

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18973

研究課題名(和文) 口腔の正常重層扁平上皮および扁平上皮癌の角化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism to control keratinization in normal stratified squamous cell and squamous cell carcinoma derived from oral mucosa

研究代表者

嶋田 勝光 (Shimada, Katsumitsu)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10782120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：まず、口腔の正常な錯角化上皮と非角化重層扁平上皮を用いたRNAシーケンス解析を行うことで、口腔の角化に寄与する遺伝子としてロリクリンを同定した。次に、表皮の3次元培養法を初代歯肉上皮細胞に応用することで、上皮細胞が積層化し経時的な分化を示す錯角化重層扁平上皮モデルを作成した。さらにこのモデルにおいて、錯角化層の形成時にロリクリンおよびその架橋酵素であるトランスグルタミナーゼ3が細胞内に局在し、角化に寄与していると考えられた。最後に、この3次元培養を用いて分化傾向を示す上皮内癌のモデルを作成した。これらの培養モデルを用いて、正常と腫瘍性の分化・角化を比較する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔の重層扁平上皮において、正常な分化・角化モデルと腫瘍性の分化・角化モデルを作成することができた。したがって、このモデルと網羅的な遺伝子解析を併用することにより、正常分化から腫瘍性分化への変化の観点から、口腔癌における腫瘍発生のメカニズムを遺伝学的に解明できる。

研究成果の概要(英文)：First, I identified loricrin as a gene that contributes to oral keratinization by performing RNA sequence analysis using normal keratinized epithelium and non-keratinized stratified squamous epithelium of the oral cavity. Next, by applying the three-dimensional culture method of the epidermis to the primary gingival epithelial cells, I created a keratinized multi-layered squamous epithelial model in which the epithelial cells are laminated and show differentiation over time. Furthermore, in this model, I thought that loricrin and its cross-linking enzyme, transglutaminase 3, were localized in the cells during the formation of the keratinized layer and contributed to keratinization. Finally, I used this three-dimensional culture to create a model of intraepithelial cancer showing a tendency to differentiate. Using these culture models, we established a method to compare normal and neoplastic differentiation / keratinization.

研究分野：口腔病理学

キーワード：角化 分化 周辺帯 トランスグルタミナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 口腔粘膜上皮は皮膚と異なる角化様式を示し、歯肉や口蓋では核を保持した状態を示す錯角化を呈する(図 1)。しかし、口腔には角化を示さない舌側縁や頬粘膜の上皮も存在するなど、口腔粘膜上皮の分化・角化制御機構の全貌は未だ明らかでない。

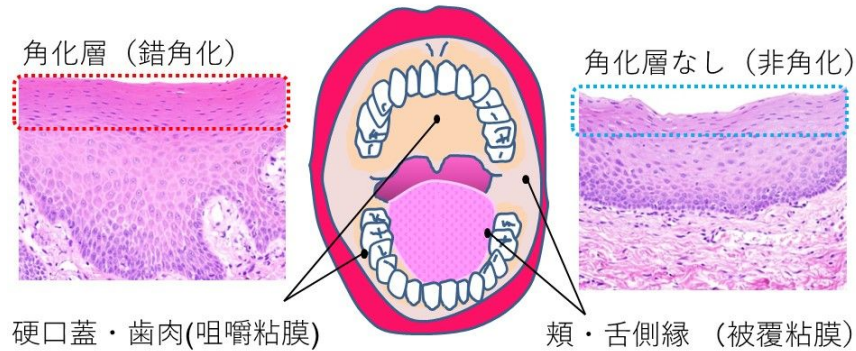


図1. 口腔粘膜上皮の解剖学的分類

- (2) 口腔の重層扁平上皮に由来して分化型の上皮内癌や高分化型の扁平上皮癌が発症する。しかし、腫瘍性の分化・角化を再現した培養モデルは未だ確立していない。

2. 研究の目的

- (1) 口腔の正常上皮の分化・角化の機序に最も重要な遺伝子の発見
- (2) 口腔粘膜の角化上皮の三次元の培養モデルの確立
- (3) 口腔粘膜上皮の三次元の培養モデルの経時的な追跡による分化・角化遺伝子に基づくタンパク質の局在および時期の調査

3. 研究の方法

- (1) 錯角化上皮群および非角化上皮群の2群間のRNAシーケンス解析にて得られた発現変動遺伝子の取得
- (2) 多数の発現変動遺伝子から、生物学的プロセスとして「角化」がタグ付けられた遺伝子の絞り込みと定量PCRを用いた確認
- (3) ヒト歯肉上皮初代細胞および口腔癌細胞株を用いた三次元培養による経時的に分化を示す錯角化重層扁平上皮および分化型上皮内癌の再現

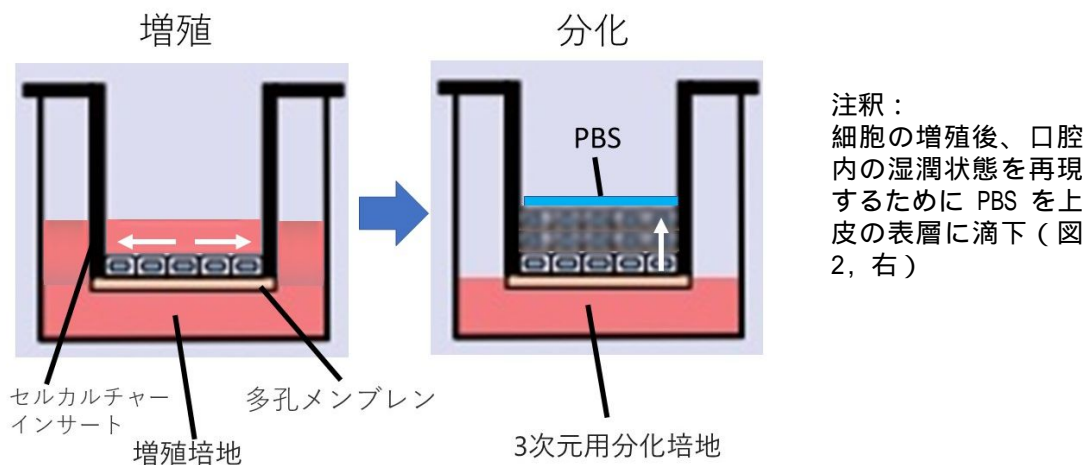


図2. 三次元培養法

- (4) ヘマトキシリン・エオシン染色による形態観察
- (5) 角化・分化関連遺伝子に基づく標的タンパク質に対する免疫染色によるタンパク質の局在時期の同定

4. 研究成果

(1) 角化の機序に最も重要な遺伝子であるロリクリンの発見

まず、正常なヒト凍結未固定検体である錯角化重層扁平上皮および非角化重層扁平上皮を用いた RNA シークエンス解析を行い、発現変動遺伝子を得た。次に、発現変動遺伝子をもとにタンパク質（遺伝子）-タンパク質（遺伝子）間相互作用ネットワークを作成した。さらに、部分パスウェイの抽出と部分パスウェイの機能予測を行い、角化に与関するケラチン（図2，左側）と周辺帯のクラスター（図2，右側）を得た。最後に、媒介中心性が高く（ノードが大きく）、高発現（赤色が濃い）を示すロリクリン（LOR）を選出した（図3，中央部）。

