

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592328

研究課題名（和文）口腔癌細胞の上皮—間葉相互作用による基底膜浸潤制御

研究課題名（英文）Regulate for invasiveness by epithelial-mesenchymal interaction of oral cancer.

## 研究代表者

中原 寛和 (NAKAHARA HIROKAZU)

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号：70324796

## 研究成果の概要（和文）：

我々は癌細胞による細胞外基質分解を *in vitro* で観察することが可能なフィブロネクチン分解・浸潤モデルを用い、転移抑制を目標に分子標的治療のターゲット分子の検討を行ってきた。浸潤様式の異なる 2 種のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である OSC-19 細胞および OSC-20 細胞を用いた。各々の細胞の reptin 遺伝子を knockdown し、細胞浸潤・遊走能を比較し、基底膜分解酵素の活性、低分子 GTP 結合蛋白の発現、上皮間葉移行 (EMT) 関連蛋白および EMT の転写制御因子の発現を比較した。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined the target molecule of the molecular target treatment with the goal of a metastasis control by using the fibronectin resolution / invasion model that could observe the extracellular matrix resolution due to the cancer cell *in vitro*. We used the OSC-19 cells which were cell line derived from two kinds of different human oral squamous cell carcinomas of the invasion style and OSC-20 cells. The reptin gene knockdown cells and compared cellular infiltration / the migration ability and compared the manifestation of the transcriptional regulator of activity of the basal membrane splitting enzyme, manifestation of small molecule GTP-binding protein, epithelial mesenchymal transition (EMT) related protein and EMT.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

## 1. 研究開始当初の背景

原発巣で増殖した癌細胞は多数の複雑な

プロセスを経て遠隔転移を成立させている。  
癌転移の機序には、細胞外基質の分解と遊走

能の獲得による局所浸潤，血管内侵入，血管内移動，血管外遊出，微小転移形成，転移増殖など何段階ものステップがあり，これらが複雑に絡んだ過程で進行する．なかでも癌細胞が細胞外基質を分解する過程は，癌細胞の浸潤・転移に最も重要な過程と考えられる．われわれは以前より細胞外基質分解の分子機構について研究を行い，その過程において，MT1-MMP が重要な役割をはたしていること，さらには低分子 GTP 結合蛋白の Rho ファミリー (Rho, Rac, Cdc42) が細胞運動時の形態変化や運動を制御していることなどを報告してきた

## 2. 研究の目的

上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition, 以下 EMT)とは胚形成や創傷治癒過程で観察される生理学的現象であり，運動性が低く，極性を持つ細胞同士がカドヘリンを介して接着することによって組織を構築している上皮細胞が，運動性の高い間葉系の細胞に変化し，組織をリモデリングする過程で生じる現象である．近年，癌の浸潤・転移は上皮系の腫瘍細胞に上皮間葉転換が誘導されることにより，腫瘍細胞が上皮としての性格を失い，間葉系細胞のような形態に変化して間質内を播種性に遊走することで生じると考えられるようになってきた．

クロマチンとは真核細胞内に存在する DNA と蛋白質の複合体であり，近年，いくつかのクロマチンリモデリング因子が同定され，ATP 依存的にヌクレオソームを除去し，クロマチン構造を変化させ，GTP のプロモータへの結合を助けるのみならず，遺伝子の発現，複製，分離，修復など DNA が関わるあらゆる機能の制御に積極的な役割を果たしていることが解ってきた．そこで本研究ではクロマチンリモデリングコンプレックスの一つである，reptin 遺伝子に焦点を当て，ヒ

ト口腔扁平上皮癌由来の細胞株を用いて，reptin 遺伝子が癌細胞の浸潤・転移といかに関わっているのか，特に細胞外基質へ浸潤を開始する際の制御機構の解明を試みた．

## 3. 研究の方法

### (1)細胞と培養

実験には浸潤様式の異なる 2 種のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である OSC-19 細胞<sup>12)</sup> および OSC-20 細胞を用いた．培養は 5%NU-SERUM, 10%FBS を含む DMEM 培地)を用いて，37°C 5%CO<sub>2</sub>の条件下で行った．継代培養には TRYPSIN-EDTA SOLUTION(1×) (SIGMA) を使用した．

