

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11069

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍の低酸素レベル細胞外環境におけるエネルギー代謝調節機構

研究課題名(英文) Hypoxia-responsive MYC promotes the survival and growth of pleomorphic adenoma cells in hypoxic conditions.

研究代表者

丸山 智 (Maruyama, Satoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30397161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺多形性腺腫の間質は乏血管性の特徴があることから、低酸素環境下でのがん細胞の生存・増殖を可能にしているエネルギー代謝調節機構を明らかにするために、多形性腺腫由来細胞におけるHIF-1に関連したがんの代謝に重要な因子であるMYCの発現レベルおよび細胞機能に果たす役割を検討した。HIF-1遺伝子・蛋白質は48時間低酸素培養下で高発現し、MYCともに核への局在がみられた。MYC発現を抑制すると細胞増殖のみだけでなく遊走も抑制された。以上より、多形性腺腫細胞はMYCを高発現することで、低酸素状態での細胞の生存・増殖を維持していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：On the basis of hypovasculature of the salivary pleomorphic adenoma, we had a hypothesis that pleomorphic adenoma cells are able to survive in hypoxic conditions. To understand the hypoxia-dependent manner of energy metabolism in this particular tumor, we analyzed function of MYC, which are the most important factor of metabolic regulation, in cell proliferation and migration in hypoxic-conditioned pleomorphic adenoma cells. In hypoxic condition, SM-AP cells, human pleomorphic adenoma cell systems, showed higher gene expression levels of HIF-1 and MYC in hypoxia. HIF-1 protein was also kept in higher levels and localized more significantly in nuclei. The proliferation and migration of SM-AP cells were reduced under the lack of MYC expression. These results indicated that hypoxic conditions induced pleomorphic adenoma cells to produce MYC, which was maintained by high HIF-1 protein levels.

研究分野：医歯薬学

キーワード：唾液腺多形性腺腫 低酸素 HIF-1 c-Myc SM-AP

1. 研究開始当初の背景

がん細胞はがん特有の代謝機構、例えば解糖系によるATP産生などを主におこなうことで、正常と異なる微小環境である低酸素状態に適応し、生存・増殖している。すなわち、がんの生存・増殖の分子機構を解明するうえで、がん細胞の獲得する代謝のリプログラミング機構を理解することが重要かつ必須である。これまでに低酸素応答転写因子である hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)が低酸素下の解糖系を含めたがんのエネルギー代謝にも働いていることが知られており、MycもHIF-1と強調したがんの代謝に重要な因子であることが知られている。

これまで唾液腺多形性腺腫について多面的に解析を重ねてきた中で、多形性腺腫には病理組織学的に多彩な間質形成と乏血管性という特徴があり、低酸素状態におかれた腫瘍組織の解析には最適な実験材料であることを見出した。しかし、多形性腺腫の乏血管性すなわち低酸素環境に注目した研究は国内外になかった。その理由としては多形性腺腫からの細胞株樹立は困難で機能的実験は不可能だったことがあげられる。そこで、申請者は多形性腺腫由来細胞系SM-AP1~SM-AP5を樹立し、唾液腺にも腺腫から癌腫へという発がん経路が存在し、その癌化にはp53の変異や新生キメラ遺伝子が関与することを発見し、ヌードマウス移植実験で多形性腺腫を再現できた。

そこで、「多彩な間質形成と乏血管性を特徴とする唾液腺多形性腺腫には低酸素状態があり、多彩な間質の中で腫瘍細胞増殖が維持されている」という仮説をたて、樹立したSM-AP細胞系を通常培養条件下とモジュール式インキュベーターチャンバー装置を用いた低酸素培養条件下(5%CO₂-1%O₂-94%N₂/48時間)での培養とを比較検討したところ、低酸素培養条件下ではHIF-1α蛋白質レベルが有意に高く維持されるとともに、HIF-1αの多くは核へ移行し、さらに多彩な間質形成の主体である細胞外基質extracellular matrix (ECM)分子であるフィブロネクチン、テネイシン、基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン(パールカン)およびIV型コラーゲンの合成が低酸素培養条件下で促進されることも確認できた。よって多彩な間質形成も低酸素下での腫瘍細胞の積極的なECM合成による結果であったことがしめされたとともに、特にパールカンについては、癌の増殖・浸潤における主要なECMの一つとして注目するに至った。またSM-AP細胞系にsiRNAを用いたECM発現抑制をおこなうと、細胞増殖が抑制されることも確認できた。これらの結果から、多形性腺腫由来細胞には低酸素環境においてHIF-1α分解を抑制し、さらにHIF-1αが転写因子として機能して多彩な間質形成を促進し、低酸素状態における細胞増殖に寄与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題では、高度なECM合成能が共通しているものの低酸素応答性が異なる唾液腺腫瘍細胞のエネルギー代謝がどのように制御されて生存・増殖に利用されているのかを明らかにしたい。第一に、通常の酸素培養条件下と低酸素培養条件下で、Myc遺伝子発現および蛋白質発現レベル比較し、がん細胞が低酸素環境の構築に寄与するECM合成をおこなう際のエネルギー代謝に解糖系活性化が関与しているのかを検証する。第二に、HIF-1αとMycとの協調が確認し得たなら、生体内においても低酸素環境の構築に寄与しているのかを検証するため、ヌードマウス移植腫瘍組織およびヒト多形性腺腫組織手術材料を含むヒト癌組織材料を用いて、免疫組織化学的にHIF-1αおよびMyc分子の発現様式の関連性を解析する。第三に、低酸素応答を制御する転写因子HIF-1およびMycの発現を抑制した細胞系をsiRNAで作製し、試験管内でHIF-1αおよびMycの発現状態を確認すると同時に、ECM合成状況の変化や細胞浸潤・遊走への影響を検定する。以上の三つのアプローチで、低酸素状態でHIF-1αによってECM合成が促進された状態での、細胞生存・増殖・転移が維持亢進されるためのエネルギー代謝調節機構を、多形性腺腫を材料にして実証したい。

3. 研究の方法

- (1) 細胞培養：ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立したSM-AP1~SM-AP5細胞について、通常の酸素正常培養条件(5%CO₂/20%O₂)と低酸素(5%CO₂/1%O₂/94%N₂)の条件下で維持できるように培養する。免疫細胞化学、定量的RT-PCR法、免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法のために細胞を培養し、周密化までの適切な時期に4%パラフォルムアルデヒドにて固定するとともに、蛋白質、全RNAを回収する。通常の酸素正常培養には、マルチガスインキュベータを用い、低酸素培養実験には、ECMの発現解析をおこなうため、中長期的な低酸素環境の維持が必要不可欠であるが、それにはモジュール式インキュベーターを用いることで対応した。
- (2) 免疫細胞化学および遺伝子・蛋白質発現の検索：SM-AP細胞を上記1)項により培養し、通常の酸素正常培養条件と低酸素条件下で、通法にてtotal RNAを抽出し、フェノール・クロロホルム法により精製し、cDNAを調整し、定量的RT-PCR法にて、まず低酸素応答を司る転写因子であるHIF-1αとMyc遺伝子発現状況の相関の有無を詳細に検討する。また相関が得られたならば、各SM-AP細胞1.2x10⁴個をスライドチャンバーに植え込み、同

様に培養し、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、遺伝子発現を確認したのと同様の抗体種を免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法および免疫蛍光法を用いて蛋白質発現状況も確定した。

- (3) 細胞機能(増殖・遊走)試験: siRNA法にてMyc発現抑制細胞系を確立し、野生型SM-AP細胞との間で、細胞増殖およびセルカルチャーインサートを用いた浸潤能試験を行い、腫瘍の浸潤および遊走能を検討した。

4. 研究成果

- (1) c-Myc 遺伝子発現解析: 低酸素培養条件下におけるSM-AP1とSM-AP4のc-Myc遺伝子発現について試験管内で比較した。両細胞を通常の培養条件(10%FCS/5%CO₂)で3日間培養の後、さらに通常の培養条件と低酸素条件(1%O₂/5%CO₂/94%N₂)で48時間(中長期低酸素培養)培養の後、RNAを抽出・精製し、cDNAを調整して定量的RT-PCR法にて検討した。その結果、中長期低酸素培養下で、SM-AP1とSM-AP4ともに通常の培養条件下に比べて高発現が確認された。
- (2) c-Myc蛋白質発現解析: 上記1)の結果をうけて、中長期低酸素培養条件下におけるSM-AP1とSM-AP4のHIF-1 α 蛋白質発現について検討した。培養後細胞層を可溶化して、核分画と細胞質の分画にわけて蛋白質を抽出し、ウエスタンブロッティング法にて確認したところ、SM-AP1とSM-AP4ともに通常の培養条件下でのc-Myc蛋白質発現に比べ、低酸素培養条件下では発現が核に局在する傾向がみられた。さらにSM-AP1とSM-AP4のc-Myc蛋白質発現について、試験管内で比較した。両細胞を通常の培養条件(10%FCS/5%CO₂)と低酸素条件(1%O₂/5%CO₂/94%N₂)とで48時間培養(中長期低酸素培養)後に、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、c-Myc抗体をもちいて、免疫蛍光抗体法にてその発現動態を検討した。その結果、前年のウエスタンブロッティング法でのc-Myc蛋白質発現の結果と同様に、SM-AP1とSM-AP4の両細胞共に低酸素培養条件下において、c-Myc蛋白質が主に細胞核に陽性であることが確認された。
- (3) SM-AP細胞系のブドウ糖トランスポーター(Glut1)とグルタミントランスポーター(SLC1A5, ASCT2)の遺伝子発現解析: 上記1)の結果をうけて、中長期低酸素培養条件下におけるSM-AP1とSM-AP4のGlut1およびASCT2遺伝子発現について検討した。その結果、SM-AP1とSM-AP4ともに通常の培養条件下に比べて、それぞれ3倍、1.5倍の発現上昇が確認された。
- (4) SM-AP細胞系のc-Myc遺伝子発現抑制に

よる細胞機能解析: 1)での低酸素下でのc-Myc蛋白質発現解析の結果をうけて、c-Mycが細胞機能にどのように関わっているのかを検討するために、SM-AP細胞系にsiRNAを用いたc-Myc発現を抑制した系を作成し、SM-AP細胞系の増殖および遊走能の比較検討をおこなった。その結果、siRNAでc-Mycの発現を抑制したうえで、細胞を同量にまきなおした後の3日間の細胞増殖を比較したところ、SM-AP1及びSM-AP4ともに、c-Mycの発現を抑制した細胞の増殖が、コントロールに比して抑制されていることが示された。さらに同様にトランスウエルチャンパーに細胞をまきなおした後、24時間後の細胞遊走を比較したところ、SM-AP1でc-Mycの発現を抑制した細胞の遊走能が抑制された。

- (5) ノドマウス移植腫瘍組織でのc-Myc蛋白質発現解析: ヒト唾液腺多形性腺腫由来SM-AP1とSM-AP4の両細胞系を、通常の培養条件(10%FCS/5%CO₂)で培養した後、1.0x10⁶個/200 μ lに調整してノドマウス背部皮下に移植して腫瘍を形成させ、腫瘍内の酸素分圧を生物組織内酸素分圧連続測定装置酸素モニターにて測定した。その結果、SM-AP1移植腫瘍内酸素分圧は周囲皮下組織内酸素濃度に比して有意に低いことが確認された。さらに移植腫瘍組織を切除、固定後にパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的に検討した結果、腫瘍組織内のSM-AP1細胞の核にHIF-1 α が陽性となり、同様にc-Myc陽性も見られ、試験管内での実験結果と同様であった。また中長期低酸素培養条件下でより遺伝子発現の亢進が確認されていたGlut1も腫瘍組織内のSM-AP1細胞の細胞膜に陽性が見られた。
- (6) 実験結果の評価と総括: これまでの実験結果より以下のように結論した。

多形成性腺腫由来細胞では、低酸素下でc-MycとHIF-1 α が強調し、HIF-1 α 蛋白質の高発現、活性化が促進されることが示唆された。低酸素下での多形成性腺腫由来細胞の主な代謝経路としては、Glut1を介したグルコースの取り込みを亢進したGlycolysisであることが示唆された。低酸素下でc-Mycの発現を促進させることで、多形成性腺腫由来細胞の生存・増殖を維持していることが示唆された。

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20件)

- Abé T, Maruyama S, Babkair H, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Simultaneous immunolocalization of desmoglein 3 and IgG4 in oral pemphigus vulgaris: IgG4 predominant autoantibodies in its pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* (査読有), 44(10):850-6, (2015). doi: 10.1111/jop.12290. Epub 2014 Nov 17.
- Al-Eryani K, Cheng J, Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Babkair H, Essa A, Saku T. Protease-activated receptor 2 modulates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Hum Pathol.* (査読有), 46(7):991-9, (2015). doi: 10.1016/j.humpath.2015.03.003. Epub 2015 Mar 25.
- Maruyama S, Yamazaki M, Abé T, Babkair H, Cheng J, Saku T. Paradental cyst is an inclusion cyst of the junctional/sulcular epithelium of the gingiva: histopathologic and immunohistochemical confirmation for its pathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* (査読有), 120(2):227-37, (2015). doi: 10.1016/j.ooolo.2015.04.001. Epub 2015 Apr 28.
- Hasegawa M, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Abé T, Babkair H, Saito C, Saku T. Differential immunohistochemical expression profiles of perlecan-binding growth factors in epithelial dysplasia, carcinoma in situ, and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *Pathol Res Pract.* (査読有), pii: S0344-0338(16)30026-7, (2016). doi: 10.1016/j.prp.2016.02.016.
- Essa AAM, Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Babkair H, Raghieb AM, Megahed EMED, Cheng J, Saku T. Tumor-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. *Pathology.* (査読有), 48(3):219-27, (2016). doi: 10.1016/j.pathol.2016.02.006.
- Babkair H, Yamazaki M, Uddin MS, Maruyama S, Abé T, Essa A, Sumita Y, Ahsan MS, Swelam W, Cheng J, Saku T. Aberrant Expression of the Tight Junction Molecules Claudin-1 and Zonula Occludens-1 Mediates Cell Growth and Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Hum Pathol.* (査読有), pii: S0046-8177(16)30142-3, (2016). doi: 10.1016/j.humpath.2016.07.001. [Epub ahead of print]
- Shingaki M, Nikkuni Y, Katsura K, Ikeda N, Maruyama S, Takagi R, Hasashi T. Clinical significance of intraoral strain elastography for diagnosing early stage tongue carcinoma: a preliminary study. *Oral Radiology.* (査読有), (2016). doi: 10.1007/s11282-016-0269-1 SpringerLink
- Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion. *Exp Mol Pathol.* 102(2): 327-36 *Exp Mol Pathol.* (査読有), 102(2):327-336, (2017). doi: 10.1016/j.yexmp.2017.02.018. Epub 2017 Feb 27
- Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Nohno K, Morizumi T, Yoshie H. Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues. *Arch Oral Biol.* (査読有), 79:35-41, (2017). doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.003. Epub 2017 Mar 6.
- [学会発表](計 19 件)
- 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, バブカイル ハムザ, 程 瑠, 朔 敬: 低酸素応答ファイブロネクチン生合成が唾液腺多形性腺腫由来 SM-AP 細胞の増殖を促進する. 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日, 名古屋国試会議場(愛知県・名古屋市).
- 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, バブカイル ハムザ, 程 瑠, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌および正角化型異型上皮における正角化関連分子の動態. 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日, 名古屋国試会議場(愛知県・名古屋市).
- 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, ハムザ バブカイル, 隅田賢正, 程 瑠, 朔 敬: 新潟大学医歯学総合病院での病理診断における免疫組織化学的検索の取り組み. 第 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015 年 7 月 29-31 日, 北海道大学・学術交流会館(北海道・札幌市).
- 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, Babkair H, 隅田賢正, 程 瑠, 朔 敬: YAP は口腔扁平上皮癌の増殖—分化の分岐スイッチの役目を担っている: 正角化関連分子の動態解析から. 第 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015 年 7 月 29-31 日, 北海道大学・学術交流会館(北海道・札幌市).
- Maruyama S: Why is it pleomorphic? Reasons for colorful but hypoxic stroma of pleomorphic adenoma of the salivary gland. The 7th Asia Society of Oral and Maxillofacial Pathology, October 17-18, 2015, Taipei (Taiwan).

Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Saku T. : YAP modulates proliferation-differentiation phase switching in oral squamous cell carcinoma and its differentiation represents skin-type orthokeratosis.. The 7th Asia Society of Oral and Maxillofacial Pathology , October 17-18, 2015, Taipei (Taiwan).

丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, バブカイル ハムザ, 隅田賢正, 程 琨, 朔 敬: 唾液腺多形性腺腫細胞は低酸素環境下で HF-1 α -MYC 相互作用によってエネルギー代謝を制御している. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年 5 月 12 日-5 月 14 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).

丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, バブカイル ハムザ, 隅田賢正, 程 琨: 口腔表在性病変における P53 免疫組織化学的検索の取り組み. 第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2016 年 8 月 10 日-8 月 12 日, 広島大学・応仁会館(広島県・広島市).

丸山 智: 分科会プログラム「口腔粘膜早期癌の診断」「口腔癌早期病変の客観的病理組織診断: 免疫組織化学をもちいた診断の均霑化をめざして」. 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年 10 月 21 日-10 月 23 日, 福岡国際会議場・福岡サンパレス(福岡県・福岡市).

丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 隅田賢正, 程 琨, 朔 敬: 低酸素環境下で MYC は唾液腺多形性腺腫由来細胞の生存・増殖を亢進する. 第 106 回日本病理学会総会, 2017 年 4 月 27 日-4 月 30 日, 京王プラザホテル(東京都).

丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 隅田賢正, 程 琨, 朔 敬: MYC は低酸素環境下における唾液腺多形性腺腫由来細胞の生存・増殖を亢進する. 第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2017 年 8 月 23 日-8 月 25 日, ウエスタ川越(埼玉県・川越市).

丸山 智, 阿部達也, 山崎 学: ワークショップ 2 外科病理シリーズ: 口腔癌と口腔上皮性異形成の病理～WHO2017 の改定を踏まえて 免疫組織化学の導入による口腔上皮性異形成・上皮内癌の客観的病理組織診断の均霑化をめざして. 第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2018 年 1 月

25 日-1 月 26 日, 新潟グランドホテル (新潟県・新潟市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 智 (MARUYAMA, Satoshi)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 30397161

(2) 研究分担者

阿部 達也 (ABE, Tatsuya)
新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号: 70634856

山崎 学 (YAMAZAKI, Manabu)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 10547516

程 琨 (CHENG, Jun)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 40207460

朔 敬 (SAKU, Takashi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40145264

(3) 連携研究者

なし