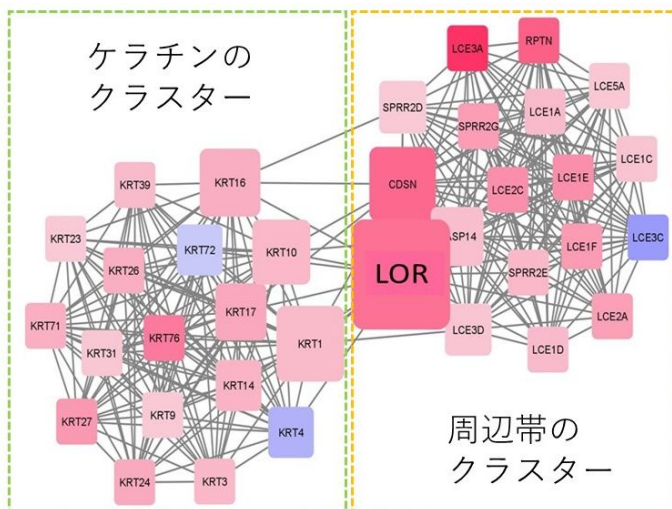


図3. 口腔の角化に与関するタンパク質-タンパク質ネットワーク

この結果はヒト検体を用いた定量 PCR の結果より裏付けられている。

(2) 錯角化重層扁平上皮の再現・ロリクリンの出現を伴う角化現象を実証

三次元培養の結果、上皮細胞が積層化し経時的な分化を示す錯角化重層扁平上皮を再現することができた（図4，上段）。

培養 8 日目において、ロリクリン（LOR）は重層扁平上皮の上層の細胞質内にびまん性に局在し（青矢印）、同部位に本基質の代表的な架橋酵素であるトランスグルタミナーゼ 3（TG3）も認められた。その後、11 日目から 14 日目にかけてロリクリンを含んだ錯角化層の形成および剥離がみられた（図4，中段，下段）。

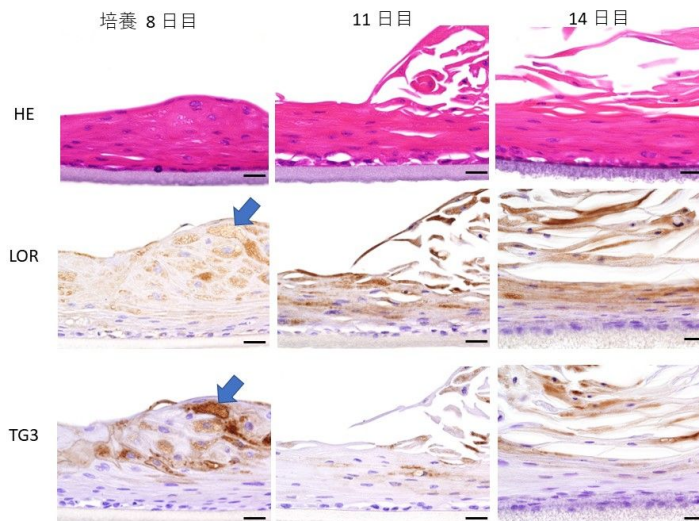


図4. 口腔の錯角化を示す重層扁平上皮の三次元培養 (bar=20μm)

(3) 口腔癌細胞株を用いた三次元培養による分化型上皮内癌の再現

このヒト歯肉上皮初代細胞を用いた 3 次元培養を口腔癌細胞株へ応用し、口腔の表層分化型上皮内癌の再現を試みた。その結果、培養 14 日目、舌由来の扁平上皮癌細胞株（HSC-3）は下層から上層向かって、異型を示す基底細胞様細胞、有棘細胞様細胞および角化細胞様細胞の細胞へと積層化し、分化勾配を示す分化型上皮内癌に類似する組織を構築することができた（図5，左）。

この口腔の分化型上皮内癌モデルは、免疫組織学的にもサイトケラチン 13（CK13）陰性、サイトケラチン 17（CK17）陽性、Ki-67 の基底第一層への移行および p53 の消失を示し、上皮内癌として矛盾しない免疫形質が再現された（図5，中央，右）。

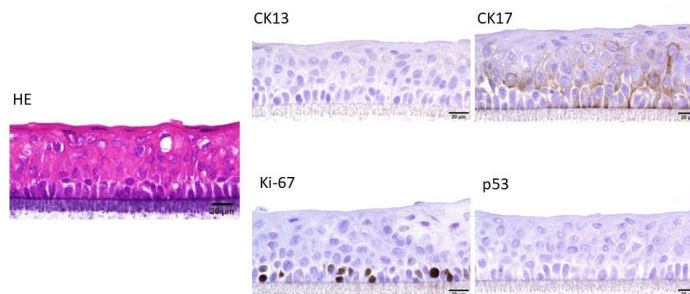


図5. 口腔癌細胞株を用いた三次元培養（培養14日目） (bar = 20 μm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Roy Rita Rani, Shimada Katsumitsu, Murakami Satoshi, Hasegawa Hiromasa	4. 巻 129
2. 論文標題 Contribution of transglutaminases and their substrate proteins to the formation of cornified cell envelope in oral mucosal epithelium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eos.12760	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Roy RR, Shimada K, Murakami S, Hasegawa H
2. 発表標題 mRNA Level of Transglutaminase 1 and Transglutaminase 3 in Keratinized and Non keratinized Oral Epithelium
3. 学会等名 第22回トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Roy RR, Shimada K, Murakami S, Hasegawa H
2. 発表標題 Role of Transglutaminase in Keratinization of Oral mucosa
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------