

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593066

研究課題名(和文) プロテオーム解析に基づいた新規3次元培養モデルによる口腔癌浸潤能の検討

研究課題名(英文) New 3-dimensional culture model of early invasion of oral cancer based on proteome analysis.

研究代表者

小宮山 一雄 (KOMIYAMA, Kazuo)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00120452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の浸潤メカニズムを明らかにする為、正常細胞から癌化の各過程について、発現タンパクを網羅的に解析し、癌の浸潤に関連する因子として、コラーゲナーゼ、細胞骨格関連タンパクおよび細胞増殖因子を検出した。癌浸潤初期の様子を、ヒト口腔癌細胞株筋腫の板状ディスクの上にヒト口腔癌細胞株を播種する3D癌浸潤モデルを新たに作製し、3次元的な観察を行った。さらに、口腔癌(CA9)のタンパク分解酵素インヒビター(SLPI)遺伝子を欠損させた変異株(NUSD-1)を作製、初期浸潤能を検討し、癌浸潤の関連因子としてコラーゲナーゼ(MMP2、MMP9)およびインヒビターを検証し、癌浸潤制御の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The study plan is to clarify the mechanism of growth and invasion of oral cancer. Proteome analysis was performed for a human normal mucosal epithelium, epithelial dysplasia, CIS and invasive cancer, were excised epithelium from each tissue. The factor expressing in a progression to the cancer, were keratin, HSP, Lamin A / C, desmoplakin, and plectin-1, was it's elevated in a protein level. Then in order to verify the change of the cells with the progression to invasive cancer, we have developed 3D cancer invasion model that using oral SCC lines and human myoma tissue. In addition, we also develop the SLPI gene knock down Ca9 cell lines, named NUSD-1, which revealed invasiveness to the myoma. Immunohistochemistry and gene expression analysis demonstrated a infiltration kinetics by 3-dimensional culture. As a result, responsive factors involve in cancer invasion of this model, which are MMP2, MMP9 and TIMP. These expression patterns of factors, revealed to control a tumor invasion.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔癌 初期浸潤 proteome 3D culture SLPI NUSD-1 MMP TIMP

### 1. 研究開始当初の背景

消化器官の入り口である口腔癌を発症するヒトの数、および口腔癌が制御不能となり死亡するヒトの数は増加の一步をたどっている。喫煙は最大のリスクファクターであるが、喫煙者は減少傾向にあるものの、発症を現象させる予防の徹底を図ることは社会的にも困難な状況にある。口腔は食物摂取だけでなく構音、顔貌にも多大な影響を及ぼす臓器である。また口腔は直視直達可能な臓器であるにも関わらず、初期癌をとらえることは難しい。このような状況で、口腔癌の初期浸潤メカニズムの解明と予防の理解を深めることは、社会的にも意義があると考えられる。

### 2. 研究の目的

口腔癌における浸潤・転移のメカニズムとその制御は、患者の予後を改善する為の重要課題である。癌細胞の増殖は、細胞間相互・細胞外基質との接着性低下、細胞外基質の分解および細胞運動の増加により達成される。我々は先行研究として行った、正常粘膜上皮、前癌病変、浸潤癌のプロテオーム解析から候補分子を絞り込み、新たに開発した3次元癌浸潤モデルを用いて、口腔癌の初期浸潤を解析することを目的とした。

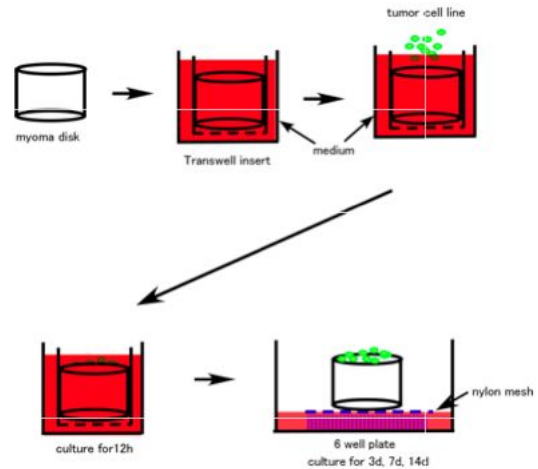
### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔癌3次元培養モデルの作製；

癌の浸潤初期を3次元的に観察する為に、手術により切除されたヒト子宮筋腫組織はで悪性化の所見がみられないものを用いた。筋腫組織は、生検パンチ(KAI)で直径8mmのディスクを作製した。筋腫ディスクは10%DMSO加RPMI-1640培地に浸漬し、検索に使用するまで-70℃で凍結保存した。口腔癌細胞(Ca9-22, HSC-3)の培養は、はじめに筋腫ディスクを37℃の温浴で解凍した後、10%FCS加RPMI-1640培地で1時間、室温で洗浄した。次いで、筋腫ディスクをトランスウェルインサート(Corning)に入れ、トリプシンで遊離した培養細胞を10%FCS加RPMI-1640培地で $7 \times 10^5$ 個/mlに調整し、その50 $\mu$ l (3.5 $\times 10^4$ 個)を筋腫ディスク上に滴下した。筋腫ディスクに細胞を付着させるため、一晩CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。次いで筋腫ディスクを取り出し、12ウェルプレート内に置いたステンレス製グリッド上に乗せた、無コーティングのナイロンメッシュ上へ移した。プレート内は筋腫ディスクの基部が浸るまで培地を入れ、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。培養の間、培地は3日ごとに交換した。

癌細胞が増殖し、下層の筋腫組織へ初期浸潤する様子を経時的に、組織学的および免疫組織学的に観察した。このモデルは、従来のコラーゲンゲルの上に癌細胞を播種する方法に比べて、筋腫が線維芽細胞や筋線維芽細胞を含むことから、ヒトの癌浸潤過程により

近いモデルである。

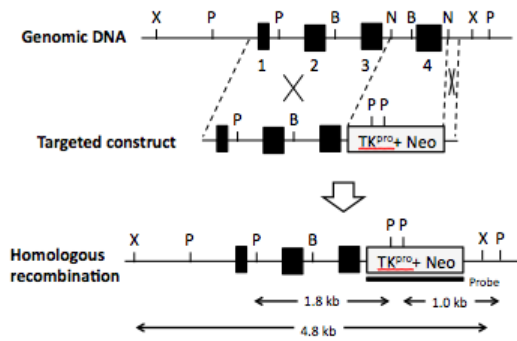


第1図. 口腔癌3次元培養モデル

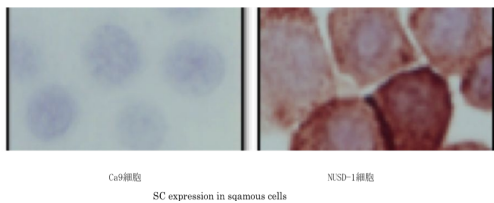
(2) 癌の浸潤に關与する接着因子、コラーゲナーゼ、サイトカインなどを制御するセリクタンパク分解酵素インヒビターの遺伝子を一部欠損させた口腔癌細胞の変異株を作製して、筋腫への浸潤の様子を比較検討した。培養2, 7, 14日目ごとに筋腫ディスクをプレートから取り出し、10%中性緩衝ホルマリンにて一晩固定し、パラフィンに包埋した。連続切片を5 $\mu$ mの厚さで薄切して組織学的検索に供した。組織学的検索にはHE染色を施し、免疫組織化学的検索には抗cytokeratin AE1/AE3(DAKO)、抗vimentin(ニチレイバイオサイエンス)、抗MMP-2(Abcam)、抗MMP-13(Abcam)の各種一次抗体を用いた。切片を脱パラフィン後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加メタノールで30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。続いて、切片をクエン酸バッファー中で98℃または121℃で20分間加熱し、その後室温まで徐冷して抗原を賦活化した。次に、切片は10%正常ブタ血清/PBSで30分間反応させて、非特異的反応をブロックした。一次抗体を切片に乗せ、湿箱中にて、室温で60分間あるいは4℃で一晩反応させた。二次抗体はEnVision(DAKO)を用い、室温で60分間反応した。各ステップ間は、切片をPBSで10分間 $\times 3$ 回洗浄した。発色はジアミノベンジジン(DAB)を用いておこなった。発色後、核染色をおこないマリノールにて封入した。

#### (3) 口腔癌変異細胞株 NUSD-1 細胞

口腔癌細胞株 Ca9 の Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) を homologous recombination により欠如させた変異株 NUSD-1 を作製した。(図1)



第2図. NUSD-1 細胞の作製



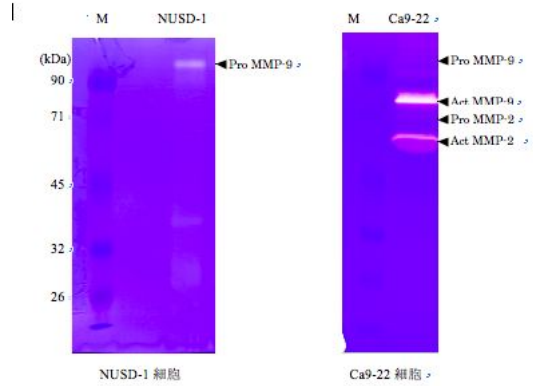
第3図. NUSD-1 細胞における SC 発現

#### (4) Gelatin zymography 法

Ca9-22 細胞および NUSD-1 細胞を confluent になるまで培養し、PBS で十分洗浄した後、FCS を含まない RPMI-1640 培地または TGF, SLPI を含む RPMI-1640 培地で一晩培養をおこなった。培養後に上清を 4000rpm で 5 分間遠心した。

得られた培養上清は loading buffer (0.125M Tris HCl buffer pH6.8, 4% SDS, 10% sucrose, 0.01% BPB) と同量混合して 10% acrylamide gel (10% acrylamide, 0.4% glycine, 1.0% gelatin, 0.07% SDS, 0.375M Tris HCl buffer pH 8.8) を用いて電気泳動をおこなった。

泳動後、ゲルを洗浄液 (50mM Tris HCl buffer pH 7.4, 2.5% Triton X-100, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM ZnCl<sub>2</sub>) で 1 時間洗浄して SDS を除去した。再びゲルを蒸留水で洗浄した後、反応溶液 (50mM Tris HCl buffer pH 7.4, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM ZnCl<sub>2</sub>) と 37 °C で一晩反応させた。反応後、ゲルを 0.5% Coomassie Brilliant Blue G250 で染色後に脱色をおこない写真撮影した。



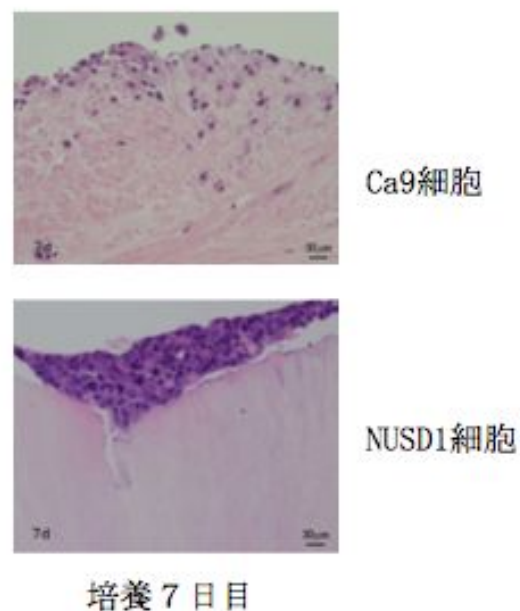
第4図. Gelatin zymography による MMP2 発現

(5) 口腔癌細胞株と口腔癌変異株で発現している遺伝子の網羅的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株 Ca9 および HSC 3 は、培養後 1 週間で、下在の子宮筋腫組織内に浸潤を認め、免疫染色で浸潤癌細胞が間葉マーカーであるビメンチン陽性を示し、浸潤に上皮-間葉転換が予測された。このメカニズムについて解析を続けている。

(2) ヒト口腔癌細胞のセリンプロテアーゼインヒビターを欠損させた変異株 NUSD-1 を作製した。同細胞は、通常の扁平上皮には発現が見られず、腺細胞に特有なイムノグロブリン A のレセプターを発現する様になった。この変異株の浸潤能を検索したところ、浸潤能が欠落していた。



第5図. 筋腫デスクへの口腔癌浸潤と抑制

さらに培地にセリンプロテアーゼインヒビターを加えると、再び浸潤をするようになった。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9 と変異株 NUSD-1 の発現遺伝子の網羅的な解析を行ったところ、約 20,000 遺伝子に発現の変動が認められた。NUSD-1 は Ca9 と比べて、ベータカテニン、プレクチン、デスモプラキンなど接着因子関連タンパクの強発現とケラチンタンパクの発現パターンの変化を認めた。このことは、癌細胞浸潤に際して、細胞質内でケラチンタンパクの重合が変化していることを明らかにし、この変化が診断に応用できることを裏付けるデータと考えられた。(投稿中)

#### 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)

Yamamura T, Matsumoto N, Matsue Y, Okudera M, Nishikawa Y, Abiko Y, Komiyama K (2014) Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, regulates Lymphangiogenic factors in oral cancer cell line HSC-3. Anticancer Res. 34, 1701-1708. (査読有り)

Kiuchi M, Yamamura T, Okudera M, Souksavanh V, Ishigami T, Iwase T, Warnakulasuriya S, Komiyama K (2014) An assessment of mast cells and myofibroblasts in denture-induced fibrous hyperplasia. J Oral Pathol Med 43, 53-60. (査読有り)

[学会発表](計 4 件)

野本翔太, 野口博康, 岩瀬孝志, 田中孝佳, 外木守雄, 小宮山一雄, 大木秀郎. 新規口腔癌浸潤モデルと TGF- $\beta$  の関与. 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2014 年 5 月 8 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

岩瀬孝志, 尾曲大輔, 小宮山一雄. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) による Polymeric immunoglobulin receptor 発現調節. 第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2013 年 9 月 27 日, 航空会館(東京都港区)

岩瀬孝志, 小宮山一雄, 山村崇之, 西川洋一, 尾曲大輔. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) による Polymeric immunoglobulin receptor 発現調節. 第 24 回日本臨床口腔病理学会, 2013 年 8 月 29 日, 日本大学理工学部 CST ホール(東京都千代田区)

岩瀬孝志, 松本直行, 木内美佐, 野本翔太, 野口博康, Vongsa Souksavanh, 浅野

正岳, 小宮山一雄. 根尖病巣の治癒過程における筋線維芽細胞の動態. 第 23 回日本臨床口腔病理学会, 2012 年 8 月 31 日, 東京医科歯科大学 M&D タワー-鈴木章夫記念講堂(東京都文京区)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小宮山 一雄 (KOMIYAMA, Kazuo)  
日本大学・歯学部・病理学講座・教授  
研究者番号: 00120452

##### (2) 研究分担者

松本 直行 (MATSUMOTO, Naoyuki)  
日本大学・歯学部・助教  
研究者番号: 20386080

##### (3) 研究協力者

岩瀬 孝志 (Iwase, Takashi)

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)

大木 秀郎 (OOKI, Hidero)

尾曲 大輔 (OMAGARI, Daisuke)