

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791331

研究課題名（和文）唾液腺多形性腺腫の低酸素環境における増殖機構

研究課題名（英文）Survival of salivary pleomorphic adenoma cells in hypoxic condition

研究代表者

丸山 智 (SATOSHI MARUYAMA)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30397161

研究成果の概要（和文）：唾液腺多形性腺腫の間質表現は多彩であるが、乏血管性であることも特徴である。したがって間質をふくめて多形性腺腫組織は低酸素状態であるという仮説をたて、これを証明するために多形性腺腫由来細胞の増殖における低酸素依存性を試験管内で検討した。その結果、ヒト唾液腺多形性腺腫由来細胞系 SM-AP における HIF-1 α の遺伝子発現レベルは低酸素培養で変動しなかったが、VEGF 遺伝子は増強された。一方、蛋白質レベルでは、低酸素下で HIF-1 α および VEGF が上昇し、vHL は低下し、HIF-1 α は核移行していた。以上の結果から、低酸素環境下の SM-AP 細胞では、HIF-1 α が vHL で分解されずに核移行しているために VEGF 発現が強調されていることが判明した。すなわち、多形性腺腫では、乏血管性環境にもかかわらず、というより、むしろ低酸素環境を利用した VEGF 依存性の独自の増殖機構を獲得していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Salivary pleomorphic adenoma is histopathologically characterized by its colorful stroma including myxoid one which is poorly vascularized. Pleomorphic adenoma (PA) cells embedded in such poorly-vascularized stromata are supposed to have their own device to survive in hypoxic conditions. To understand the hypoxia-dependent manner of cellular proliferation, we determined both protein and gene expression levels of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), and von Hippel-Lindau (vHL) protein which degrades HIF-1 α in SM-AP cells originated from a pleomorphic adenoma. They showed more enhanced gene expression levels for VEGF but not for those for HIF-1 α under hypoxic conditions. In contrast, HIF-1 α and VEGF protein levels were kept higher in hypoxic conditions than in aerobic ones. SM-AP cells had lower expression levels for the vHL gene. On the one hand, their VEGF protein levels were kept lower in hypoxic conditions than in aerobic ones. The results indicate that PA cells are able to proliferate in the hypoxic condition because of the accumulation of HIF-1 α probably due to repressed levels of vHL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学

1. 研究開始当初の背景

癌の成立、進展には癌組織にみられる低酸素環境への適応が必要不可欠であり、克服し適応できるものが癌細胞として生存し、増殖さらには転移形質を獲得しうるとされているなか、近年、この癌の内部環境としての低酸素状態が注目されている。これまでに Semenza により低酸素応答性の転写因子である hypoxia-inducible factor (HIF)が発見され、さらに HIF-1 α のターゲット遺伝子として vascular endothelial growth factor (VEGF)や HIF-1 α の分解を制御する分子として、von Hippel-Lindau (VHL)らが報告されてきた。しかしながら、HIF により制御されている低酸素誘導遺伝子は多岐にわたっており、依然として不明な点が多く残されている。

唾液腺多形性腺腫は良性腫瘍であるが、再発頻度が高く、腫瘍組織内に癌腫が二次的に発生することが知られていることに加えて、組織学的に乏血管性が特徴で、画像診断学的にも造影信号の上昇速度もウオッシュアウトも遅いことがわかっている。したがって、多形性腺腫は低酸素状態におかれた腫瘍組織の解析には最適な実験材料である。しかしながら現在まで、多形性腺腫の乏血管性すなわち低酸素環境に注目した研究視点は国の内外に少なかった。また良性腫瘍ということもあって、これまでこの種の腫瘍細胞株の樹立は困難であったため、機能的実験は不可能であった。しかし多形性腺腫由来細胞系の樹立に成功し、ヌードマウス移植腫瘍組織で、乏血管性間質と導管様構造の誘導が特徴的な多形性腺腫・多形性腺腫内癌腫類似の腫瘍構築を再現しえた。

そこで病理組織学的に乏血管性の多彩な間質を特徴とする唾液腺多形性腺腫には低酸素状態が維持されているという仮説を実証すべく、クローン化した細胞系を通常の培養条件下で培養し、HIF-1 α 遺伝子発現レベルを確認したところ、その発現がみられた。ついで顕微鏡用培養装置を用いた低酸素培養条件下 (5% CO₂ 1% O₂ 94% N₂) でも培養条件下同様の HIF-1 α 遺

伝子発現が確認された。しかしながら蛋白質発現レベルを比較したところ、低酸素培養条件下有意に高い発現が確認された。このことから、多形性腺腫由来細胞は定常的に低酸素応答スイッチが入っており、低酸素環境において HIF 分解を抑制する機構が備わっているとみなすことができた。さらに HIF により誘導される関連遺伝子の一つである VEGF の発現を定量的 PCR で比較したところ低酸素培養条件下で4~5倍の発現をしめすことも確認しえたことから、HIF 分解抑制にのみならず、HIF が転写因子として機能しうることも予測しえた。

2. 研究の目的

本研究課題では低酸素応答機構が備わっていると確認しえた唾液腺多形性腺腫由来細胞系をもちいて、低酸素環境でも癌細胞の生存・増殖を可能にしている分子機構の解明、特にまず有意に高い発現が確認しえた HIF-1 α 蛋白質の低酸素培養条件下での分解抑制機構を第一に明らかにしたいと考えた。HIF-1 α の分解を制御する VHL および p53 等の HIF 分解関連分子の発現および遺伝子異常を解析することで、低酸素下で高い HIF-1 α 蛋白質レベルを維持している分子機構を多角的に解明し、最も責任分子として働いている分子を決定する。次に数ある HIF により誘導される関連遺伝子の発現レベルを通常の培養条件下と低酸素培養条件下で比較することで、どれが HIF 分解抑制によって発現調節を受けているのかを明らかにしたい。これにより唾液腺多形性腺腫の低酸素環境での細胞生存・増殖が維持増進されている分子機構を実証したい。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養: ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立した SM-AP1 から SM-AP6 細胞および転移能の異なるヒト腺様嚢胞癌由来細胞 ACC2/M の各細胞系について、通常の培養条件 (5% CO₂ 20% O₂) でこれまで確立した方法で培養維持した。さらに培養5日目の細胞に対し、通常の培養条件と

低酸素 (5% CO₂ 1% O₂ 94% N₂) の条件下で、5 時間培養した後、遺伝子発現、免疫細胞化学および免疫沈降法による検索をおこなった。通常培養には、所属研究室現有のマルチガスインキュベータを用いるが、低酸素培養実験には、高速で低酸素状態を可能とする小型顕微鏡用培養装置を用いた。

(2) *HIF-1α* 関連分子の遺伝子レベルの解析: 樹立した各種細胞株を上記(1)項により培養し、通常の培養条件と低酸素条件下で、通法にて RNA を抽出し、フェノール・クロロホルム法により精製し、cDNA を調整し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により各断片の cDNA を増幅して定量、またリアルタイム定量的 RT-PCR 法にて、*HIF* 分解抑制関連分子としてすでに報告されている *VHL* および *HIF-1α* 誘導関連遺伝子として *VEGF* について、遺伝子発現レベルを確認した。

(3) *HIF-1α* 関連分子の蛋白質レベルの解析: 樹立した各種細胞株を上記(1)項により培養し、通常の培養条件と低酸素条件下で、通法にて蛋白質を回収し、*VHL* および *VEGF* の抗体をもちいて免疫沈降をおこなった。沈降物は SDS ポリアクリルアミド電気泳動後にフルオログラフィーで可視化し、蛋白質発現量の多寡を確認した。また同時に樹立した各細胞 1.2x10⁴ 個をチャンバースライドに植え込み、同様に培養した後、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、各蛋白質に対する抗体をもちいて、これらの発現を蛍光抗体法にて検討した。

(4) ノードマウス移植腫瘍組織での *HIF-1α* 分子機構解析: ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立した各種細胞株を各細胞系 2x10⁶ 個/200 μl をノードマウス背部皮下に移植して腫瘍を形成させ、腫瘍組織を切除、固定し、パラフィンブロックを作製し、切片を作製するとともに、ヒト多形性腺腫組織手術材料パラフィンブロックからも同様に切片を作製し、免疫組織化学的に各分子の発現パターンを確認した。

4. 研究成果

(2008 年)

(1) 細胞培養: ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立した SM-AP1/4 および転移能の異なるヒト腺様嚢胞癌由来細胞 ACC2/M の各細胞系を、通常の培養条件 (10% FCS/5%

CO₂) と低酸素条件 (1%O₂/5%CO₂/94% N₂) とで 5 時間培養した後、遺伝子発現の検索のために、細胞回収して全 RNA を抽出し、フェノール・クロロホルム法により精製して cDNA を調整した。免疫細胞化学および免疫沈降法のためには、細胞を培養し、経時的に 4%パラフォルムアルデヒドにて固定するとともに、細胞層および培養上清を区別して蛋白質を各々回収した。

(2) *HIF-1α* 分解抑制関連分子解析: 既知の *HIF-1α* 分解関連分子・癌抑制遺伝子 *pVHL* の遺伝子ならびに蛋白質レベルの発現を検索した。*pVHL* は培養条件による有意な発現レベルの差はみとめられなかったが、細胞間では ACC より SM-AP で低く、SM-AP 細胞間では、導管上皮細胞性格の SM-AP1 で筋上皮細胞性格の SM-AP4 より発現が低い傾向がみられた。

(3) *HIF-1α* 誘導関連遺伝子解析: *HIF-1α* により誘導される遺伝子のひとつ *VEGF* の遺伝子および蛋白質の発現レベルを検索した。遺伝子発現に関しては、高転移株 ACCM および多形性腺腫由来細胞 SM-AP で、低酸素下の *VEGF* の高発現傾向があった。とくに、定量的 PCR 法で、*VEGF*_{121/165} のスプライスバリエーションの高発現が確認された。SM-AP 細胞系では、低酸素下で蛋白質発現が同様に上昇する傾向がえられた。

(2009 年)

(1) *HIF-1α* 分解抑制関連分子解析: 既知の *HIF-1α* 分解関連分子 *VHL* の蛋白質レベルの発現を詳細に検索した。多形性腺腫由来細胞 SM-AP を通常の培養条件 (10% FCS/5% CO₂) と低酸素条件 (1%O₂/5%CO₂/94%N₂) とで 5 時間培養した後、細胞層を可溶化して 600 mg のタンパク質を調整・回収ののち、免疫沈降法/ウエスタンブロッティング法にて測定したところ、*VHL* は、導管上皮細胞性格の SM-AP1 ならびに筋上皮細胞性格の SM-AP4 のいずれにおいても、低酸素条件下よりも通常の培養条件下のほうが高発現していることが確認された。

(2) ノードマウス移植腫瘍での *HIF-1α* 分子機構解析: 2x10⁶ 個/200 μl をノードマウス背部皮下に移植して作製した腫瘍から腫瘍組織を切除、固定し、切片を作成し、免疫組織化学的に *HIF-1α* および *VEGF* の

発現パターンを確認したところ、腫瘍組織内に発現がみとめられた。

5. 研究の総括と今後の展望

これまでの実験結果より、多形性腺腫由来細胞では、低酸素下での HIF-1 α タンパク質の高発現および VHL タンパク質の低発現および p53 の変異により HIF-1 α の degradation の抑制機構がはたらいており、低酸素状態で核に移行した HIF-1 α により VEGF の高い発現レベルを維持することで、低酸素環境で増殖さらには転移形質を誘導している可能性が示唆された。

今後は、低酸素応答機構が備わっている SM-AP 細胞系を用いて VHL の機能解析を中心に低酸素環境で癌細胞の生存・増殖を促進している分子機構を明らかにしようとして計画している。そのためには、まず第一に、低酸素培養条件下で有意に高い発現が確認しえた HIF-1 α 蛋白質の分解抑制機構の解明を第一にあげ、HIF-1 α の分解を制御する VHL 遺伝子発現および遺伝子異常の有無を中心に解析することで、低酸素下で高い HIF-1 α 蛋白質レベルを維持している機構を多角的に解明する。第二に、上記分子機構が生体内においても機能しているのかを検証するため、ヌードマウス移植腫瘍組織およびヒト多形性腺腫組織手術材料を含むヒト癌組織材料を用いて、移植腫瘍組織内の酸素分圧を測定することで低酸素環境が維持されているかを確認するとともに、各分子機構に関連する分子を免疫組織化学的に解析したい。第三に、安定かつ過剰な VHL 蛋白質発現をみとめる細胞系を作製することで低酸素環境が腫瘍形成におよぼす影響を検討する。に推定したような多形性腺腫の低酸素環境で細胞生存・増殖が維持増進されている分子機構を実証したい。

6. 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 5 件)

- ①. Maruyama S, Cheng J, Yamazaki M, Zhou XJ, Zhang ZY, He RG, Saku T. Metastasis-associated genes in salivary adenoid cystic carcinoma and oral squamous cell carcinoma: a differential DNA chip analysis between metastatic and non-metastatic cell systems. *Cancer Genet Cytogenet* (査読有), 196 (1):14-22, (2010).

- ②. Maruyama S, Cheng J, Shingaki S, Tamura T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu Y, Shimizu N, Saku T. Establishment and characterization of pleomorphic adenoma cell systems: an in-vitro demonstration of carcinomas arising secondarily from adenomas in the salivary gland. *BMC Cancer* (査読有) 9: 247-265, (2009).
- ③. Maruyama S, Cheng J, Yamazaki M, Liu A, Saku T. Keratinocyte growth factor and its associated molecules at the site of capsular invasion and vascular involvement in salivary pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med* (査読有), 38 (4): 377-385, (2009).
- ④. Tilakaratne WM, Kobayashi T, Ida-Yonemochi H, Swelam W, Yamazaki M, Mikami T, Alvarado CG, Shahidul AM, Maruyama S, Cheng J, Saku T. Matrix metalloproteinase 7 and perlecan in oral epithelial dysplasia and carcinoma in-situ: an aid for histopathological recognition of their cell proliferation centers. *J Oral Pathol Med* (査読有), 38 (4): 348-355, (2009).
- ⑤. Tsuneki M, Cheng J, Maruyama S, Ida-Yonemochi H, Nakajima M, Saku T. Perlecan-rich epithelial linings as a background of proliferative potentials of keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Pathol Med* (査読有) 37 (5): 287-293, (2008).

[学会発表] (計 3 件)

- ①. 丸山 智, 程 珺, 山崎 学, 朔敬: 唾液腺多形性腺腫の低酸素環境における増殖機構: SM-AP 細胞による検討. 第 99 回日本病理学会総会, 東京都, 2010 年 4 月 27-29 日, 日本病理学会会誌, 99 (1): 308, 2010.
- ②. 丸山 智, 程 珺, 山崎 学, 小林孝憲, 朔 敬: 唾液腺多形性腺腫の低酸素環境における増殖機構. 第 20 回日本臨床口腔病理学会総会, 札幌市, 2009 年 7 月 29-31 日, 第 20 回日本口腔病理学会プログラム抄録集: 98, 2009.
- ③. Maruyama S, Cheng J, Saku T.: Survival of salivary pleomorphic adenoma cells in hypoxic condition. The 14th International Congress of International Association of Oral pathologists. June 22-26, 2008, San Francisco, USA. Program and Abstract, p 52, 2008.

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 智 (MARUYAMA SATOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：30397161

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし