

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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890225

研究課題名（和文）In vitro 口腔発がん可視化モデルを用いた浸潤様式・転移機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of invasive and metastatic potential using visible oral carcinogenesis model

研究代表者

頭司 雄介（ZUSHI YUSUKE）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：80581206

研究成果の概要（和文）：われわれはヒト正常舌ケラチノサイトに HPV 陽性、陰性の場合分けした上で口腔扁平上皮がんとの関連が示唆されているがん遺伝子を導入することにより、in vitro で口腔多段階がんを忠実に再現したモデルを世界で初めて樹立した。

研究成果の概要（英文）： We have developed for the first time an in vitro culture model faithfully recapitulating the development of HPV-positive and negative oral squamous cell carcinomas with genetically defined elements using normal human tongue keratinocytes (HTKs).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2011 年度	1,020,000	306,000	1,326,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,140,000	642,000	2,782,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔がん、発がん、HPV、erbB1

1. 研究開始当初の背景

がんの発生、進展過程を遺伝子変化と対応させて解明することは、現在のがん研究において最重要課題の一つである。発がん経路には臓器特異性もあるため、各臓器に対応する多段階発がんモデルが提唱されている。近年、全世界で禁煙傾向が高まっているにもかかわらず、口腔がんを含む頭頸部がんは増加傾向にあり、世界では臓器別で第6位となって

おり、口腔・中咽頭がんの発症は全世界で400,000人で、うち200,000人が死亡している[Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1, IARC Press, 2001]。口腔領域では、従来より乳頭腫などの良性病変における粘膜型HPVの関与が指摘されており、これまで口腔がんにおけるHPV DNA 検出頻度は20%前後とされてきた(Serge J. et al., Int J Cancer, 121:

2465-2472, 2007)。子宮頸がんにおける HPV DNA の検出頻度は 95%以上で、WHO も「HPV の持続感染がなければ子宮頸がんの危険はない」との声明を出している。しかし、頭頸部がんにおけるリスク因子は HPV に加え喫煙・飲酒が大きく、HPV DNA の検出だけでなく p16 の高発現や p53 の変異の有無などにより HPV 感染との因果関係を明らかにしようとする臨床統計学的検討が進行している。

遺伝的に改変されたマウスのモデルの報告から口腔扁平上皮がんがヒト口腔上皮細胞より発生することが報告されている。臨床検体を用いた解析では erbB1 遺伝子の変異や増幅を始め多くの遺伝子異常が報告されているが、前がん病変から悪性化していく発がん過程はいまなお不明である(図 1)。発見された遺伝子異常の統計学的解析から、がん化との間の因果関係が推測されているが、それらの解析から因果関係を証明する事は困難である。遺伝子異常とがん化との因果関係を証明するには、ヒト正常細胞にがんで見つかる異常を人為的に再現し、形質転換させた細胞の表現型を解析することが有効である。

2. 研究の目的

口腔がんにおける発がんの責任遺伝子を明らかにするため、ヒト正常口腔粘膜上皮細胞に腫瘍原性をもたらす遺伝子(発現)異常の組み合わせを HPV 陽性、陰性の場合に分けて同定する。口腔がんの悪性度と遺伝子(発現)異常の組み合わせの間の相関を明らかにし、それらの遺伝子異常を標的とした治療法の各悪性度における妥当性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 試薬

本研究で用いた試薬で特に記載のないものは Sigma 社および Invitrogen 社、和光純薬、ナカライテスクの試薬を用いた。

(2) 細胞培養

同意を得た飲酒・喫煙・がんの既往歴のない舌嚢胞の患者 2 名の手術検体から、以下の方法でヒト正常舌角化細胞 Human tongue keratinocyte (HTK) を兵庫医科大学病院、歯科口腔外科にて分離培養した。(HTK1 は 65 歳、女性・HTK3 は 58 歳女性よりそれぞれ採取した。)

正常舌粘膜を 1mm 角にカットし、BIOCOAT collagen 1 coated dish 上に約 10mm 間隔で貼り付け、少し乾燥するまで放置後、抗生剤(カルベニン 2 μ g/ml、アムフォテリシン B 1 μ g/ml) を添加した培地を加え、explant 法で静置した。HTK1, HTK3 にレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターを用い、以下の不死化細胞株を樹立した。HTK1E6E7, HTK3-hTERT-E6E7(以下 HTK3TE6E7), HTK1-

CDK4/cyclinD1/ hTERT(以下 HTK1K4DT), HTK3- CDK4/cyclinD1/ hTERT(以下 HTK3K4DT)。各細胞株は EpiLife(Cascade Biologics 社, 500 ml にウシ下垂体抽出物(BPE) 20mg と EGF 0.1 μ g を添加)で培養した。細胞の培養はすべて 5%CO₂、37°C 条件下で行った。がん関連遺伝子の追加導入にもレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターを用いた。導入した遺伝子の発現確認は Western Blot, TRAP assay にて行った。樹立された細胞株につき細胞増殖曲線, 軟寒天培地中でのコロニー形成能, ノードマウス皮下における造腫瘍能, 舌同所性移植による造腫瘍能と転移能などを解析した。同所性移植実験には予めルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株を用い In Vivo Imaging System により腫瘍の増殖をモニターした。

(3) 遺伝子安定発現細胞の作製

各 cDNA (HPV16 型 E6E7, cyclin D1, cdk4R24C, hTERT, DNp53, erbB1, erbB1d746-750, H-RasV12, c-MycT58A, Nrf2T80K, Emerald-luciferase) は Gateway System(Invitrogen 社)を用いてエンタリーベクターに BP 反応により組換え後、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター プラスミドに LR 反応により組換え導入した。BP 反応、LR 反応はそれぞれ添付書類の指示に従った。各エンタリークローンについてシークエンス解析により塩基配列が正しいことを確認した。それぞれの発現コンストラクトと packaging plasmid mixture を 293T 細胞に遺伝子導入し、60 時間後に培養液中の組換えレトロウイルスまたはレンチウイルスを回収した。薬剤耐性マーカーをもつレトロウイルスは Hela 細胞で力価を測定した。レンチウイルスの力価は定量 RT-PCR 法により推定した。ウイルス感染にはポリブレン 6 μ g/ml 存在下で MOI (multiplicity of infection) =1-3 にて行った。

(4) ウェスタンブロッティング

細胞を PBS で 2 回洗浄後、lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 20% Glycerol, 0.1% SDS) を用いて回収した。ソニケーション後遠心分離し上清を細胞溶解液とした。蛋白定量後 5% 2-メルカプトエタノールを加え、それぞれ 10-15 μ g/lane をウェスタンブロッティングに供与した。分子量マーカーは Precision Protein Standards (Bio-Rad) を用いた。アクリルアミド濃度 5-20%の蛋白泳導用既製ゲル(アトー株式会社)で電気泳動を行い、ゲル中の蛋白質を 3 種の転写緩衝液(A:300mM Tris, 20% Methanol, B:25mM Tris-HCl, 20% Methanol, 0.05% SDS, C:25mM Tris-HCl, 40mM アミノカプロン酸, 20% Methanol, 0.05% SDS) をもちいて、Immobilon PVDF 膜

(MILLIPORE) に、セミドライ式のブロッキング装置 (アトー株式会社) を用いて転写した。転写後の膜を 5% スキムミルク/TBST (0.05% Tween/TBS, 10mM Tris-HCL (pH 8.0), 150mM NaCl) で室温にて 30 分ブロッキングした後に TBST で洗浄した。その後、それぞれの蛋白に対する一次抗体を 4°C で一晩反応させた。二次抗体として HRP 結合抗 IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories; 1:2000) を室温で 1 時間反応させた。蛋白質の検出には Lumi-Light plus Western Blotting Substrate を用いた化学発光法を行った。その後、LAS-3000 (富士フイルム社) を用いて検出した。

(5) 細胞増殖曲線

12well plate に細胞を triplicate で 8000 個ずつ播種し、1, 4, 7, 10 日目に細胞数をカウントした。

(6) 軟寒天培地における形成能

培養用 seaplaque agarose 2% 溶液 (2% SPA) を電子レンジで溶かした後、約 40°C に加温した完全培地 (KSFM) と混合し SPA 濃度を調整した。直径 35 mm の dish (6 well plate) に 0.7% SPA/完全培地混合溶液を 1 well 当り 1.5 ml 入れて室温で固形化した後、細胞 5×10^4 個を 0.4% SPA/完全培地混合溶液 1 ml 中に浮遊させ積層した。翌日 1.5 ml の 0.7% SPA/KSFM 混合溶液を積層し、4 週間後のコロニー数をカウントした。

(7) ノードマウス皮下移植

5 週齢のバルブ C ノードマウス、メスの皮下に 2×10^7 個/ml の PBS 細胞浮遊液と Matrigel (BD Biosciences) を 1:1 で混合した溶液を 0.1 ml (1×10^6 個) ずつ 4 箇所に移植した。

(8) ノードマウス舌同所性移植、IVISystem (In Vivo Imaging System)

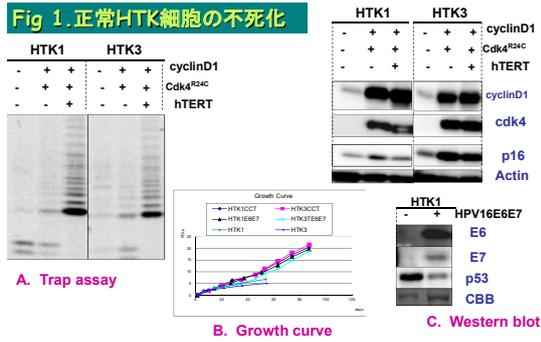
5 週齢のバルブ C ノードマウス、メスの舌に細胞 1×10^5 個を PBS で懸濁し、50 μ l ずつ移植した。移植に際し、In Vivo Imaging System を使用した。舌腫瘍、所属リンパ節への転移を、2 週間ごとにマウス腹腔内にルシフェリン溶液 (15mg/ml) 150mg/kg で投与し、IVIS システムで検出した。

4. 研究成果

(1) 研究結果の概要

親株であるヒト正常舌角化細胞 HTK は継代数 5 で増殖停止したが、HTK1E6E7, HTK3TE6E7, HTK1K4DT, HTK3K4DT は継代数 20 代を越えても正常基底細胞と同様の形態を維持しながら増殖し続けた (Fig 1)。

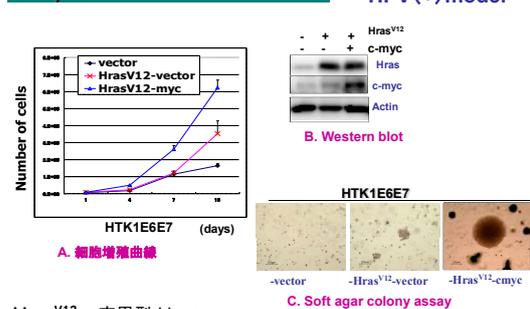
Fig 1. 正常HTK細胞の不死化



HTK1E6E7: HTK1にHPV16E6E7を導入した細胞
HTK1K4DT, HTK3K4DT: HTK1, HTK3にCdk4, cyclinD1, hTERTを導入した細胞

HTK1E6E7 の平皿上の細胞増殖曲線では、Hras 単独追加導入でも増殖速度の亢進をみとめ Hras と cMyc を導入した細胞では更に増殖速度が亢進していた。軟寒天培地中では vector のみ導入の細胞は足場非依存性の増殖能はみとめなかったが、Hras 単独追加導入で増殖能を示し、Hras+cMyc で著しい増殖能の亢進を認めた (Fig 2)。

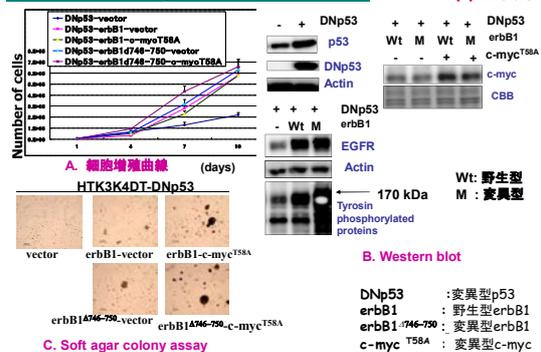
Fig 2. HTK1E6E7に変異型Hras、野生型c-mycを導入した細胞の解析



Hras^{V12}: 変異型 Hras
c-myc: 野生型 c-myc

HTK3K4DT-DNp53 の平皿上の細胞増殖曲線では、野生型 erbB1 もしくは変異型 erbB1 を単独で導入すると増殖速度の亢進をみとめ、野生型 erbB1 もしくは変異型 erbB1 と cMyc の両方を導入した細胞では更に増殖速度が亢進していた。軟寒天培地中における増殖でも同様の傾向を認めた (Fig 3)。

Fig 3. HTK3K4DTに変異型p53、野生型erbB1もしくは変異型erbB1、変異型c-mycを導入した細胞の解析



DNp53: 変異型 p53
erbB1: 野生型 erbB1
erbB1^{Δ746-750}: 変異型 erbB1
c-myc^{T58A}: 変異型 c-myc

次いで HTK1E6E7, HTK1K4DT, HTK3K4DT に様々ながん関連遺伝子を導入し樹立した細胞のヌードマウスの皮下移植による造腫瘍能を検討した (Table 1, 2)。

Table 1. HTK1E6E7に様々ながん関連遺伝子を導入した細胞のヌードマウス皮下における腫瘍原性の解析 ... HPV(+) model

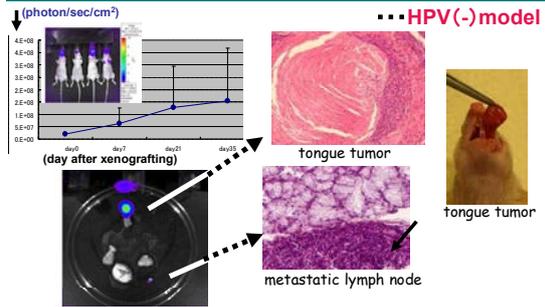
cell line	No. of tumors / injection (腫瘍塊400mm ³ に達した週数)	
	皮下移植 1 × 10 ⁶ 個	
HTK1E6E7-Hras ^{V12} -c-myc	4/4 (4週) ...	
-Hras ^{V12} -vector	3/4 (4週)	
-Kras ^{V12} -c-myc	2/4 (24週)	
-Kras ^{V12} -vector	0/4	
-erbB1-c-myc	3/4 (4週)	
-erbB1-vector	0/4	
-erbB2-c-myc	0/4	
-vector	0/4	

Table 2. HTK1K4DT, HTK3K4DTに変異型p53, 変異型Hras, 野生型, 変異型 erbB1, 変異型c-mycを導入した細胞のヌードマウスにおける腫瘍原性の解析 ... HPV(-) model

cell line	No. of tumors / injection (腫瘍塊400mm ³ に達した週数)		No. of tumors / mouse
	皮下移植 1 × 10 ⁶ 個	舌移植 1 × 10 ⁵ 個	
HTK1K4DT-DNp53-Hras ^{V12} -c-myc	4/4 (2週)	1/2	
-DNp53-Hras ^{V12} -c-myc-Nrf2 ^{T80K}	4/4 (2週)	2/2	
-DNp53-Hras ^{V12} -vector	0/4		
-Hras ^{V12} -c-myc	3/4 (15週)		
HTK3K4DT-DNp53-Hras ^{V12} -c-myc ^{T58A}	4/4 (3週) ...		
-DNp53-Hras ^{V12} -vector	0/4		
-vector-Hras ^{V12} -c-myc ^{T58A}	3/4 (5週)		
-DNp53-erbB1-c-myc ^{T58A}	4/4 (9週)		
-DNp53-erbB1-vector	0/4		
-DNp53-erbB1 ^{T746-750} -c-myc ^{T58A}	4/4 (5週)		
-DNp53-erbB1 ^{T746-750} -vector	0/4		

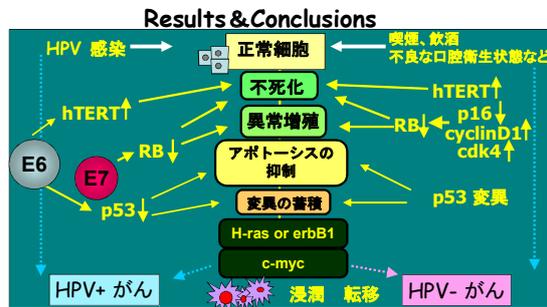
HTK1E6E7 では Hras と cMyc の導入により 4 週で 100%の腫瘍形成能を認めた。Hras 単独では 3/4 に腫瘍形成を認めた。HTK1K4DT、HTK3K4DT のヌードマウス皮下移植では Hras と cMyc の導入で 2 週、野生型 erbB1 と cMyc の導入で 9 週、変異型 erbB1 と cMyc の導入で 5 週で 100%に腫瘍形成を認めた。HTK1K4DT に DNp53, Hras, cMyc を導入した、ヌードマウス皮下移植で著しい造腫瘍性を獲得した細胞を舌に同所性移植したところ、n=4 匹中 3 匹、早いもので 2 週間で腫瘍を形成した。2 週間ごとに IVIS システムを用い発光強度より腫瘍体積増加を推定した。屠殺の際に顎下リンパ節、肺、肝臓を調べたところ、HTK1K4DT に DNp53, Hras, cMyc を導入した細胞でもリンパ節に転移を認めた (n=4 中 2 匹)。舌腫瘍、転移リンパ節の組織学的検討像を示す (Fig 4)

Fig 4. HTK1K4DTに変異型p53, 変異型Hras, 野生型c-myc, 変異型Nrf2, luciferaseを導入した細胞をヌードマウス舌へ同所性移植



(2) 研究結果のまとめ、今後の展望

ヒト正常舌角化細胞に HPV16 E6E7 を導入、もしくは cdk4, cyclin D1, hTERT を導入することにより不死化した。これらの細胞に口腔扁平上皮がんとの関連が示唆されているがん遺伝子 (erbB1 もしくは Hras, cMyc) やドミナントネガティブ p53 をレトロウイルスを用いて遺伝子導入することにより、人為的に形質転換させることに成功した。すなわち、HPV 陽性ならびに陰性の口腔扁平上皮がんの in vitro 多段階発がんモデルを確立した。これらのモデルはヒト口腔扁平上皮がんで見つかる異常とがん化・がん形質の維持における意義を明らかにする上で重要な役割を果たすと考えられた。



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 Yusuke Zushi, Mako Narisawa-Saito, Kazuma Noguchi, Yuki Yoshimatsu, Takashi Yugawa, Nagayasu Egawa, Shin-ichi Ohno, Masatoshi Fujita, Masahiro Urade and Tohru Kiyono. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV positive and negative human oral squamous cell carcinoma. Am J Can Re

2011;1(7):869-881 www.ajcr.us
/ISSN:2156-6976/ajcr0000079 (査読有)

- ② 頭司雄介, 野口一馬, 浦出雅裕. 口腔粘膜の多段階発がんヒトパピローマウイルス (HPV). 口腔組織培養学会誌 2010.10.19:2:19-27. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 頭司雄介, 野口一馬, 山村倫世, 高岡一樹, 瀬川英美, 岸本裕充, 浦出雅裕, 不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた口腔扁平上皮がんの多段階発がんの機構解析. 第 46 回日本口腔組織培養学会学術総会 2011.11.19 千葉
- ② Yusuke Zushi, Kazuma Noguchi, Michiyo Yamamura, Kazuki Takaoka, Kuniyasu Moridera, Emi Segawa, Shin Okui, Hiromitsu Kishimoto, Masahiro Urade. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV positive and negative human oral squamous cell carcinoma. 20th International Conference Oral Maxillofacial Surgery (ICOMS2011) 2011.11.02 Santiago, CHILE
- ③ 頭司雄介, 野口一馬, 山村倫世, 高岡一樹, 森寺邦康, 瀬川英美, 奥井 森, 岸本裕充, 浦出雅裕, 不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた口腔扁平上皮がんの多段階発がんの機構解析. 第 56 回日本口腔外科学会学術総会 2011.10.21 大阪
- ④ 瀬川英美, 野口一馬, 山村倫世, 高岡一樹, 頭司雄介, 岸本裕充, 橋谷 進, 浦出雅裕 口腔癌細胞における EMT marker としての zyxin の発現 2010.10.16 千葉
- ⑤ 頭司雄介, 齋藤真子, 野口一馬, 吉松有紀, 稲川悠紀, 温川恭至, 江川長靖, 大野真一, 藤田雅俊, 浦出雅裕, 清野透 不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた口腔扁平上皮がんの多段階発がんの機構解析 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.24
- ⑥ Yusuke Zushi, Mako Narisawa-Saito, Yuki Yoshimatsu, Takashi Yugawa, Nagayasu Egawa, Shin-ichi Ohno, Masatoshi Fujita, Kazuma Noguchi, Masahiro Urade and Tohru Kiyono. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV positive and negative human oral squamous cell carcinoma. 26th International Pappillomavirus Conference & Clinical and Public Health Workshops (IPV2010) 2010.7.5 Montreal

6. 研究組織

(1) 研究代表者

頭司 雄介 (ZUSHI YUSUKE)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号:80581206