

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792099

研究課題名（和文） 癌細胞によるアポトーシス細胞貪食：分子機構と病理学的意義

研究課題名（英文） Apoptotic cell engulfment by cancer cells

研究代表者

山崎 学 (YAMAZAKI MANABU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10547516

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌(SCC)の病理診断において、癌細胞内にアポトーシス癌細胞が存在する所見にしばしば遭遇するが、本現象の病理学的意義は不明である。そこで、「アポトーシス癌細胞は貪食専門細胞によって処理されるだけでなく、同種間貪食によっても処理される」という仮説をたて、アポトーシス細胞貪食に関与する候補分子として MFG-E8 に注目し、以下の検討を行った。口腔 SCC 手術材料を用いて MFG-E8 の発現様式を検索したところ、アポトーシス癌細胞に MFG-E8 陽性が強調され、その一部は生活癌細胞の細胞質内に存在していた。また、癌細胞における MFG-E8 高発現が腫瘍進展に相関することが示された。口腔 SCC 細胞株を用いた試験管内実験では、SCC 細胞株で MFG-E8 が高発現しており、アポトーシスを誘導した細胞と共培養すると、SCC 細胞はアポトーシス細胞を貪食し、リコンビナント MFG-E8 添加により貪食が増強された。また、siRNA 法によって MFG-E8 発現を抑制すると、アポトーシスの亢進とともに、癌細胞の細胞増殖と浸潤性が低下した。以上の実験結果から、アポトーシスをきたした癌細胞は同種癌細胞によって貪食処理されるが、その貪食には MFG-E8 が関与していることが判明した。さらに、アポトーシス癌細胞を貪食した癌細胞では MFG-E8 の発現が上昇し、その結果、貪食癌細胞の増殖浸潤能が増強されることも確認した。

研究成果の概要（英文）：Apoptotic oral squamous cell carcinoma (SCC) cells are engulfed not only by macrophages but also by neighboring SCC cells, which could be a potential anti-cancer avenue. Since apoptotic SCC cells were immunohistochemically positive for milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 (MFG-E8), one of the phagocytosis regulating molecules, apoptotic SCC cells were suggested to be removed by the MFG-E8-related phagocytotic pathways. In addition, MFG-E8 was simultaneously expressed in SCC cells forming small foci at the invading front, and its expression levels in SCC cells in culture were correlated with cell growth, anti-apoptotic activity and invasion. The results indicated that the apoptotic cell clearance via MFG-E8 produced by cancer cells enhances aggressiveness of cancer cell behaviors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：癌 病理学 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は高い自立性増殖能を有する一方で、頻繁にアポトーシスによる細胞死を起こす。アポトーシスをきたした癌細胞の処理は専らマクロファージや樹状細胞などの食食専門細胞により行われると一般的には考えられている。しかし、癌組織を詳細に検討すれば、癌細胞の細胞質内に好中球など他の細胞成分が存在することが知られており、申請者も日常の病理診断業務を通じて、口腔扁平上皮癌(SCC)細胞がアポトーシスをきたした癌細胞を食食する現象を見出してきた。そこで、なぜ癌細胞は他の細胞成分や同種の死細胞を食食処理できるのか、その分子メカニズムと病理学的意義に興味を抱いたが、この主題に関する研究は国内外を問わず殆ど手つかずの状態であった。そこで、本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は癌細胞の同種間食食、すなわち、生活癌細胞がアポトーシスを起こした癌細胞を食食・処理する現象に関わる分子機構ならびにその病理学的意義を究明することである。申請者は「アポトーシス癌細胞は同種癌細胞によっても処理される」という仮説のもと、その分子機構の候補として、食食専門細胞においてアポトーシス細胞食食関連因子として知られる milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFG-E8)に注目し、以下の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 口腔 SCC における MFG-E8 の免疫組織化学的検索：口腔 SCC 多数症例を対象に、連続パラフィン切片を作製し、アポトーシス細胞食食関連分子 MFG-E8 の発現の有無、発現パターンを調べた。併せて、アポトーシスマーカーである活性化カスパーゼ 3 に対する免疫組織化学や TUNEL 染色を行って、MFG-E8 の発現パターンとアポトーシス細胞の局在を対比して、アポトーシス細胞食食現象との関連を探った。

(2) 細胞株におけるアポトーシス細胞食食関連分子の発現解析：ヒト口腔 SCC より樹立した細胞株(ZK-1, ZK-2, MK-1)、ヒト血球系細胞株(Jurkat, THP-1)を用い、培養細胞株から全 RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法にて MFG-E8 およびその他の候補分子遺伝子発現を定量した。蛋白質発現は蛍光抗体法、ウェスタンブロットにて検討した。

(3) 試験管内アポトーシス細胞食食実験：口腔 SCC 細胞株に、緑色蛍光色素で標識後に紫外線を照射してアポトーシスを誘導した同種細胞株または Jurkat 細胞を添加し、4~24

時間共培養を行った。リン酸緩衝液で十分に洗浄後、4%パラフォルムアルデヒドにて固定し、MFG-E8 やアクチン線維、ライソゾームマーカー-LAMP-1 に対する蛍光抗体染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、上記実験系にリコンビナント MFG-E8 を添加して、アポトーシス細胞食食実験を行って、食食能の変化を調べた。

(4) MFG-E8 が癌細胞機能に及ぼす影響の検討：口腔 SCC 細胞株に MFG-E8 に対する siRNA を導入して蛋白質発現を抑制させた際の細胞動態を細胞増殖試験、スクラッチアッセイ、マトリジェル浸潤試験にて検討した。

4. 研究成果

(1) 口腔 SCC 外科材料における MFG-E8 の発現様式：2009-2010 年に外科的切除が施行された口腔 SCC 一次症例 53 例を対象として、MFG-E8 の発現様式を免疫組織化学的に解析した。その結果、アポトーシス癌細胞において MFG-E8 陽性が強調されており、その一部は生活癌細胞の細胞質内に存在していた(図 1)。アポトーシス癌細胞は活性化カスパーゼ 3 ならびにライソゾームマーカー-LAMP-1 と同様の局在を示し、癌細胞自身が同種死細胞を処理していることが確認された。また、53 例中 44 例(83%)で生活癌細胞にも MFG-E8 陽性が認められたが、とりわけ浸潤先端部の小索状胞巣を形成する癌細胞に MFG-E8 強陽性が見られた。さらに、MFG-E8 発現様式をスコア化し、臨床病理学的因子との相関を解析したところ、MFG-E8 高発現は腫瘍径や病理病期などの腫瘍進展度と有意に相関することが示された。

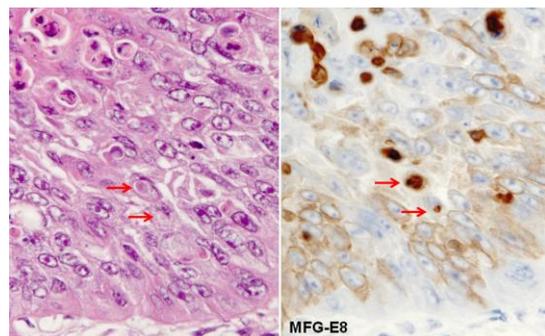


図 1 口腔扁平上皮癌における MFG-E8 発現。アポトーシス癌細胞に MFG-E8 強陽性が見られ、その一部(矢印)は生活癌細胞内に取り込まれていた。

(2) 口腔 SCC 細胞株における MFG-E8 発現解析：口腔 SCC 細胞株を含む各種培養細胞株において、MFG-E8 遺伝子発現を検索したところ、血球系細胞株に比べて、口腔 SCC 細胞株で MFG-E8 が高発現しており、蛍光抗体法および各細胞分画でのウェスタンブロットの結果、MFG-E8 は細胞質内のみならず、細胞膜表面にも局在することが確認された。また、

口腔 SCC 細胞株において MFG-E8 の受容体分子であるインテグリン $\alpha v\beta 3$ の発現も確認された。

(3) 試験管内アポトーシス細胞貪食実験：口腔 SCC 細胞とアポトーシスを誘導した同種細胞または Jurkat 細胞を共培養した結果、一部の癌細胞はアポトーシス細胞を積極的に取り込んでいた(図 2)。アポトーシス細胞は LAMP-1 陽性のファゴゾーム内に存在し、その周囲に MFG-E8 の濃縮がみられた。さらに、予めアポトーシス細胞にリコンビナント MFG-E8 を加え、インキュベートした細胞を用意し、これを口腔 SCC 細胞と共培養すると、リコンビナント MFG-E8 処理を行っていない場合に比べて、有意に貪食細胞の増加が認められた。以上の検討より、MFG-E8 が癌細胞による同種死細胞の貪食に関与する可能性が示された。

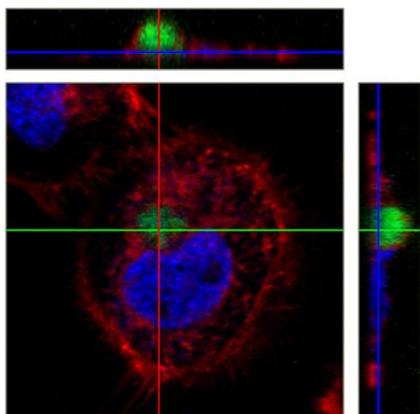


図 2 口腔扁平上皮癌由来培養細胞に取り込まれたアポトーシス細胞。緑：アポトーシス細胞 赤：アクチン線維 青：核

(4) MFG-E8 が癌細胞機能に及ぼす影響の検討：(1)項の組織レベルの解析結果から、MFG-E8 発現癌細胞の役割が必ずしも同種死細胞貪食に限定したものではないことが明らかになってきたので、「SCC における同種間アポトーシス癌細胞貪食は細胞機能を活性化する」という第二の仮説を立てて試験管内実験に着手した。siRNA 導入により MFG-E8 発現を抑制すると、アポトーシス細胞死の亢進とともに、細胞増殖能が有意に低下した。また、細胞遊走能に明らかな変化は見られなかったものの、浸潤能は低下した。

(5) 実験結果の評価と研究の総括：これまでの実験結果より以下のように結論した。

- ① アポトーシスをきたした口腔 SCC 細胞は同種癌細胞によって貪食処理され、その貪食に MFG-E8 が関与している。
- ② MFG-E8 発現が上昇した貪食癌細胞は癌細胞としての機能が亢進して、細胞増殖能ならびに浸潤能が増強する可能性がある。

今後、口腔癌での同種間死細胞貪食における MFG-E8 の役割をより詳細に検討することで、本現象が癌の増殖進展に及ぼす影響を解明し、新規抗癌治療の開発を念頭においたトランスレーショナルな基礎研究を展開したい。

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 13 件)

- (1) Al-Eryani K, Cheng J, Abé T, Yamazaki M, Maruyama S, Tsuneki M, Essa A, Babkair H, Saku T. Hemophagocytosis-mediated keratinization in oral carcinoma in-situ and squamous cell carcinoma: a possible histopathogenesis of keratin pearls. *J Cell Physiol*. 査読有, in press, 2013. DOI: 10.1002/jcp.24364.
- (2) Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Essa A, Abé T, Babkair H, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 434(1):12-130, 2013. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.057.
- (3) Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Essa A, Abé T, Babkair HA, Ahsan MS, Cheng J, Saku T. Podoplanin is a novel myoepithelial cell marker in pleomorphic adenoma and other salivary gland tumors with myoepithelial differentiation. *Virchows Arch*. 査読有, 462(3):297-305. 2013. DOI: 10.1007/s00428-012-1359-z.
- (4) Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Abé T, Adeola H, Cheng J, Nishiyama H, Hayashi T, Kobayashi T, Takagi R, Funayama A, Saito C, Saku T. Inflammatory histopathogenesis of nasopalatine duct cyst: a clinicopathological study of 41 cases. *Oral Dis*. 査読有, 19(4):415-424. 2013. DOI: 10.1111/odi.12022.
- (5) Metwaly H, Maruyama S, Yamazaki M, Tsuneki M, Abé T, Jen KY, Cheng J, Saku T. Parenchymal-stromal switching for extracellular matrix production on invasion of oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 査読有, 43(11):1973-1981. 2012. DOI: 10.1016/j.humpath.2012.02.006.
- (6) Fujii S, Uryu H, Akashi K, Suzuki K, Yamazaki M, Tahara M, Hayashi R, Ochiai A. Clinical significance of KRAS gene mutation

- and epidermal growth factor receptor expression in Japanese patients with squamous cell carcinoma of the larynx, oropharynx and hypopharynx. *Int J Clin Oncol*. 査読有, オンライン誌, 2012. DOI: 10.1007/s10147-012-0402-z.
- (7) Funayama A, Maruyama S, Yamazaki M, Al-Eryani K, Shingaki S, Saito C, Cheng J, Saku T. Intraepithelially entrapped blood vessels in oral carcinoma in-situ. *Virchows Arch*. 査読有, 450:473-480, 2012. DOI: 10.1007/s00428-012-1224-0.
- (8) Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Podoplanin expression profiles characteristic of odontogenic tumor-specific tissue architectures. *Pathol Res Pract*. 査読有, 208:140-146, 2012. DOI: 10.1016/j.prp.2011.12.016.
- (9) Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Kobayashi T, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Loss of keratin 13 in oral carcinoma in situ: a comparative study of protein and gene expression levels using paraffin sections. *Mod Pathol*. 査読有, 25:784-794, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03732.x.
- (10) Funayama A, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Kobayashi T, Syafriadi M, Kundu S, Shingaki S, Saito C, Saku T. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinoma in situ and squamous cell carcinomas. *Pathobiology*, 査読有, 78:171-180, 2011. DOI: 10.1159/000324926.
- (11) Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, Adeola HA, Wu L, Shingaki S, Saito C, Saku T. Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol*. 査読有, 47:497-503, 2011. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.03.015.
- (12) Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M, Takagi R, Saku T. Nuclear translocation of β -catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology*, 査読有, 59:283-291, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03929.x.
- (13) Ahsan MS, Yamazaki M, Maruyama S, Kobayashi T, Ida-Yonemochi H, Hasegawa M, Henry Ademola A, Cheng J, Saku T. Differential expression of perlecan receptors, α -dystroglycan and integrin β 1, before and after invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 査読有, 40:552-559, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2010.00990.x.
- [学会発表] (計 4 件)
- ① 山崎 学: 口腔扁平上皮癌における同種間アポトーシス細胞処理機構とその意義. 第 23 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 東京都, 2012 年 8 月 29-31 日, 第 23 回日本臨床口腔病理学会プログラム抄録集, 48-49, 2012.
- ② 山崎 学, 丸山 智, 程 琺, 朔 敬: MFG-E8 promotes apoptotic cell clearance by cancer cells and cancer progression in oral squamous cell carcinoma. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋市, 2011 年 10 月 3-5 日, 第 70 回日本癌学会プログラム抄録集: 281-282, 2011.
- ③ 山崎 学, 丸山 智, 程 琺, 藤田 一, 高木律男, 林 孝文, 朔 敬: 下顎腫瘍. 第 22 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会・第 5 回アジア口腔病理学会, 福岡市, 2011 年 8 月 23-25 日, 第 22 回日本臨床口腔病理学会・第 5 回アジア口腔病理学会プログラム抄録集: 43, 2011.
- ④ 山崎 学, 丸山 智, 程 琺, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌における MFG-E8 の発現: 腫瘍進展とアポトーシス細胞処理への関与. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜市, 2011 年 4 月 28-30 日, 日本病理学会会誌 100(1):329, 2011.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
山崎 学 (YAMAZAKI MANABU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 10547516
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし