない。一般的には上皮細胞が上皮の性質を失ったかどうかの(上皮間葉転換)マーカーとして用いられる。しかしながら本研究の場合では、上皮細胞の一部にのみ vimentin が局在しており、細胞形態もほぼ維持されて

いることから、上皮間葉転換ではない可能性が示唆された。また、一般的に細胞が上皮の性質を保っている指標となる、タイト結合やアドヘレンス結合蛋白質の発現・局在も維持されていた。

(2) 液性因子

本研究を進める中で、大きく仮説と異なった現象が2つあった。一つが細胞接触のない状態での癌細胞の細胞死の誘導、もう一つが細胞競合の勝敗に大きく影響を与える因子Xである。

非接触状態での細胞死の誘導に関連が疑われる因子としては、defensinをはじめとする抗菌ペプチドがある。ケラチノサイト由来癌細胞および正常ケラチノサイトがともに抗菌ペプチドを分泌し、細胞増殖死と呼ばれるアポトーシスともネクローシスとも異なる細胞死をケラチノサイトに誘導することが知られている(Sawaki et al, 2003)。

その一方で、多くの抗菌ペプチドの不安定性から、ケラチノサイトと抗菌ペプチドの関連にはまだ未解明な点も多い。また、細胞競合の観点からの解析はあまり行われていない。

我々はこのモデルとして、抗菌ペプチド Nisin を用いた解析系を2次元・3次元培養系で構築した。Nisin は非常に安定した物質であり、本解析系はケラチノサイトに対する抗菌ペプチドの作用の解明に貢献できると考えられる。

先行研究では細胞競合の勝敗の主要な因子として「細胞増殖速度」が報告されている。我々はそれとは別に因子Xが勝敗に作用することを発見した。また、癌細胞・正常細胞の共培養系には複数の方法があるが、それぞれの方法の間で「因子X」の影響が大きく異なることが分かった。特に共培養の実験でよく用いられるトランズウェルを用いた方法では「因子X」の影響が他の手法に比べて弱

く、トランズウェルの形態により「因子 X」の影響がマスキングされている可能性が考えられた。

本研究ではケラチノサイトにおける癌細胞と正常上皮間の生存競争について新たな知見を報告することができた。重層扁平上皮の dysplasia の病理標本では、細胞競合の先行研究と必ずしも組織像は一致していない。本研究の成果はその橋渡し研究となれる可能性があると考えられる。

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 件)

[学会発表](計 11件)

宮園 祥爾、北河憲雄、大谷崇仁、松浦尚志、稲井哲一朗 ブタケラチノサイトの三次元培養系におけるビタミン A 誘導体の作用の解析 第 73 回 日本解剖学会 九州支部学術集会 2017 年

中山英明、北河憲雄、大谷崇仁、阿南 壽、稲井哲一朗 マウス大腸上皮細胞 CMT93- におけるタイト結合蛋白 claudin の局在に対するマイコトキシンの影響 第 44 回 福岡歯科大学学会総会 2017 年

宮園 祥爾、北河憲雄、大谷崇仁、瀬尾 皓、松浦尚志、稲井哲一朗 ビタミン A 誘導体による角化抑制の解析 第 44 回 福岡歯科大学学会総会 2017 年

北河憲雄、大谷崇仁、稲井哲一朗 上皮単独による癌細胞排除機構の研究 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年

中山英明、二階堂美咲、北河憲雄、大谷崇

仁、阿南 壽、稲井哲一朗 マウス大腸癌由来 CMT93- 細胞におけるタイト結合蛋白 claudin の発現調節について 第 43 回福岡歯科大学学会総会 2016 年

水上正彦、北河憲雄、阿南壽、稲井哲一朗 HaCaT 細胞における Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) のタイト結合形成への影響 第 23 回日本歯科医学会総会 2016 年

稲井哲一朗、北河憲雄 タイト結合膜蛋白 claudin-10b と claudin-15 の機能解析 第 23 回日本歯科医学会総会 2016 年

JNK 阻害によるケラチノサイトの分化誘導 北河憲雄、大谷崇仁、稲井哲一朗 第 23 回日本歯科医学会総会 2016 年

Analysis of cytoskeleton in normal cells surrounding cancer cells. 北河憲雄、大谷崇仁、稲井哲一朗 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016 年

北河憲雄、大谷崇仁、稲井哲一朗 ケラチノサイトの細胞骨格に対する食品添加物 Nisin の作用 第 70 回栄養・食糧学会総会 2016 年

血管内皮タイト結合に対する終末糖化産物の作用 北河憲雄、稲井哲一朗 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年

[図書](計 1件)

北河 憲雄 他、シーエムシー出版、抗菌ペプチドの機能解明と応用技術

[産業財産権] なし

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

北河 憲雄 (KITAGAWA, Norio)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号： 40628517

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし