

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592080

研究課題名（和文）MALT1 による口腔癌の進展抑制遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the progress suppressor of mucosa-associated lymphoid tissue 1 with oral carcinomas

研究代表者

千葉 忠成（CHIBA TADASHIGE）

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：60350138

研究成果の概要（和文）：MALT1 はリンパ球系において重要な役割をしているだけでなく、スキャフォールド機能で NF- κ B シグナル系に関与していることがわかっている。我々は口腔扁平上皮癌における MALT1 の役割について研究してきた。最初の研究では、MALT1 発現細胞株においてケラチン 8/18 とケラチン 5/14 の発現変動がプロテオミクス解析により、認められた。ケラチン 5/14 は腫瘍形成のプロセスにおいて重要なマーカーであり、ケラチン 5/14 の発現の減少は腫瘍形成と相関があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) is a major player in lymphocyte activation and modulates NF- κ B signaling pathways through its scaffolding function.

We studied the role of MALT1 in the oral carcinoma cells. In the first study, we analyzed alterations of protein expression in response to MALT1 in oral carcinoma cells with proteomics analysis. Four different keratins, K8/18 and K5/14 were identified in MALT1-expressing and -negative HSC2 cells. K5/14 is an important marker in the tumorigenic process, distinguishing normal from tumor cells, and decreased K5/14 expression correlates with tumorigenic progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：癌、MALT1、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) は T 細胞や B 細胞の抗原受容体を

介して、CARMA1-Bcl10-MALT1 複合体を形成し、転写因子 NF- κ B を活性化することでシグナルを伝達することがわかっている。し

しかし、上皮系では口腔癌の進展に関わる形質変化、浸潤、増殖動態について、そのターゲット因子やメカニズムに関してはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに口腔癌の進展制御因子の候補として MALT1 の発現停止が癌の悪性度(浸潤能、増殖能など)を増加させることを初めて明らかにした。本研究では MALT1 が口腔癌の高度悪性形質を抑制する分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞の HSC2(MALT1 低発現細胞)に MALT1 遺伝子(ドメイン欠失ミュータントを含む)を導入し、MALT1 発現安定株を樹立した。これらの細胞株を用いて、以下の実験を進めていった。

1) 質量分析装置を用いて、MALT1 発現安定株で変動したタンパク質の検索を行い、プロテオミクス解析を行った。

2) 細胞の増殖能の解析には MTT 法により 12 時間おきに 72 時間までならびに xCELLigence (ROCHE 社) を用いて、リアルタイムに 72 時間まで測定した。

3) 細胞周期解析はフローサイトメーター (Millipore 社) で、各周期の分布および細胞増殖時間から、各細胞周期の長さを算出した。

4) DNA マイクロアレイにより MALT1 発現増加により変動する遺伝子を検索し、得られた結果を IPA (Ingenuity 社) でパスウェイ解析を行った。

5) 各実験で探索された遺伝子、タンパク質はウエスタンブロットおよびリアルタイム PCR にて確認を行った。

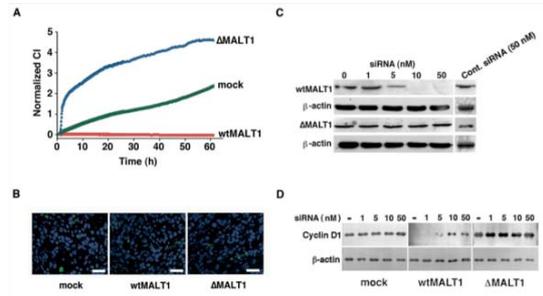
4. 研究成果

MALT1 発現に伴い、増加するタンパク質の変動をプロテオミクス解析したところ、転写因子(ZIC687)、DNA 修復因子(RAD51)、ケラチン(K5、K14、K17)などが増加することが確認された。また、ケラチン(K8、K18)が減少することもわかった。

Protein No.	Accession No.*	Annotation	Mr (kDa) Theore. S	Coverage (%) †	MS score ‡
wtMALT1 HSC2 cells					
1	Q8N160	Zinc finger protein 687	115.6	129.5	16
2	Q9N90	Spermatogenesis associated 5	97.7	97.9	25
3	P11021	GRP78 precursor	72.1	72.3	38
4	P13647	Keratin 5	62.4	62.4	64
5	P02533	Keratin 14	44.7	51.6	23
6	43502	RAD51 homolog C	42.6	42.2	23
ΔMALT1 HSC2 cells					
7	Q8GMYO	Keratin 8	53.4	53.7	34
8	P05783	Keratin 18	47.3	48.1	38
9	P58159	RNA-binding motif protein	42.3	44.3	43
10	Q02978	Solute carrier family 25, member 11	34.1	34.1	26

*UniProt (www.uniprot.org) accession number
†Number of sequence coverage in MALDI-TOF MS.
‡MASCOT score.
§ Theoretical Mr (kDa)

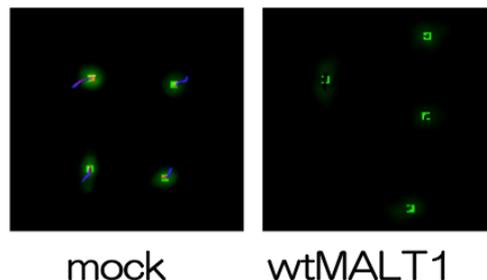
ケラチン(K5、K14、K8、K18)は癌の腫瘍マーカーとしても用いられており、癌細胞の増殖能との関連性が高いことから、細胞周期ならびに細胞増殖能の解析を行った。結果、MALT1 の発現増加は細胞の増殖能を顕著に低下させた。



フローサイトメーターを用いた細胞周期解析では、G1 チェックポイントでの抑制を示唆する結果が得られた。さらに DNA マイクロアレイ解析でも、MALT1 の発現増加は、細胞運動、細胞周期、細胞骨格系に負の影響を与えることがわかった。

Gene Symbol	FC	Gene Description
Mir-19a-3p	0.42	Mir-19a-3p
JUP	0.42	Junction plakophilin 1/Keratin 18
ILK1	0.42	Integrin-linked kinase
ITF1	0.42	Integrin-linked kinase 1
CD36	0.42	Integrin alpha 5/CD36
SECY	0.42	Securin
SEPRNA3	0.42	Securin precursor 3
TAF11	0.42	TAF11
TAF12	0.42	TAF12
TAF13	0.42	TAF13
TAF14	0.42	TAF14
TAF15	0.42	TAF15
TAF16	0.42	TAF16
TAF17	0.42	TAF17
TAF18	0.42	TAF18
TAF19	0.42	TAF19
TAF20	0.42	TAF20
TAF21	0.42	TAF21
TAF22	0.42	TAF22
TAF23	0.42	TAF23
TAF24	0.42	TAF24
TAF25	0.42	TAF25
TAF26	0.42	TAF26
TAF27	0.42	TAF27
TAF28	0.42	TAF28
TAF29	0.42	TAF29
TAF30	0.42	TAF30
TAF31	0.42	TAF31
TAF32	0.42	TAF32
TAF33	0.42	TAF33
TAF34	0.42	TAF34
TAF35	0.42	TAF35
TAF36	0.42	TAF36
TAF37	0.42	TAF37
TAF38	0.42	TAF38
TAF39	0.42	TAF39
TAF40	0.42	TAF40
TAF41	0.42	TAF41
TAF42	0.42	TAF42
TAF43	0.42	TAF43
TAF44	0.42	TAF44
TAF45	0.42	TAF45
TAF46	0.42	TAF46
TAF47	0.42	TAF47
TAF48	0.42	TAF48
TAF49	0.42	TAF49
TAF50	0.42	TAF50
TAF51	0.42	TAF51
TAF52	0.42	TAF52
TAF53	0.42	TAF53
TAF54	0.42	TAF54
TAF55	0.42	TAF55
TAF56	0.42	TAF56
TAF57	0.42	TAF57
TAF58	0.42	TAF58
TAF59	0.42	TAF59
TAF60	0.42	TAF60
TAF61	0.42	TAF61
TAF62	0.42	TAF62
TAF63	0.42	TAF63
TAF64	0.42	TAF64
TAF65	0.42	TAF65
TAF66	0.42	TAF66
TAF67	0.42	TAF67
TAF68	0.42	TAF68
TAF69	0.42	TAF69
TAF70	0.42	TAF70
TAF71	0.42	TAF71
TAF72	0.42	TAF72
TAF73	0.42	TAF73
TAF74	0.42	TAF74
TAF75	0.42	TAF75
TAF76	0.42	TAF76
TAF77	0.42	TAF77
TAF78	0.42	TAF78
TAF79	0.42	TAF79
TAF80	0.42	TAF80
TAF81	0.42	TAF81
TAF82	0.42	TAF82
TAF83	0.42	TAF83
TAF84	0.42	TAF84
TAF85	0.42	TAF85
TAF86	0.42	TAF86
TAF87	0.42	TAF87
TAF88	0.42	TAF88
TAF89	0.42	TAF89
TAF90	0.42	TAF90
TAF91	0.42	TAF91
TAF92	0.42	TAF92
TAF93	0.42	TAF93
TAF94	0.42	TAF94
TAF95	0.42	TAF95
TAF96	0.42	TAF96
TAF97	0.42	TAF97
TAF98	0.42	TAF98
TAF99	0.42	TAF99
TAF100	0.42	TAF100

Wound-healing assay では、細胞の運動性が遊走能・増殖能・細胞間接着により大きく影響を受けるため、増殖能・細胞間接着の影響を排除するため単一細胞レベルでの遊走能を Time-Lapse Analysis を行い、細胞の移動速度が MALT1 ではほとんど動きが認められなかった。



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 2 件)

① Kawamoto H, Ohyama Y, Chiba T, Yagishita H, Sakashita H, Imai K.

Proteomic identification of keratin alterations with enhanced proliferation of oral carcinoma cells by loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 expression. *Int J Oncol*, in press.

② Ohyama Y, Kawamoto H, Chiba T, Maeda G, Sakashita H, Imai K.

Inhibition of TGF-beta and EGF pathway gene expression and migration of oral carcinoma cells by mucosa-associated lymphoid tissue 1. *British J cancer*, in press.

[学会発表] (計 14 件)

① Kawamoto H, Ohyama Y, Chiba T, Yagishita H, Sakashita H, Imai K: MALT1-responsive keratin rearrangement and proliferation of oral carcinoma cells, PROGRAM BOOK 91th IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, p.X (No. 2711), 2013.

② Ohyama Y, Kawamoto H, Chiba T, Maeda G, Sakashita H, Imai K: Profiling and network analysis of MALT1-responsive gene datasets in SCC, PROGRAM BOOK 91th IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, p.X (No. 1459), 2013.

③ 川本幸寛、大山嘉人、瀧澤将太、横塚裕二、篠原優紀、福田正勝、千葉忠成、坂下英明: MALT1 による口腔癌細胞の変動タンパク質と増殖能について, 第 57 回日本口腔外科学会プログラム・抄録集, Suppl: 115 (No. D3-2), 2012.

④ 川本幸寛、大山嘉人、千葉忠成、坂下英明、今井一志: 口腔癌細胞はMALT1 によりケラチンの発現と増殖能を変動する, *J Oral Biosci*, Suppl: 109 (No. P1-9), 2012.

⑤ 笹谷和伸、前田元太、須藤遥、千葉忠成、今井一志: 口腔癌におけるp120 カテニンと β カテニン発現の免疫組織学的解析, *J Oral Biosci*, Suppl: 136 (No. P1-119), 2012.

⑥ 橋本孝志、添野雄一、田谷雄二、青葉孝昭、那須優則、前田元太、須藤遥、千葉忠成、今井一志: 口腔癌の進展にはカドヘリンスイッチではなく、E-カドヘリンの発現低下が関連する, *J Oral Biosci*, Suppl: 137 (No. P1-120), 2012.

⑦ 山崎典孝、須藤遥、前田元太、千葉忠成、今井一志: 関節リウマチ滑膜線維芽細胞様細胞におけるVE-カドヘリン発現とその誘導機

構, *J Oral Biosci*, Suppl: 166 (No. P2-113), 2012.

⑧ 大山嘉人、川本幸寛、千葉忠成、坂下英明、今井一志: 口腔癌細胞におけるMALT1 誘導性遺伝子のマイクロアレイ解析, 第 85 回日本生化学会大会プログラム・抄録集, Suppl: 115 (2P-682), 2012.

⑨ Y. Soeno, Y. Shirako, K. Fujita, Y. Taya, Y. Shimazu, K. Nakau, K. Sato, T. Chiba, K. Imai, T. Aoba. Progression/metastasis of xenografted oral cancer cell-lines in mouse tongue. 41st Annual Meeting & Exhibition of the AADR, March 21-24, 2012, Tampa, FL, USA.

⑩ Chiba T, Maeda G, Kawashiri S, Kato K, Imai K: Epigenetic loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 expression in patients with oral carcinoma, Japan China Dental Conference 2012, Suppl: 18 (No. 0407), 2012.

⑪ 川本幸寛、大山嘉人、千葉忠成、坂下英明、今井一志: 口腔扁平上皮癌細胞におけるMALT1 誘導タンパク質のプロテオーム解析 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 *J Oral Biosci*, 53 (Suppl): pp.124, 2011.

⑫ 添野雄一、田谷雄二、島津徳人、藤田和也、佐藤かおり、千葉忠成、今井一志、青葉孝昭: ヒト舌扁平上皮癌におけるCadherin Switchと細胞形質変化 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 *J Oral Biosci*, 53 (Suppl): pp.197, 2011.

⑬ 添野雄一、白子要一、藤田和也、田谷雄二、島津徳人、中右かよ、佐藤かおり、千葉忠成、今井一志、青葉孝昭: 腫瘍微小環境と浸潤転移能: ヒト扁平上皮癌モデルにおける解析 第 34 回日本分子生物学会年会 平成 23 年 12 月 13-16 日 横浜市.

⑭ 千葉忠成、川本幸寛、大山嘉人、今井一志: 口腔癌の進展におけるMALT1 の機能 日本歯科大学歯学会研究推進フォーラム 平成 23 年 10 月 4 日.

[図書] (計 2 件)

① Imai K, Maeda G, Chiba T. Cadherin expression and progression of squamous cell carcinomas of the oral cavity. pp.121-136, 2012, In *Squamous Cell Carcinoma*, Li X, ed., InTech-Open Access Publisher, Rijeka, Croatia (ISBN

978-953-307-864-9)

② 今井一志、須藤遥、前田元太、千葉忠成：
口腔癌進展のメカニズムと分子標的薬，歯学，
100（春期特集号）：9-13，2013

〔産業財産権〕

○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

千葉 忠成 (CHIBA TADASHIGE)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号：60350138

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：