

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861706

研究課題名(和文) 口腔粘膜で癌特性を司るケラチン17：mTORシグナル経路を介した発癌機構の解析

研究課題名(英文) Keratin 17 controls cancer characteristics in oral mucosa: Analysis of the mechanisms of oncogenesis through the mTOR signaling

研究代表者

三上 俊彦 (MIKAMI, Toshihiko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90595745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新潟大学医歯学総合病院口腔外科において切除をおこない、シーケンス癌の所見が認められた症例を抽出し、連続切片を作製し、抗K17抗体、抗14-3-3 sigma抗体、抗mTORシグナル経路関連タンパク抗体群(抗Akt抗体、抗phospho-Akt抗体、抗S6K1抗体、抗phospho-S6K1抗体、抗4E-BP1抗体、抗phospho-4E-BP1抗体)を用いて免疫組織化学をおこない、その発現率を各病変ごとに集計して発現パターンを比較検討した。K17と14-3-3 sigmaが癌で同調した発現していたものの、mTORシグナル経路の活性化を免疫組織学的に認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We determined immunohistochemical profiles of 14-3-3 sigma, Keratin(K) 17 and mTOR pathway markers in tissue specimens of oral borderline malignancies and SCC. We selected from the surgical pathology files of Niigata University Hospital surgical specimens of oral mucosa, which had been removed due to SCC or CIS, and simultaneously contained in addition to areas of SCC/CIS areas of epithelial dysplasia and/or normal epithelium. All the specimens were routinely fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Serial 3- μ m sections were cut from paraffin blocks. One set of the sections was stained with hematoxylin and eosin (HE) and was used for reevaluation of histological diagnosis, and the other sets were used for immunohistochemistry (K17, 14-3-3 sigma, Akt, phospho-Akt, S6K1, phospho-S6K1, 4E-BP1, phospho-4E-BP1). As a result, although 14-3-3 sigma and K17 were co-expressed in oral SCC and CIS tissues, activation of the mTOR signaling pathway was not recognized immunohistologically.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔扁平上皮癌 上皮内癌 keratin 17 14-3-3 sigma mTOR

1. 研究開始当初の背景

口腔癌ではケラチン 17 (K17) が特異的に発現しており、14-3-3sigma を介して mTOR シグナル経路を活性化することが明らかになりつつある。申請者は口腔癌細胞株の K17 をノックダウンさせることで細胞増殖能と細胞成長能が低下することを確認しているが、mTOR シグナル経路を直接的に確認するまでは至っていない。

2. 研究の目的

本研究は口腔癌における K17 と mTOR シグナル経路の相互作用を実証することで K17 の口腔癌における未知の機能を解明する。本研究の成果は、siRNA 治療などの新たな口腔癌治療法開発の基礎を構築することを最終的な目的としている。

3. 研究の方法

(1) 外科切除組織標本における K17 と mTOR シグナル経路関連タンパクの発現パターンの認識

新潟大学医歯学総合病院口腔外科において切除をおこない、同病院歯科病理検査室でシークエンス癌の所見が認められた症例を抽出する。外科切除材料のパラフィンブロックから連続切片を作製し、抗 K17 抗体、抗 14-3-3sigma 抗体、抗 mTOR シグナル経路関連タンパク抗体群 (抗 Akt 抗体、抗 phospho-S473 Akt 抗体、phospho-T308 Akt 抗体、抗 S6K1 抗体、抗 phospho-T389 S6K1 抗体、抗 4E-BP1 抗体、抗 phospho-T37/46 4E-BP1 抗体) を用いて免疫組織化学をおこない、その発現率を正常上皮、異型上皮、上皮内癌および浸潤癌ごとに集計するとともに相互の発現パターンを比較検討する。

(2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における K17 と mTOR

シグナル経路関連タンパクの発現パターンの認識細胞実験にはヒト口腔扁平上皮癌細

胞株 ZK1 をもちいる。抗 K17 抗体、抗 14-3-3sigma 抗体、抗 mTOR シグナル経路関連タンパク抗体群を用いて蛍光抗体法を行い、落射蛍光顕微鏡によって ZK1 のタンパク発現について確認する。K17 の存在の有無が 14-3-3sigma の細胞内配置に変化を与える (Nature,441:362-365) ことを考慮に入れ、とくに 14-3-3sigma の細胞内配置を注意深く観察し、二重染色法も行い確認する。

(3) K17 ノックダウン細胞株における 14-3-3sigma 細胞内配置と mTOR シグナル経路関連タンパクの変化の認識

K17 に対する siRNA (Stealth siRNA) を ZK1 に Lipofectamin RNAiMAX を用いてトランスフェクションさせ、K17 遺伝子をノックダウンさせた細胞株 (ZK1_K17-siRNA) をつくる。RNAi 効果の測定は RNA レベルでおこなう。Stealth RNAi Negative Control Duplexes をトランスフェクションさせた ZK1 をネガティブコントロールとし、RT-PCR の手法を用いて K17 の RNA 発現レベルを比較検討し、ZK1_K17-siRNA を作成するための至適条件を決定する。ついで ZK1_K17-siRNA に対し抗 K17 抗体、抗 14-3-3sigma 抗体、抗 mTOR シグナル経路関連タンパク抗体群を用いて蛍光抗体法を行い、ZK1 のタンパク発現を観察する。さらには K-LISA mTOR Activity Kit を用い、mTOR 活性を定量的に測定する。これにより K17 の存在の有無が mTOR シグナル経路活性に関与することを証明する。

(4) K17 ノックダウン細胞株の細胞増殖能、浸潤能、遊走能の変化の検討

ZK1_K17-siRNA を用い、その細胞増殖能、浸潤能、遊走能を対照 (ZK1 および Stealth RNAi Negative Control Duplexes をトランスフェクションさせた ZK1) と比較検討する。細胞増殖能の検討には MTT 法にておこなう。

細胞培養プレートに各細胞株を播種後7日までを各日計測し、対照比較してその増殖能の変化を検討する。細胞浸潤能の検討にはマトリゲルTMを用いる。Thin Gel 法にておこない、12well 細胞培養プレート各 insert に 50 μ l/cm² で使用する。播種後 24 時間培養し細胞の固定染色をおこない、観察、計数して対象と比較検討する。細胞遊走能の検討には CytoSelect 24-Well 創傷治癒アッセイを用いる。細胞間に 0.9mm の一定な穴（ギャップ）を作成し、ギャップエリアを越えて遊走した細胞を観察、測定して対象と比較検討する。

4. 研究成果

(1) 外科切除組織標本における K17 と mTOR シグナル経路関連タンパクの発現パターンの認識

新潟大学医歯学総合病院口腔外科において切除をおこない、同病院歯科病理検査室でシーケンス癌の所見が認められた症例を抽出した。

外科切除材料のパラフィンブロックから連続切片を作製し、抗 K17 抗体、抗 14-3-3 sigma 抗体、抗 mTOR シグナル経路関連タンパク抗体群（抗 Akt 抗体、抗 phospho-Akt 抗体、抗 S6K1 抗体、抗 phospho-S6K1 抗体、抗 4E-BP1 抗体、抗 phospho-4E-BP1 抗体）を用いて免疫組織化学をおこない、その発現率を正常上皮、異型上皮、上皮内癌および浸潤癌ごとに集計するとともに相互の発現パターンを比較検討した。

条件検討に予想以上に労力を要し、そのために必要な薄切標本作成に時間を要した。また、当初予想されていた有効な結果が得られず解釈に難渋した。

口腔粘膜扁平上皮癌手術標本を病理組織学的診断のもと病変レベル分類を行い、正常上皮部位、異形上皮部位（うち、軽度異形上皮、中等度異形上皮に分類して評価）、上皮内癌部位（うち、基底細胞型、分化型に分類

して評価）、浸潤癌部位に分類した。その結果、正常上皮では 14-3-3sigma、K17 ともに陽性はなく、異型上皮でも同様の傾向であることは認識できた（図1）。そして、上皮内癌以

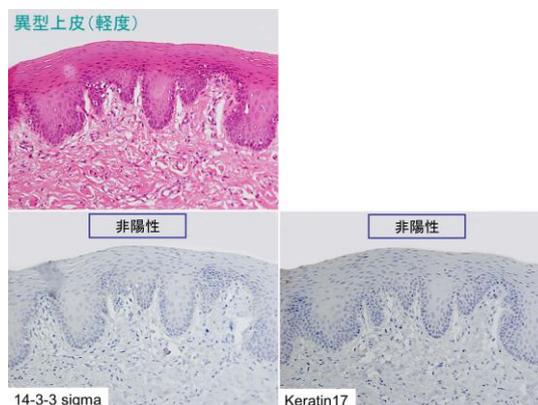


図1. 非癌部において 14-3-3 sigma と K17 は非陽性

上になると発現様式は一変し、14-3-3sigma と K17 が同調して発現してほぼ同部位に陽性所見を認めるようになった（図2）

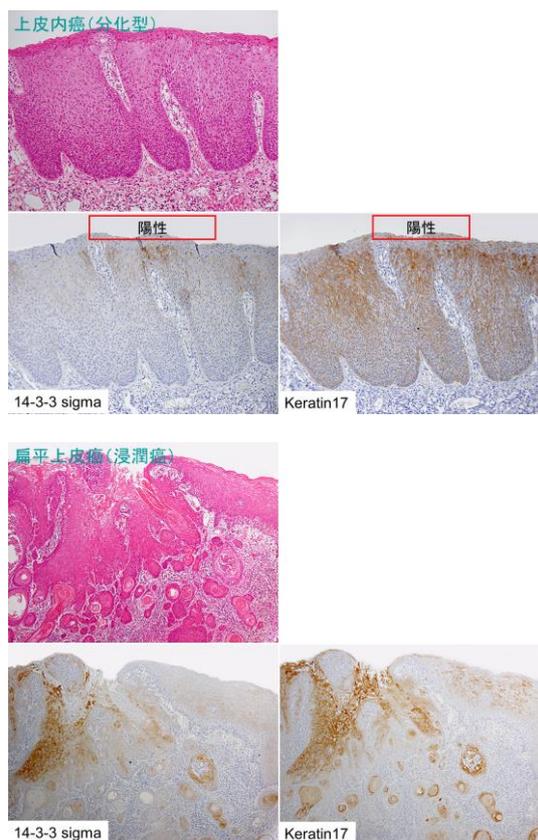


図2. 癌部において 14-3-3 sigma と K17 は陽性

当初の仮説では、14-3-3sigma によって mTOR シグナル経路が活性化するため、

mTOR 下流の関連タンパクのリン酸化を認めると思われた。しかしながら、それに一致した mTOR シグナル経路の活性化 (関連タンパク群の同調したリン酸化) を免疫組織学的に立証することができなかった (図 3)。

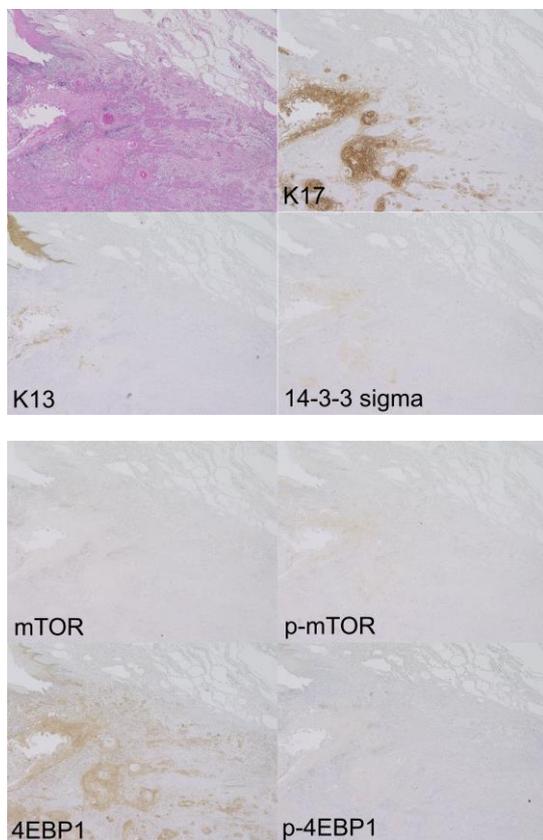


図 3. 14-3-3 sigma とリン酸化 mTOR 関連タンパク

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 俊彦 (MIKAMI, Toshihiko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90595745