

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659948

研究課題名(和文)扁平上皮癌におけるMFG-E8の役割 - 癌細胞からの産生とEat-meシグナル

研究課題名(英文)Roles of MFG-E8 on oral squamous cell carcinoma

研究代表者

北村 直也 (KITAMURA, NAOYA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：70351921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：MFG-E8は乳脂肪球の主要な構成分子であるとともに、アポトーシス細胞の貪食を促進する分子であることが知られている。我々は口腔扁平上皮癌の化学放射線治療に対する感受性へのMFG-E8の関与について検討した。その結果、OSC細胞において、線処理によりMFG-E8の発現が誘導されたが、抗癌剤処理の影響は認められなかった。さらに、線照射されたOSC細胞のLAK細胞による被傷害活性は亢進しており、この効果はOSC細胞にMFG-E8-siRNAを導入すると抑制された。これらのことから、MFG-E8はOSC細胞の放射線治療の感受性に寄与する分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The milk fat globule factor-E8 (MFG-E8), a major component of the milk fat globule membrane, is assumed to be involved in various developmental and homeostatic processes in addition to the eat-me signal generation. Here, we investigated MFG-E8 involvement in OSCC cell susceptibility to chemoradioimmunotherapy. Irradiation and not chemotherapeutic drugs induced MFG-E8 secretion from an OSCC cell line. LAK cells caused greater impairment of OSC-6 cells (strongly expressing MFG-E8) than OSC-3 cells (weakly expressing MFG-E8). Furthermore, in OSC-6 cells, LAK cell-mediated cytotoxicity was enhanced on pretreatment with r-rays. In irradiated OSC-6 cells, the enhanced LAK cell-mediated cytotoxicity was suppressed by transfection with MFG-E8 siRNA. The susceptibility of OSC-3 and OSC-6 cells to 5-FU and CDDP remained unaffected on transfection with MFG-E8 siRNA. These results suggest that MFG-E8 increases the OSCC cell susceptibility to LAK cells and acts as a bridging molecule.

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：MFG-E8 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

近年、乳脂肪球の主要な構成分子である Milk Fat Globule Factor-E8 (MFG-E8, Lactadherin) が、マクロファージ、ランゲルハンス細胞や樹状細胞などの食細胞より分泌され、食細胞上のインテグリン (α_3 、 α_5) を介してアポトーシス細胞上に発現するホスファチジルセリンに結合し、食細胞とアポトーシス細胞をリンクさせることでアポトーシス細胞の貪食を促進する作用、すなわち “Eat me” シグナルを活性化する作用を有することが明らかになった。

我々は以前より、機能温存を目指し、口腔扁平上皮癌 (OSC) に対して抗癌剤および放射線治療に活性化自己リンパ球移入療法 (Lymphokine-activated killer cells 療法、LAK 療法) を組み合わせた導入療法を行うことにより良好な結果を得、その有用性を報告してきたが、この免疫療法の臨床効果を解析する中で、化学・放射線・免疫療法に対する反応性が高く腫瘍が完全に消失した症例 (CR 症例) では MFG-E8 の発現が亢進していることを cDNA マイクロアレイ解析により見出し、さらには、OSC 細胞が MFG-E8 を発現していることを株化 OSC 細胞を用いて明らかにした。これらの結果は、口腔扁平上皮癌の化学・放射線・免疫療法に対する感受性において、MFG-E8 が何らかの役割を有している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の MFG-E8 発現の意義について、特に化学・放射線・免疫療法に対する感受性との関連について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) OSC 細胞が実際に MFG-E8 を発現しているかどうかを、口腔扁平上皮癌の生検材料を用いて調べるとともに、MFG-E8 の発現パターンと臨床病理組織学的因子との関連を比較検討する。

(2) 株化 OSC 細胞が MFG-E8 を産生、分泌するか否かを調べるとともに、分泌された MFG-E8 が OSC 細胞の増殖、抗癌剤および放射線に対する感受性にどのような影響を及ぼすかを調べる。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞における MFG-E8 の発現程度が、活性化リンパ球に対する被傷害性とどのように関連しているのかを検討する。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌生検材料ならびに OSC 細胞株における MFG-E8 の発現

MFG-E8 は、口腔扁平上皮癌の生検材料において浸潤する癌細胞において発現が認められた (図 1)。しかしながら、MFG-E8 の発現程度と臨床病理組織学的因子との間に関連は認められなかった。OSC 細胞株では OSC-3、OSC-5、OSC-6 細胞において mRNA および蛋白レ

ベルの両方で MFG-E8 の発現が認められ、30 Gy の放射線照射によりそれらの発現レベルは亢進した (図 2A、2B)。さらに、OSC-6 細胞では、放射線照射後経時的に MFG-E8 の蛋白レベルが上昇した (図 2C)。

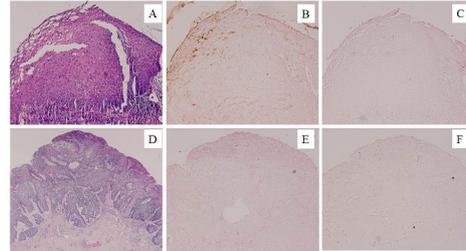


図 1 : OSC における MFG-E8 の発現
A-C, 高分化型 SCC; D-F, 中等度分化型 SCC;
A and D, HE 染色像; B and E, stained with anti-MFG-E8 antibody; C and F, stained with isotype-matched control antibody, Magnification: $\times 20$.

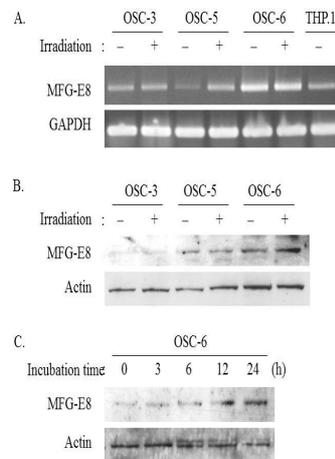


図 2 : OSC 細胞株における MFG-E8 の発現 (A) OSC-3、OSC-5、OSC-6 細胞株における放射線照射の MFG-E8 mRNA 発現への影響 (B) OSC-3、OSC-5、OSC-6 細胞株における放射線照射の MFG-E8 蛋白発現への影響 (C) OSC-6 細胞における放射線照射による MFG-E8 の経時的発現誘導

(2) MFG-E8 の細胞内局在

無処理の OSC-6 細胞では、MFG-E8 は細胞質にスポット状に発現していたが、放射線照射後、MFG-E8 の発現レベルが上昇するとともに、細胞質にびまん性に発現するようになった (図 3A)。さらに、無処理の OSC-3 および OSC-6 細胞の培養上清中に MFG-E8 は検出されなかったが、放射線照射後の OSC-6 細胞の培養

上清中には、MFG-E8 が検出された (図 3B)。

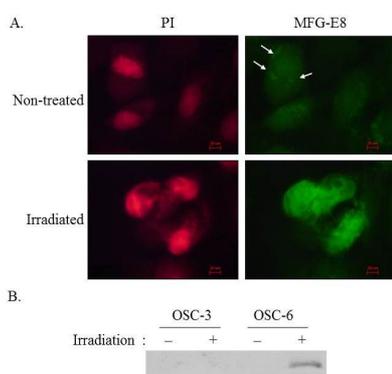


図 3 : MFG-E8 の OSC 細胞内局在と培養上清中の発現 (A) OSC-6 細胞における MFG-E8 の細胞内局在への放射線照射の影響 (B) OSC-3 および OSC-6 細胞の培養上清における MFG-E8 蛋白発現への放射線照射の影響

(3) OSC 細胞の LAK 細胞による被傷害活性に対する MFG-E8 の影響

MFG-E8 が高発現している OSC-6 細胞の LAK 細胞に対する感受性は MFG-E8 低発現の OSC-3 細胞より高かった (図 4A)。さらに、放射線処理を行うことで OSC-6 細胞の LAK 細胞による被傷害活性は増加したが、この効果は OSC-6 細胞に MFG-E8-siRNA を導入することにより阻害された (図 4B)。また、OSC-6 細胞を放射線照射前にホスファチジルセリンに高い親和性を持つリン脂質結合タンパク質であるアネキシン V で前処理すると、放射線照射による LAK 細胞に対する感受性増加が抑制された (図 4C)。

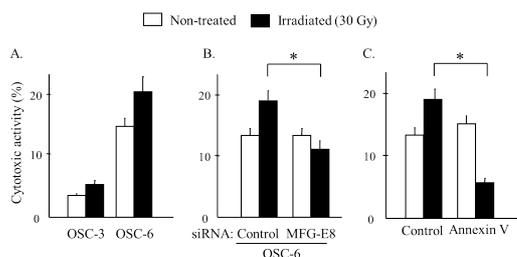


図 4 : OSC 細胞の LAK 細胞による被傷害活性に対する MFG-E8 の影響 (A) OSC-3 および OSC-6 細胞の LAK 細胞による被傷害活性に対する放射線照射の影響 (B) LAK 細胞による被傷害活性に対する MFG-E8 ノックダウンの影響 (C) LAK 細胞による被傷害活性に対するアネキシン V の影響

(4) OSC 細胞の抗癌剤感受性に対する MFG-E8 の影響

OSC-3 および OSC-6 細胞において、5-FU および CDDP 処理による MFG-E8 発現への影響は認められなかった (図 5A)。さらに、OSC-3 および OSC-6 細胞に MFG-E8-siRNA を導入し

ても、抗癌剤に対する感受性は変化しなかった (図 5B)。

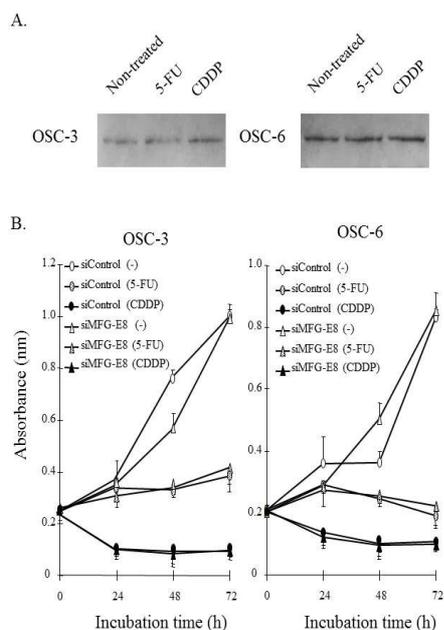


図 5 : OSC 細胞の抗癌剤感受性に対する MFG-E8 の影響 (A) OSC-3 および OSC-6 細胞の 5-FU、CDDP 処理による MFG-E8 発現への影響 (B) 抗癌剤感受性に対する MFG-E8 ノックダウンの影響

5. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 直也 (KITAMURA NAOYA)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号 : 70351921

(2) 研究分担者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号 : 00200824

笹部 衣里 (SASABE ERI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号 : 40363288

吉村 友秀 (YOSHIMURA TOMOHIDE)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号 : 80452697
(H23-H24 : 研究分担者)

李 康弘 (RI YASUHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号 : 70587526
(H23-H24 : 研究分担者)

大野 清二 (OHNO SEIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40624995
(H24-H25.8：研究分担者)