

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09542

研究課題名(和文) MALT1核移行メカニズムと口腔癌細胞浸潤

研究課題名(英文) Nuclear translocation mechanism of MALT1 and oral carcinoma cell invasion

研究代表者

今井 一志 (Kazushi, IMAI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：10328859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (MALT1) は正常口腔上皮基底細胞の核に局在するが、予後不良な口腔癌では発現を停止する。しかし、その細胞内局在と発現制御機構は不明である。本研究課題において、カスパーゼ様ドメインが核への局在に働き、デスドメインが細胞増殖を抑制することが明らかになった。発現制御については+402～+501の領域がコアプロモーターであり、そこにNF- κ BサブユニットであるRELAが結合することで抑制されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌細胞はMALT1を核に発現することで高度悪性形質を抑制し、予後不良な口腔癌では発現が低下する。本研究課題では、第1にMALT1はカスパーゼ様ドメイン依存性に核移行したデスドメインにより細胞増殖を抑制すること、第2に+402～+501のサイレンサー領域にNF- κ BサブユニットRELAが結合することで遺伝子発現が負に制御されることが判明した。口腔癌は頭頸部で最も発生頻度が高い悪性腫瘍であるが、患者予後は十分に改善されたとは言えない。予後の改善には新たな治療法を確立する必要がある。本研究で得られた成果は口腔癌進行の新たな分子機構を示すものであり、将来的に新規治療法の開発につながる可能性をもつ。

研究成果の概要(英文)：In normal oral epithelium, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (MALT1) is expressed in the basal epithelial cells, and the expression is rapidly disappeared in an aggressive subset of oral carcinomas. However, mechanisms of the subcellular localization and the loss of expression are unknown. This study demonstrated that caspase-like domain of MALT1 translocates the protein into nucleus and the death domain suppresses cell proliferation. In regard to the regulation of expression, binding of NF- κ B subunit RELA to the core promoter region (+402～+501) was a primary cause for loss of the gene expression.

研究分野：生化学

キーワード：MALT1 口腔癌 ドメイン プロモーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌は頭頸部領域で最も発生頻度が高い悪性腫瘍であるが、患者予後は十分に改善されたとは言えない。口腔癌進行のメカニズムの詳細を明らかにすることが新たな治療法の開発と予後の改善に不可欠である。

(2) MALT1 はリンパ球系細胞で働くシグナル伝達分子として知られているが、口腔上皮では基底細胞の核に局在し、予後不良な口腔癌では高頻度に発現を停止する。MALT1 は口腔癌細胞において増殖や浸潤能を強く抑制することから、MALT1 の発現停止が口腔癌進行を制御する可能性がある。しかし、核への局在と発現停止のメカニズムは全く不明である。

2. 研究の目的

(1) 口腔癌細胞とリンパ球系細胞における MALT1 タンパク質の最も大きな違いは細胞内局在といえる。口腔癌細胞では核、リンパ球系細胞では細胞質である。MALT1 タンパク質は典型的な核移行シグナル配列 (NLS) をもたないため、核移行のドメイン依存性を探ることが重要となる。それを明らかにした上で、口腔癌の進行との関連について検討する。

(2) 予後不良な口腔癌ではなぜ MALT1 の発現が停止するのかを理解することも重要なテーマである。それには MALT1 遺伝子の転写制御機構を解明する必要があるが、細胞種に関わらず全く検討されていない。そのためには、MALT1 遺伝子発現の基盤となるコアプロモーター領域の決定と発現停止との関連を明らかにしなくてはならない。MALT1 発現停止と口腔癌進行の分子機構解明に向かって、上記目的とともに治療に向けた新たな突破口を拓くことを本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 核移行メカニズムのドメイン依存性を検討するため、複数の MALT1 ドメイン欠失コンストラクトを作製した (図 1)。それらをヒト口腔癌細胞に導入し、タンパク質の細胞内局在をウエスタンブロットと免疫染色で解析した。MALT1 タンパク質のドメインと細胞増殖の関連についてはリアルタイム増殖アッセイ等で検討した。

(2) MALT1 遺伝子の発現制御については、-2500 から +701 bp までの様々な長さの領域をルシフェラーゼ発現プラスミドにクローニングし (図 2) 口腔癌細胞におけるコアプロモーター領域を解析した。領域の決定後に結合可能な転写制御因子を候補し、その結合と MALT1 発現制御の関連についてクロマチン免疫沈降法 (ChIP)

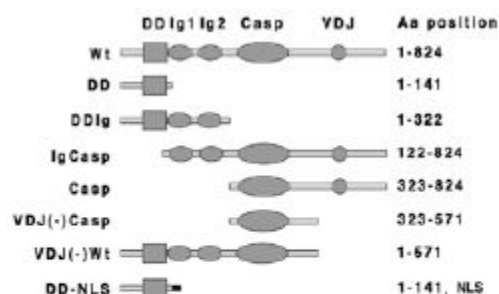


図 1 Schematic illustration of MALT1 constructs. Domain-deleted MALT1 constructs were generated by PCR using wild-type full-length human MALT1 (Wt) cDNA as a template. Each domain-deleted construct consists of death domain (DD), Ig-like domains (Ig1 and Ig2), caspase-like domain (Casp) and/or VDJ-like region (VDJ). Constructs lacking VDJ in Casp [VDJ(-)Casp] and VDJ [VDJ(-)Wt] were also made. DD construct ligated with the nuclear localization signal (DD-NLS) was used for proliferation assay. Amino acid (Aa) positions are noted in the right.

siRNA 導入、ウエスタンブロットおよびレポーターアッセイ等で解析した。

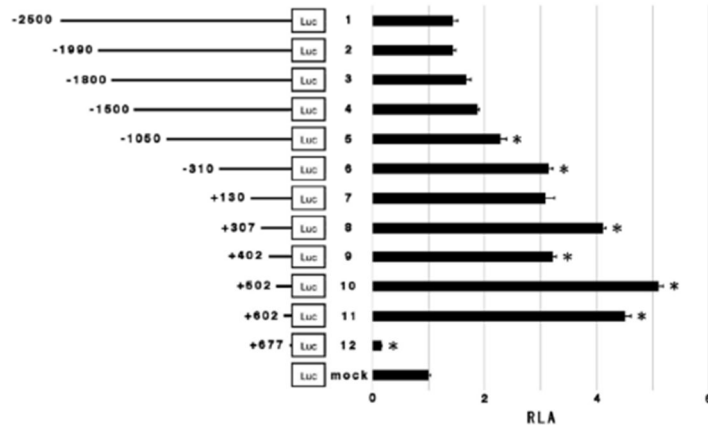


図2 Constructs and expression of reporter genes. Various length of *MALT1* promoter region from -2500 bp to +701 bp was ligated to luciferase (Luc)-reporter plasmid (clones 1-12, left panel). The plasmids were transfected into HSC2 cells and relative luciferase activities (RLA) standardized by renilla control plasmid were quantified (right panel). Statistical significance of the RLA was compared with the former clone ($n = 4$; *, $P < 0.01$). The data are presented as means \pm SD.

4. 研究成果

(1) 異なるドメインで構成されるコンストラクトを口腔癌細胞株に一過性導入し、ウエスタンブロットを行なった。カスパーゼ様ドメインを含む全てコンストラクトは核画分に局在したのに対し、含まないコンストラクトは細胞質画分に認められた(図3A, B)。同様の結果は、コンストラクトを恒常的に発現する細胞のウエスタンブロットと共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫細胞染色でも確認された(図3C, D)。口腔癌細胞において、*MALT1* はカスパーゼ様ドメイン依存性に核に局在することが明らかとなった。

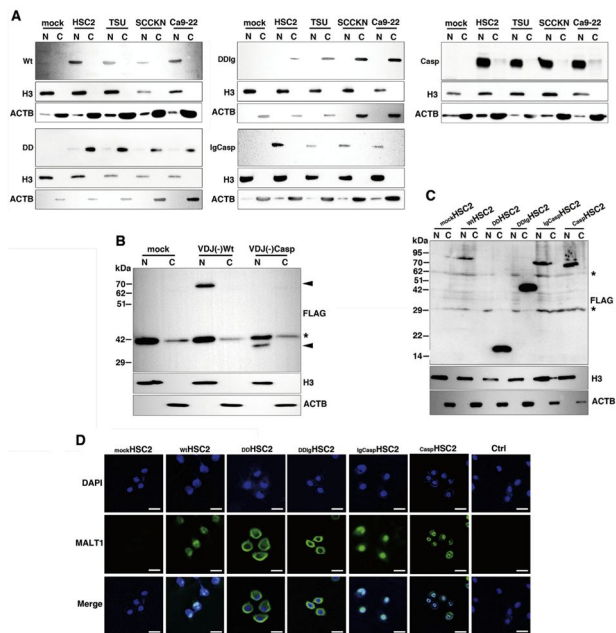


Fig. 3. Subcellular localization of domain-deleted *MALT1*. (A) *MALT1* constructs were transiently transfected into oral carcinoma cell lines (HSC2, TSU, SCCKN and Ca9-22), and the protein expression in nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions were analyzed by the immunoblot using anti-FLAG antibody. Empty plasmid transfected HSC2 cells were used as a negative control (mock). (B) HSC2 cell transiently transfected with VDJ(-)Wt and VDJ(-)Casp constructs were detected at bands with 70 kDa and 38 kDa, respectively (arrowheads). (C) HSC2 cell stably transfected with *MALT1* constructs were separated into N and C fractions and applied for the immunoblot using anti-FLAG antibody. $_{HSC2}$ cells developed a band at 90 kDa, $_{HSC2}$ cells 17 kDa, $_{HSC2}$ cells 42 kDa, $_{HSC2}$ cells 70 kDa, and $_{HSC2}$ cells 67 kDa. $_{HSC2}$ cells transfected with empty plasmid alone was used as a negative control. Histone H3 (H3) and β -actin (ACTB) were used as makers for N and C fraction, respectively. *, non-specific band. (D) Immunocytochemistry of stably transfected with *MALT1* constructs or empty vector. Construct expression was probed with anti-FLAG antibody. For a negative control, $_{HSC2}$ cells were incubated with non-immune mouse IgG instead of anti-FLAG antibody (Ctrl). DAPI shows nuclear staining. Scale bars = 10 μ m.

(2) *MALT1* は口腔癌細胞の増殖能を抑制することから、上記の *MALT1* 恒常的発現細胞を用いてリアルタイム増殖アッセイを行なった。野生型コンストラクト発現させた細胞は増殖が抑制されたのに対し、カスパーゼ様ドメインの核局在のみでは影響がみられなかった(図4A)。デスドメインの関与が疑われたことから、NLS 配列を付加したデスドメインを恒常的に発現する細胞株を樹立し増殖アッセイを行なった。その結果、デスドメインを核に発現させることで、細胞増殖が有意に抑制されることが示された(図4B-D)。従って、カスパーゼ様ドメインにより核内に移行したデスドメインが癌細胞の増殖抑制に働くと考えられる。

(3) MALT1 遺伝子の発現停止は口腔癌の進行と癌細胞の高度悪性形質の獲得に密接な関連をもつ。しかし、その発現制御機構はあらゆる細胞種において全く不明である。そこで哺乳動物で高度に保存されている -2,500 bp から +701 bp の領域について、様々な長さをもつ DNA 配列をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に繋いだレポーターアッセイを行なった。複数の口腔癌細胞株に共通して +402 bp から +501 bp の 100 bps 領域がレポーター遺伝子の発現抑制に働くことが示唆された(図 5)

同領域には NF- κ B のサブユニットである RELA の結合配列が存在し、ChIP により両者の結合が確認された。RELA 結合配列を欠失あるいは変異させたクローンでは結合が著しく低下した。RELA に対する 3 種類の異なる siRNA を導入することで、内在性の MALT1 タンパクとレポーター遺伝子の発現が有意に上昇した。また、RELA 結合配列の欠失・変異はレポーター遺伝子発現を上昇させた(図 6)。従って、+402 bp から +501 bp の領域に RELA が結合することで MALT1 の発現が大きく抑制され、口腔癌の高度悪性形質獲得と進行に働くことが予想された。

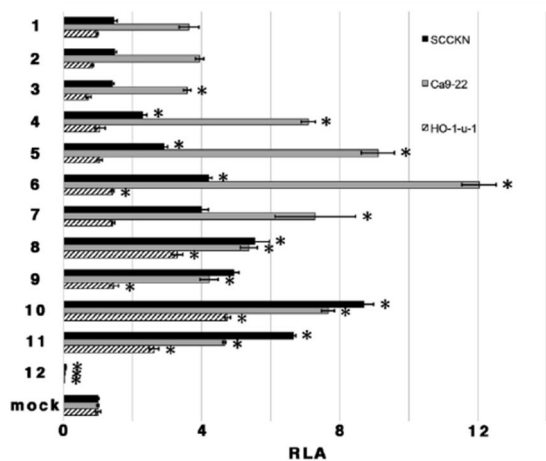


図 5 Reporter gene expression in a different set of oral carcinoma cells. Three oral carcinoma cell lines (SCCKN, Ca9-22 HO-1-u-1) were applied to the dual reporter assay using luciferase-reporter plasmid (clones 1-12) and renilla control plasmid. Statistical significance of relative luciferase activities (RLA) was compared with the former clones in each cell line (*, $P < 0.01$). The data are presented as means \pm SD of quadruplicate experiments ($n = 4$).

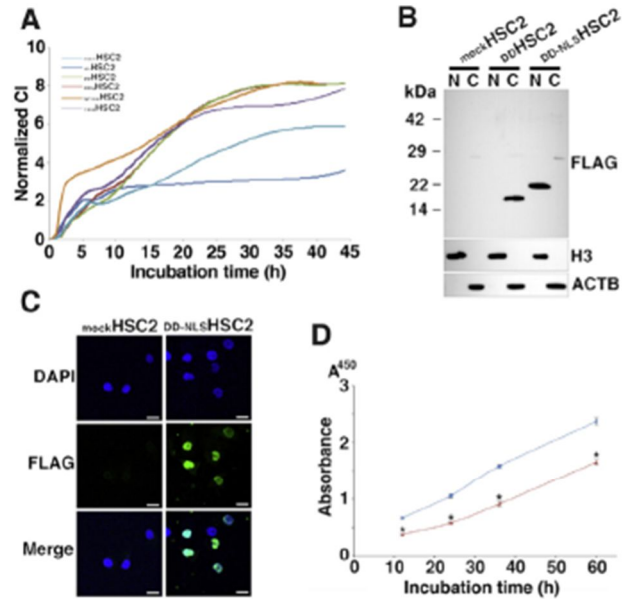


図 4 Proliferation by MALT1 constructs and inhibition by nuclear death domain. (A) HSC2 cells expressing MALT1 construct ($_{\text{WT}}$ HSC2, $_{\text{DD}}$ HSC2, $_{\text{DD-NLS}}$ HSC2, $_{\text{IgCaip1}}$ HSC2 and $_{\text{Caip1}}$ HSC2) or empty plasmid ($_{\text{mock}}$ HSC2) were subjected to the real-time proliferation analysis ($n = 5$). Normalized cell index (CI) indicates cell number based on the electrical impedance between cells and culture plate. (B) HSC2 cell stably transfected with DD ($_{\text{DD}}$ HSC2) or DD-NLS ($_{\text{DD-NLS}}$ HSC2) constructs were separated into nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions and applied for the immunoblot using anti-FLAG antibody. Histone H3 (H3) and β -actin (ACTB) were used as makers for nuclear and cytoplasmic fraction, respectively. (C) Immunocytochemistry for $_{\text{DD-NLS}}$ HSC2 cells probed with anti-FLAG antibody. For a negative control, $_{\text{mock}}$ HSC2 cells were used. DAPI shows nuclear staining. Scale bars = 10 μ m. (D) Proliferation of HSC2 cells stably expressing DD (blue line) or DD-NLS (red line) construct were applied for the colorimetric endpoint assay. Cell numbers are indicated by the absorbance at 450 nm (A^{450}). Statistical significance of A^{450} of $_{\text{DD-NLS}}$ HSC2 cells compared to $_{\text{DD}}$ HSC2 cells at each time point was analyzed by student-t test ($n = 7$). *, $P < 0.001$.

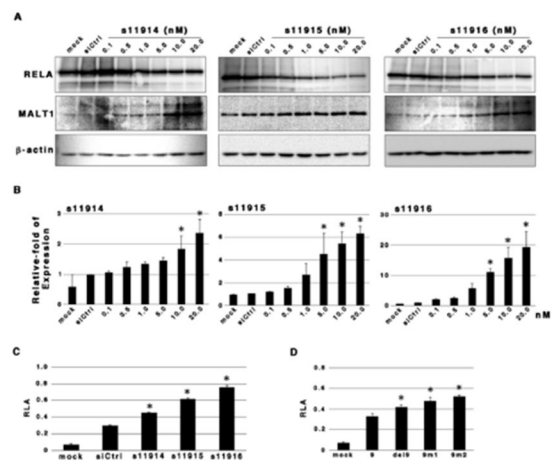


図 6 RELA regulation of MALT1 expression. (A) HSC2 cells were transfected with siRNAs (si1914, si1915 or si1916) in a different dose and subjected to immunoblot analysis for endogenous RELA, MALT1 or β -actin protein expression. (B) Endogenous MALT1 protein expression in response to the siRNA transfection and normalizing by β -actin was statistically compared with cells transfected with a negative control siRNA (siNC) (3 nM). The data are presented as means \pm SD ($n = 3$). *, $P < 0.01$. (C) Relative Luciferase activity (RLA) of clone 9 after transfection with siRNAs (si1914, si1915 and si1916; 30 nM) was compared to that of a negative control siRNA (siNC) (30 nM) transfection. (D) *, $P < 0.01$. (E) RLA in clones 9, cells 9e1 and 9e2 was measured ($n = 4$) and statistically compared to clone 9 activities (*, $P < 0.01$). The data are presented as means \pm SD.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 H Hayashi, T Chiba, N Mihara-Tomiyama, T Negishi, Y Kodama, H Sakashita, K Imai	4. 巻 522
2. 論文標題 Domain structures of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1 protein for nuclear translocation in oral carcinoma cells and the proliferation inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 799-804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 T. Nozawa, N. Mihara-Tomiyama, T. Chiba, K. Imai	4. 巻 542
2. 論文標題 NF-κB subunit RELA suppression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 expression in oral carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 24-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林宏泰、千葉忠成、富山希美、今井一志、坂下英明
2. 発表標題 口腔癌細胞におけるMALT1核移行ドメインの解析
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	富山 希美 (美原希美) (Nozomi TOMIYAMA) (00803264)	日本歯科大学・生命歯学部・助教 (32667)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	千葉 忠成 (Tadashige CHIBA) (60350138)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関