Reptin の siRNA の配列と siRNA の導入

Reptin の siRNA の作成は QIAGEN 社 (USA) に依頼した．標的とする配列は 5'-CCGGAGATCCGTGATGTAACA-3' であり，その配列は，センス鎖が 5'-GGA GAUC-CGUGAUGUAACATT-3'，アンチセンス鎖が 5'-UGUUACAUCACGGAU CUCCGG-3'であった．

### (2)Invasion assay

ポアサイズ 8μm のケモタキセル<sup>®</sup>を用いた Boyden chamber の変法にて細胞浸潤能を検討した．PBS(-)で 50 倍希釈したマトリジェルマトリックス 50μl/well をケモタキセル<sup>®</sup>に入れてメンブランをコーティングした後，24 穴カルチャープレートにケモタキセル<sup>®</sup>を設置した．2 種類の口腔扁平上皮癌細胞と reptin の siRNA を導入した細胞を DMEM 培地で 2.5×10<sup>4</sup>/100μl の密度に希釈し，その 200μl をケモタキセル<sup>®</sup>に注入した後，DMEM 培地 500μl に浸漬させ，37.0°C 5.0%CO<sub>2</sub>の条件下に 24 時間培養した．培養後の細胞はディフ・クイック試薬にて H-E 染色を行った．光学顕微鏡を用いて，チャンバー上部より下部へ移動した癌細胞の数を数えた．各細胞群につき 3 視野を観察し，その

平均値を算定した。

### (3)Wound healing assay

Wound healing assay は、24 穴カルチャープレートに  $1 \times 10^5$ /well の 2 種類の口腔扁平上皮癌細胞と repton の siRNA を導入した細胞を播種し、10%FBS 含有 DMEM にて培養後、confluent になった状態で 1000 $\mu$ l のクリスタルチップの先でスクラッチを行い、径約 1mm の wound field を作成し、6 時間後、12 時間後に wound field に移動してきた細胞を位相差顕微鏡にて観察した。その細胞の進展してきた範囲を Adobe photoshop<sup>®</sup> 上で処理し、測定値を定量化した。

### (4)蛍光免疫染色

アクチン細胞骨格は、ファロイジンによる蛍光免疫染色にて観察した。直径 18mm のマイクロカバーガラスを敷いた 12 穴カルチャープレートに 10%FBS 含有 DMEM 培地で  $2 \times 10^4$ /well に調整した 2 種類の口腔扁平上皮癌細胞および repton の siRNA 導入細胞を播種し、24 時間培養した。培養液を除去後、3.7%ホルムアルデヒド溶液にて室温で 10 分間固定した。PBS(-)にて洗浄した後、PBS(-)にて 1/500 に希釈した rhodamine phalloidin (Molecular Probes, USA) を 20 分間作用させ、再び PBS(-)にて洗浄し、染色を行った。蛍光イメージは Axiovert 200M 蛍光顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

### (1)Repton 遺伝子の knockdown が細胞浸潤能へ及ぼす影響

2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の repton 遺伝子を knockdown することによる細胞の浸潤能の変化に関して、ケモタキセル<sup>®</sup>を用いた Boyden chamber の変法で行った。その結果、OSC-19 細胞では repton knockdown 群が control 群に比べ約 2.5 倍に浸潤能が亢進した (Student's t-test, \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.05$ ),

OSC-20 細胞では約 2 倍の亢進が認められ (Welch's t-test, \* :  $p < 0.05$ ), 2 種の細胞株とも repton knockdown 群で有意に浸潤能が亢進していた (図 1、OSC-20 細胞のデータは省略)。

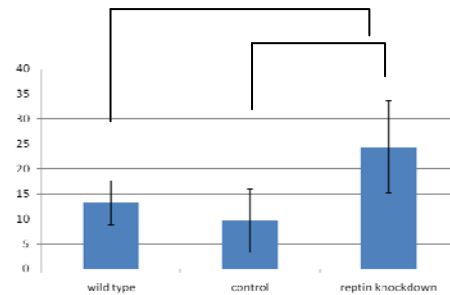


図 1

### (2)Repton 遺伝子の knockdown が遊走能に及ぼす影響

癌細胞の局所浸潤は細胞の遊走能の亢進と細胞外基質の分解が必要と考えられているため、まず repton 遺伝子を knockdown した際の細胞の遊走能の変化を wound healing assay を用いて検討した。wound field への細胞の移動を 6 時間後、12 時間後に観察したところ、OSC-19 細胞において repton knockdown 群で wound field 辺縁から増殖・移動してきた細胞による修復が時間経過とともに進行し、12 時間後にはスクラッチ部がほぼ細胞に満たされた (データ省略)。その結果を定量化したところ repton knockdown 群は control 群と比較し、約 200%細胞の遊走能が有意に亢進していた (Welch's t-test, \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.05$ )。さらに OSC-20 細胞においても同様に repton knockdown 群で約 60%遊走能が有意に亢進していた (Student's t-test, \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.05$ )。

### (3)repton 遺伝子の knockdown による 2 種類の口腔扁平上皮癌細胞の形態の変化

癌細胞が浸潤・遊走する際には、アクチン細胞骨格の再構成が起こることが知られている。そこで、*reptin* 遺伝子を knockdown した 2 種の口腔扁平上皮癌細胞の細胞骨格形態の変化を観察するため、OSC-19 および OSC-20 の各群の細胞を rhodamine phalloidin を用いて、アクチン細胞骨格の蛍光免疫染色を行った。OSC-19 細胞、OSC-20 細胞ともに control 群および wild type 群では類円形の不整な細胞形態を示したが、*reptin* knockdown 群では両者とも線維芽細胞様の紡錘形に形態が変化していた (図 2)。

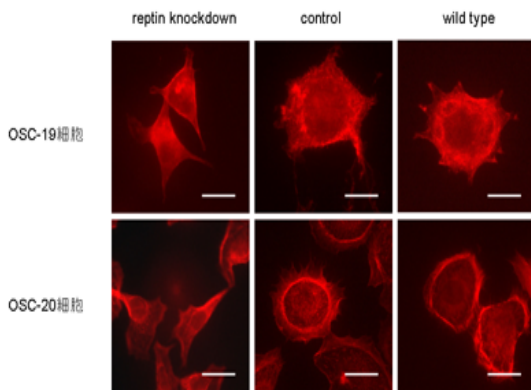


図 2

#### (4) 上皮間葉関連蛋白の発現の変化

*Reptin* 遺伝子を knockdown した際の OSC-19 細胞と OSC-20 細胞の浸潤能の変化と上皮間葉移行との関わりを検討するため、まず、2 種の口腔扁平上皮癌細胞の各群における上皮間葉関連蛋白の発現について、ウエスタンブロット法を用いて比較した。上皮系マーカーである E-cadherin, Cytokeratin の発現に関しては OSC-19 細胞、OSC-20 細胞の各群で Cytokeratin の発現はほとんど変化がなかったが、E-cadherin の発現は、両者とも *reptin* knockdown 群で低下していた。間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin に関しては、OSC19 細胞の *reptin* knockdown 群で N-cadherin の発現の上昇が

見られた。一方、OSC-19 細胞の Vimentin, OSC-20 細胞での N-cadherin, Vimentin の発現の変化は認めなかった (データ省略)。

#### (5) EMT transcriptional factor の発現の比較

前述の実験にて、OSC-19 細胞および OSC-20 細胞の *reptin* knockdown 群で EMT が起こっていることが示唆されたので、2 種の口腔扁平上皮癌細胞の各群において、EMT の transcriptional factor である Snail, Slug, Twist の発現に関してウエスタンブロット法を用いて比較した。Slug, Twist に関しては、OSC-19 細胞、OSC-20 細胞ともに各群で発現に差を認めなかったが、Snail に関しては、両者とも *reptin* knockdown 群で発現の亢進が認められた。また、Snail の上流にあると思われるシグナル伝達分子である GSK-3β についても検討した結果、*reptin* knockdown 群での発現が亢進していた (データ省略)。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Enomoto A, Nakahara H, Uchihashi T, Tsuji H, Hamada S: FDG-positive Warthin's tumor in a neck node mimicking metastasis in primary intraosseous left posterior mandibular cancer staging with PET/CT. J Oral Maxillofacial. Surg., 査読有、2011 2. 53.
2. Nakano Y, Nakahara H, Isomura (Tanaka) E, Fukuda Y, Uchihashi T, Kogo M: Adenomatoid hyperplasia of salivary gland at the uvula: Case report. J. Osaka Univ. Dent. Soc. 査読有 2011、55、111-114,
3. Ni L, Saeki M, Xu L, Nakahara H, Saijo M, Tanaka K, Kamisaki Y, : RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage. J Cell Biochem. 査読有、2009、106、920-928,
4. 49. Itsuki Y, Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, Terao Y, Kawabata S, Yatani H, Kamisaki Y, : Molecular cloning

of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. FEBS Letters 査読有 2008、267, 58-63, 2008

5. Matsuoka Y, Nakahara H, Nozaki S, Otani T, Kogo M: Inhibition of Rac Induces Hyper-Activation of c-Jun N-Terminal Kinase and Caspase-Dependent Apoptosis. Oral Science International 査読有 2008、5, 52-62,

6. 松岡裕大、中原寛和、久島潔、大谷朋弘、能崎晋一、平岡慎一郎、永田雅英、相川友直、山本悦秀、古郷幹彦：線維芽細胞との混合培養下での口腔扁平上皮癌細胞の浸潤制御日口外誌 査読有 2008、54 44-49

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 伊東優子、中原寛和、他：著明な骨形成を伴う線維形成型エナメル上皮腫：第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・平成 23 年 1 月 27 日・熊本(崇城大学市民ホール)

2. 栗本聖之、中原寛和、他：口腔乾燥症患者の乾燥症状の日内変動—口腔乾燥症患者に関する報告第一報—：第 55 回日本口腔科学会総会・平成 22 年 10 月 16 日から 18 日・千葉(幕張メッセ)

3. 濱田傑、森本泰成、小倉孝文、中原寛和、他：顎関節転移病巣から発見にいたった悪性黒色腫の一例：第 64 回日本口腔科学会学術集会・平成 22 年 6 月 24 日・25 日札幌(札幌プリンスホテル)

4. 榎本明史、田中晋、山西整、岡本怜子、辻忠孝、中原寛和、他：三叉神経中脳路核ニューロンにおけるナトリウム電流の発達：第 64 回日本口腔科学会学術集会・平成 22 年 6 月 24 日・25 日札幌(札幌プリンスホテル)

5. 徳宮元富、中原寛和、松岡裕大、古郷幹彦：ヒト口腔扁平上皮癌の浸潤能への reptin 遺伝子の影響：第 64 回日本口腔科学会学術集会・平成 22 年 6 月 24 日・25 日札幌(札幌

プリンスホテル)

6. 栗本聖之、中原寛和、他：オトガイ孔近傍に発生した顎骨中心性血管腫の一例：第 21 回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方会・平成 21 年 11 月 14 日・奈良(奈良県橿原文化会館)

7. 内橋俊大、中原寛和、他：下顎骨に発生した乳頭状角化エナメル上皮腫の一例：第 21 回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方会・平成 21 年 11 月 14 日・奈良(奈良県橿原文化会館)

8. 濱田傑、中原寛和、他：同種骨髄移植後に発生した口腔腫瘍 3 例：第 54 回(社)日本口腔外科学会総会・平成 21 年 10 月 10 日 11 日・札幌(札幌コンベンションセンター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中原 寛和 (NAKAHARA HIROKAZU)  
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員  
研究者番号：70324796

### (2) 研究分担者

松岡 裕大 (MATSUOKA YUDAI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員  
研究者番号：50448148

古郷 幹彦 (KOGO MIKIHICO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：20205371