

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861740

研究課題名(和文) アポトーシス死細胞貪食による口腔扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤の分子機構

研究課題名(英文) Upregulation of cancer cell functions by apoptotic cell engulfment

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(SCC)において、アポトーシスをきたした癌細胞はマクロファージのみならず生活癌細胞によっても貪食処理されているが、同種間死細胞貪食の病理学的意義は不明である。これまでの研究成果をもとに、「MFG-E8を介した癌細胞によるアポトーシス細胞貪食は癌細胞機能を活性化する」という仮説を設定し、MFG-E8低発現性の口腔SCC培養細胞にMFG-E8を過剰発現させて細胞機能を評価した。MFG-E8高発現により、アポトーシス細胞貪食が増加し、遊走浸潤能が亢進した。したがって、同種間死細胞貪食にMFG-E8が関与し、さらにMFG-E8を介する貪食が癌細胞機能を活性化する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Apoptotic oral squamous cell carcinoma (SCC) cells are engulfed by macrophages or even by neighboring SCC cells. We hypothesized that engulfment of apoptotic carcinoma cells by living carcinoma cells are promoted via MFG-E8, one of phagocytosis regulating molecules, and this phenomenon could contribute to tumor progression. Transient MFG-E8 overexpression in SCC cell lines increased migration, invasiveness, and engulfment of apoptotic cells. Thus we have demonstrated that MFG-E8 is involved in the clearance of apoptotic carcinoma cells by living carcinoma cells, and it might promote tumor progression in oral SCC.

研究分野：医歯薬学(歯学・形態系基礎歯科学)

キーワード：口腔癌 病理学 アポトーシス 貪食

1. 研究開始当初の背景

病理診断学において、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現象は古くから知られており、「エンペリポレーシス」や「カニバリズム」などとも呼ばれている。研究代表者も日常の病理診断業務を通じ、口腔扁平上皮癌(SCC)細胞が赤血球やアポトーシスに陥った癌細胞を貪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死細胞を貪食処理するのか、その分子メカニズムと病理学的意義に興味を抱いたが、本主題に関する研究は国内外を問わず、ほとんど手つかずの状態であった。

研究代表者は科学研究費(若手 B・平成 23~24 年)の支援のもと、口腔 SCC 外科材料における免疫組織化学的検討ならびに培養細胞を用いた試験管内アポトーシス細胞貪食実験を行い、癌細胞の同種死細胞貪食に関わる分子機構の一候補として、milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII (MFG-E8)を特定してきたが、これを検証し発展すべく、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死細胞貪食、すなわち、生活癌細胞がアポトーシス細胞死をきたした癌細胞を貪食・処理する現象に関わる分子機構とその病理学的意義を究明することである。研究代表者は「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」という仮説を設定し、主として口腔 SCC 由来培養細胞を用いた試験管内実験で、MFG-E8 が同種死細胞貪食を促進し、アポトーシス細胞貪食による癌細胞の増殖性および浸潤性への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 口腔 SCC 由来培養細胞における MFG-E8 発現レベルの検討：通常条件下で維持・培養した口腔 SCC 由来培養細胞 9 種を対象に、MFG-E8 mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR で解析した。

(2) MFG-E8 過剰発現細胞の調製：MFG-E8 を高発現する ZK-1 の cDNA ライブラリーより MFG-E8 バリエーション 1, 2(それぞれ v1, v2)の cDNA 全長配列を増幅し、発現ベクター pcDNA3.1/CT-GFP TOPO にライゲーションした。DNA シークエンシングにより配列を確認したのち、MFG-E8 低発現性培養細胞にリポフェクション法で一過性導入を行った。導入後、MFG-E8-GFP 融合蛋白質の遺伝子・蛋白質発現レベルを継時的に検討した。

(3) 試験管内アポトーシス細胞貪食実験：口腔 SCC 細胞に、赤色蛍光色素で標識後に紫外線照射によりアポトーシスを誘導した同種細胞または Jurkat 細胞を添加し、24 時間共培

養を行った。リン酸緩衝液で十分に洗浄後、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、アポトーシス細胞貪食と MFG-E8-GFP 融合蛋白質の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。貪食細胞率はフローサイトメータにて定量した。

(4) MFG-E8 が癌細胞機能に及ぼす影響の検討：MFG-E8 過剰発現細胞の細胞動態を細胞増殖試験、トランスウェル遊走試験、マトリジェル浸潤試験にて検討した。

(5) 口腔 SCC におけるアポトーシス細胞貪食関連因子 MERTK・GAS6 の発現解析：MFG-E8 以外のアポトーシス細胞貪食関連分子を検索する目的で、受容体型チロシンキナーゼ MERTK とオプソニン分子 GAS6 の発現を口腔 SCC 外科材料および口腔 SCC 培養細胞を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 口腔 SCC 細胞における MFG-E8 発現：9 種の口腔 SCC 細胞(ZK-1, ZK-2, MK-1, Ca9-22, SAS, HSC-2, HSC-3, HSC-4, HO-1-u-1)とヒト末梢血由来マクロファージ、急性単球性白血病由来細胞 THP-1 の MFG-E8 mRNA 発現レベルを RT-PCR にて定量した結果、マクロファージや THP-1 に比べて、いずれの口腔 SCC 培養細胞においても高い遺伝子発現レベルが確認された。

(2) 口腔 SCC 細胞での MFG-E8 過剰発現：9 種のうち、MFG-E8 mRNA 発現レベルが低かった 3 種(ZK-2, SAS, HSC-4)に MFG-E8 v1-GFP, MFG-E8 v2-GFP, GFP (対照)の各発現ベクターをトランスフェクションした。薬剤選択法による安定発現細胞の樹立を試みるたが困難であったため、一過性発現細胞を以下の実験に供した。遺伝子導入効率がもっとも高い細胞種は SAS で、約 50%であった。両バリエーションとも MFG-E8-GFP 融合蛋白質は MFG-E8 と同様、細胞質内に局在していた。また、蛋白質発現はウェスタンブロット法にて確認できた。

(3) MFG-E8 過剰発現細胞でのアポトーシス細胞貪食：試験管内アポトーシス細胞貪食実験の結果、v1, v2 いずれの MFG-E8 過剰発現細胞においても、アポトーシス細胞貪食の亢進が認められ、貪食されたアポトーシス細胞の周囲に MFG-E8-GFP 融合蛋白質が濃縮していた(図 1)。

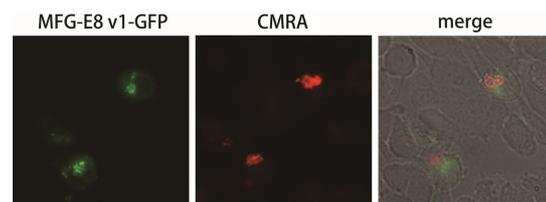


図 1 MFG-8 過剰発現細胞に貪食されたアポトーシス細胞
緑：MFG-E8 v1-GFP 赤：アポトーシス細胞

(4) MFG-E8 過剰発現が癌細胞機能に及ぼす影響：上記細胞に遺伝子導入を行い、MTS 法による細胞増殖試験を行ったが、v1, v2 とともに対照に比べ増殖性に明らかな変化はなかった。一方、トランスウェル遊走試験とマトリジェル浸潤試験の結果、v1, v2 とともに遊走・浸潤細胞の有意な増加が確認された(図 2)。

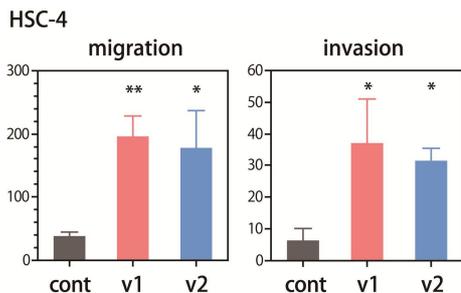


図 2 MFG-E8 過剰発現により、遊走・浸潤能が有意に亢進した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(5) 口腔 SCC での MERTK・GAS6 発現：口腔 SCC の外科材料において、免疫組織化学的に MERTK および GAS6 の発現を検索したところ、多くの症例で癌細胞に MERTK・GAS6 陽性が確認された。また、口腔 SCC 培養細胞では MERTK に加え、リン酸化 MERTK の陽性が認められた。

(6) 実験結果の評価と研究の総括：これまでの結果から以下のように結論した。

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、その貪食には MFG-E8 が関与している。

MFG-E8 発現を上昇させた癌細胞では遊走能・浸潤能が亢進したが、その機序の一部としてアポトーシス細胞貪食が考えられた。

MFG-E8 に加え、MERTK および GAS6 も口腔 SCC での同種間アポトーシス細胞貪食に関わる可能性が示された。

本研究により、口腔癌での同種間死細胞貪食の分子機序の一つが明らかとなった。今後、MFG-E8 以外の貪食促進因子を探索するとともに、本現象が癌の増殖進展に及ぼす影響を解明することで、新規抗癌治療の開発を念頭においた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 11 件)

Heshiki W, Tomihara K, Yamazaki M, Arai T, Nakamori K, Noguchi M. Constitutive Activation of Caspase-3 in Non-Apoptotic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *J Cancer Sci Ther*. 査読有, 7(2), 2015. DOI: 10.4172/1948-5956.1000328

Mikami T, Maruyama S, Abé T, Kobayashi T, Yamazaki M, Funayama A, Shingaki S, Kabayashi T, Cheng J, Saku T. Keratin 17 is co-expressed with 14-3-3 sigma in oral carcinoma in situ and squamous cell carcinoma and modulates cell proliferation and size but not cell migration. *Virchows Arch*. 査読有, 466(5):559-69, 2015. DOI: 10.1007/s00428-015-1735-6

Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Essa A, Babkair H, Cheng J, Saku T. MFG-E8 expression for progression of oral squamous cell carcinoma and for self-clearance of apoptotic cells. *Lab Invest*. 査読有, 94(11):1260-72, 2014. DOI: 10.1038/labinvest.2014.108

Maruyama S, Shimazu Y, Kudo T, Sato K, Yamazaki M, Abé T, Babkair H, Cheng J, Aoba T, Saku T. Three-dimensional visualization of perlecan-rich neoplastic stroma induced concurrently with the invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 査読有, 43(8):627-636, 2014. DOI: 10.1111/jop.12184

Maruyama S, Itagaki M, Ida-Yonemochi H, Kubota T, Yamazaki M, Abé T, Yoshie H, Cheng J, Saku T. Perlecan-enriched intercellular space of junctional epithelium provides primary infrastructure for leukocyte migration through squamous epithelial cells. *Histochem Cell Biol*. 査読有, 142(3):297-305, 2014. DOI: 10.1007/s00418-014-1198-x

Essa AA, Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Babkair H, Cheng J, Saku T. Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: reciprocal roles of neutrophils and macrophages. *J Oral Pathol Med*. 査読有, 43(10):778-784, 2014. DOI: 10.1111/jop.12197

Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Essa A, Babkair H, Mikami T, Shingaki S, Kobayashi T, Hayashi T, Cheng J, Saku T. Intramuscular keratocyst as a soft tissue counterpart of keratocystic odontogenic tumor: differential diagnosis by immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 査読有, 45(1):110-118, 2014. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.08.011

Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Babkair H, Fujita H, Takagi R, Koyama J, Hayashi T, Cheng J, Saku T. Hybrid ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor: report of a case and review of hybrid variations in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*

Oral Radiol. 査読有, 118(1):e12-18, 2014.
DOI: 10.1016/j.o000.2013.08.032

Sohda M, Misumi Y, Tashiro K, Yamazaki M, Saku T, Oda K. Identification of a soluble isoform of human IL-17RA generated by alternative splicing. *Cytokine*. 査読有, 64(3):642-645, 2013.
DOI: 10.1016/j.cyto.2013.09.012

Tsuneki M, Yamazaki M, Maruyama S, Cheng J, Saku T. Podoplanin-mediated cell adhesion through extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest*. 査読有, 93(8):921-932, 2013.
DOI: 10.1038/labinvest.2013.86

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

〔学会発表〕(計4件)

Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Nishikawa A, Takagi R, Nishiyama H, Hayashi T, Cheng J, Saku T: Osteolytic lesion of the maxilla. 第25回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, メディアシップ日報ホール(新潟市), 2014年8月27-29日, 第25回日本臨床口腔病理学会プログラム抄録集, 48, 2014.

山崎 学, 程 クン, 丸山 智, 阿部達也, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌細胞におけるMFG-E8発現の意義: 過剰発現細胞系による解析. 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場(広島市), 2014年4月24-26日, 第103回日本病理学会会誌, 103(1):296, 2014.

山崎 学, 程 クン, 丸山 智, 阿部達也, 池田順行, 永田昌毅, 高木律男, 西山秀昌, 林 孝文, 朔 敬: 口腔底腫瘍. 第24回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 日本大学理工学部1号館 CST ホール(東京都), 2013年8月28-30日, 第24回日本臨床口腔病理学会プログラム抄録集, 72, 2013.

山崎 学, 程 クン, 丸山 智, 阿部達也, 朔 敬: MFG-E8は口腔扁平上皮癌の進展と死細胞貪食を促進する. 第102回日本病理学会総会, ロイトン札幌(札幌市), 2013年6月6-8日. 日本病理学会会誌, 102(1):360, 2013.

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

6. 研究組織
(1) 研究代表者